รายงานการวิจัยและการพัฒนาการวิจัยการเกษตร ฉบับสมบูรณ์
รหัสโครงการ CRP5705020450

การพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุ

Development of Herbal Mouthwash for Protection against Dental Caries

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวิตรา พูลบุตร
อาจารย์ ดร. สกุลรัตน์ รัตนาเกียรติ์
อาจารย์ ดร. พรพรรณ เหล่าวชิระสุวรรณ

หน่วยปฏิบัติการวิจัยเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจาก
สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน)
ประจำปีงบประมาณ 2557

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร ประจำปีงบประมาณ 2557 และได้รับการสนับสนุนสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และขอขอบคุณนิสิต นักวิทยาศาสตร์และบุคลากรทุกท่านที่มีส่วนให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้

คณะผู้วิจัย

ชื่อเรื่อง การพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุ
Development of herbal mouthwash for protection against dental caries

ผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวิตรา พูลบุตร, อาจารย์ ดร. สกุลรัตน์ รัตนาเกียรติ์, อาจารย์ ดร. พรพรรณ เหล่าวชิระสุวรรณ
หน่วยปฏิบัติการวิจัยเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

บทคัดย่อ

ในวงอุตสาหกรรมด้านสุขภาพซึ่งรวมถึงด้านทันตกรรมได้มีความพยายามในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสารจากธรรมชาติ เนื่องจากผู้บริโภคส่วนใหญ่มีความตระหนักถึงผลข้างเคียงที่เกิดจากสารเคมี โรคฟันผุเป็นโรคติดเชื้อชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับเชื้อสเตรปโตคอคคัส โดยเฉพาะชนิดสเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์ ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในหลอดทดลองในการยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์ของสารสกัดด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซนต์ของสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ใบฝรั่ง (*Psidium guajava* L.), ผลฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis* Spreng.), รากชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* L.), ดอกกานพลู (*Syzygium aromaticum* L.) และดอกดีปลี (*Piper retrofractum* Vahl.) ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเบื้องต้นโดยวิธี disc diffusion จากนั้นใช้วิธี two-fold broth dilution ในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (MIC) พบว่าสารสกัดทุกชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์ สารสกัดดอกกานพลูทำให้เกิดโซนใสใหญ่ที่สุดคือ 16.7±0.5 มิลลิเมตร ส่วนสารสกัดรากชะเอมเทศให้ค่า MIC ต่ำที่สุดคือ 0.195 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อเท่ากับ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดสมุนไพรผสมใช้วิธี checkerboard พบว่า สารสกัดผสมระหว่างดอกกานพลูและใบฝรั่งที่ความเข้มข้นชนิดละ 0.195 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงการเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์ โดยมีค่า FICI เท่ากับ 0.25 ดังนั้นจึงนำสารสกัดรากชะเอมเทศใบฝรั่งและดอกกานพลูมาเป็นส่วนผสมในการตั้งตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรโดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดชนิดละ 0.38 mg/mL ผลการตั้งตำรับผลิตภัณฑ์พบว่าตำรับที่ 5 มีลักษณะทางกายภาพได้แก่ สี กลิ่น ความใส รสชาติ ที่เหมาะสม รวมทั้งมีความคงตัวที่ดีหลังผ่านการทดสอบด้วยวิธี Freeze-thaw cycle จำนวน 6 รอบ และเขย่า 60 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการทดสอบฤทธิ์ของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อต่อหน่วยเวลาตาม time-kill assay พบว่ามีการลดลงของเชื้ออย่างต่อเนื่องตั้งแต่ 30 วินาที และมีการเจริญเติบโตของเชื้อน้อยกว่า 10^3 CFU/ml หลังจากสัมผัสน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรไปแล้ว 2-8 ชั่วโมง เมื่อนำตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่พัฒนาขึ้นมาทดสอบความปลอดภัยเบื้องต้น ไม่พบความผิดปกติใดๆในอาสาสมัครผู้ทำการทดสอบจำนวน 10 คน และจากการทดสอบความพึงพอใจในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 50 คน เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์อ้างอิง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด พบว่าผู้ทดสอบมีความพึงพอใจในด้านรสชาติ การระคายเคืองช่องปากและความชอบโดยรวมต่อผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นสูงกว่าผลิตภัณฑ์อ้างอิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามผู้ทดสอบมีความพึงพอใจต่อสีและความใสของผลิตภัณฑ์ต่ำกว่าผลิตภัณฑ์อ้างอิง ขณะที่ความพึงพอใจต่อกลิ่นและความสดชื่นหลังการบ้วนปากต่อผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ไม่ต่างกัน ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรในเชิงพาณิชย์ต่อไป จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี HPLC ยังไม่สามารถระบุสารพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบได้ จึงจำเป็นต้องมีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคอื่น เช่น LC-MS เพิ่มเติมในอนาคต

คำสำคัญ : ฟันผุ, สเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์, เสริมฤทธิ์, สารสกัดสมุนไพร, น้ำยาบ้วนปาก

TITLE Development of herbal mouthwash for protection against dental caries
AUTHOR Pawitra Pulbutr, Sakulrat Rattanakiat, Pornpun Laovachirasuwan
Faculty of Pharmacy. Mahasarakham University

Abstract

Since there is a high concern on the adverse effects of chemical agents, health industries, including dental care production, are now focusing on creating herb-derived produces. Dental caries is an infectious disease associated with *Streptococcus* spp., mainly *Streptococcus mutans*. This study aimed to investigate the *in vitro* inhibitory effect of the 95% ethanol extracts from five herbs, *Psidium guajava* L., *Momordica cochinchinensis* Spreng., *Glycyrrhiza glabra* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Piper retrofractum* Vahl against *S. mutans* . Antimicrobial activity was primarily tested using disc diffusion method. A two-fold broth dilution method was then performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the extracts. All the extracts showed anti-bacterial activity against *S. mutans*. The maximal mean diameter of inhibition zone of 16.7±0.5 mm was produced by the *S. aromaticum* extract. *G. glabra* extract showed the lowest MIC (0.195 mg/ml) and minimum bactericidal concentration (MBC) (3.125 mg/ml). Checkerboard assay was used to explore synergistic effects of the extracts against the bacteria. A combined extract of *S. aromaticum* (0.195 mg/ml) and *P. guajava* (0.195 mg/ml) showed a synergistic effect (FICI 0.25) in inhibiting the growth of *S. mutans*. The extracts of *S. aromaticum*, *P. guajava* and *G. glabra* at the concentration of 0.38 mg/mL were then selected to be included in the formulation of herbal mouthwash. Appropriate physical characteristics, color, odor, clarity and taste, were found with formula no.5. This formula was also met the requirement of the stability tests (6 Freeze-thaw cycles and 48-hr, 60 rpm-shaking). It was found that the formula continuously exerted its anti-bacterial activity in time-kill assay, with a significant reduction of bacterial number in 30 seconds and less than 10^3 CFU/mL of bacteria in 2-8 hrs. From the preliminary safety test, there was no adverse reactions presented in 10 healthy volunteers after using the product. Fifty healthy volunteers were recruited to perform the satisfaction assessment of the product. The levels of satisfaction in terms of taste, irritation and overall satisfaction of our product were significantly higher than that of a control (a commercially available product). However, the volunteers rated lower levels of satisfactions toward our product in terms of color and clarity. There was no difference in satisfaction on odor and freshness of both products. These results showed the commercial potential of the herbal mouthwash developed in this project. Unfortunately, phytochemicals still cannot be identified by using HPLC. Thus, further experiments on phytochemicals such as LC-MS analysis is needed in the near future.

Key words: Dental caries, *Streptococcus mutans*, Synergistic effect, Herbal extract, Mouthwash

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
สารบัญตาราง ..... จ
สารบัญภาพ ..... ฉ
ส่วนที่ 1 บทนำ 1
ส่วนที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
ส่วนที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 18
ส่วนที่ 4 ผลการวิจัย 27
ส่วนที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 43
เอกสารอ้างอิง 49
ภาคผนวก 55

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แบคทีเรียชนิดต่างๆที่พบได้ในช่องปาก 6
ตารางที่ 2 เชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงออกมาได้จากคราบจุลินทรีย์ 8
ตารางที่ 3 ตัวอย่างพืชสมุนไพร 19
ตารางที่ 4 ปริมาณสารที่เติมในหลอดทดลองที่ 1-10 ในการหาค่า MIC 20
ตารางที่ 5 คู่ของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดทดสอบการเสริมฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ด้วยวิธี agar disc diffusion 21
ตารางที่ 6 ส่วนประกอบในตำรับน้ำยาบ้วนปากต่างๆ 22
ตารางที่ 7 ร้อยละผลผลิตของการสกัดสมุนไพร 28
ตารางที่ 8 การยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์โดยสารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ ด้วยวิธี agar disc diffusion 28
ตารางที่ 9 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถฆ่าเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ได้ (MBC) 31
ตารางที่ 10 ผลการทดลองการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด ด้วยวิธี double disc diffusion 31
ตารางที่ 11 ลักษณะทางกายภาพน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับต่างๆ 34
ตารางที่ 12 ผลการประเมินความปลอดภัยหลังการใช้น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรโดยอาสาสมัคร 36
ตารางที่ 13 คะแนนความพึงพอใจต่อตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุที่พัฒนาขึ้น (A) และตำรับที่มีในท้องตลาด (B) 36
ตารางที่ 14 ค่า retention time ของสารมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา 39

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 สัดส่วนของแบคทีเรียในช่องปากที่พบในคราบจุลินทรีย์ในระยะเวลาต่างๆ.....7
ภาพประกอบ 2 ตัวอย่างสารสำคัญที่พบในกานพลู 12
ภาพประกอบ 3 ตัวอย่างสารสำคัญที่พบในดีปลี..... 13
ภาพประกอบ 4 ตัวอย่างสารสำคัญที่พบในชะเอมเทศ 13
ภาพประกอบ 5 ตัวอย่างสารสำคัญที่พบในฝรั่ง..... 14
ภาพประกอบ 6 ตัวอย่างสารสำคัญที่พบในฟักข้าว..... 16
ภาพประกอบ 7 การยับยั้งการเจริญของ *S. mutans* DMST 18777 โดย 1=สารสกัดดีปลี 2=สารสกัดเมล็ดฟักข้าว 3=สารสกัดชะเอมเทศ 4=สารสกัดฝรั่ง 5=สารสกัดกานพลู 29
ภาพประกอบ 8 การยับยั้งการเจริญของ *S. mutans* DMST 18777 โดย 6=สารสกัดเปลือกฟักข้าว 7=สารสกัดฝรั่ง 8=สารสกัดดีปลี 9=สารสกัดกานพลู 10=สารสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว..... 29
ภาพประกอบ 9 การยับยั้งการเจริญของ *S. mutans* DMST 18777 โดย 11=95% เอทานอล 12=สารสกัดเมล็ดฟักข้าว 13=สารสกัดชะเอม 14=น้ำกลั่น 15=0.2% คลอเฮกซิดีน..... 30
ภาพประกอบ 10 ภาพประกอบ 10 การทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรโดย 1=สารสกัดกานพลู 2=สารสกัดฝรั่ง 3=สารสกัดเมล็ดฟักข้าว 31
ภาพประกอบ 11 การทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรโดย 1=สารสกัดชะเอมเทศ 2=สารสกัดเมล็ดฟักข้าว 3=สารสกัดฝรั่ง 32
ภาพประกอบ 12 การทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรโดย 1=สารสกัดกานพลู 2=สารสกัดชะเอมเทศ 3=สารสกัดฝรั่ง..... 32
ภาพประกอบ 13 ลักษณะทางกายภาพของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับต่างๆ 34
ภาพประกอบ 14 ลักษณะทางกายภาพของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับ 5 หลังการกรองผ่านกระดาษกรอง 0.45 ไมครอน 34
ภาพประกอบ 15 ลักษณะทางกายภาพของน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรหลัง Freeze thaw cycle 35
ภาพประกอบ 16 ลักษณะทางกายภาพของน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรหลังผ่านการเขย่า 60 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 35
ภาพประกอบ 17 แสดงตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อต่อหน่วยเวลา 38
ภาพประกอบ 18 Chromatogram ของสารมาตรฐาน ความเข้มข้น 25 µg/ml โดย A = gallic acid, B = chlorogenic acid, C = Rutin, D = Ferulic acid, E = Quercetin 39
ภาพประกอบ 19 Chromatogram ของเปลือกผลฟักข้าว 40
ภาพประกอบ 20 Chromatogram ของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว 40
ภาพประกอบ 21 Chromatogram ของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว 40
ภาพประกอบ 22 Chromatogram ของชะเอมเทศ 40
ภาพประกอบ 23 Chromatogram ของฝรั่ง..... 41
ภาพประกอบ 24 Chromatogram ของกานพลู 41
ภาพประกอบ 25 Chromatogram ของดีปลี..... 42

ส่วนที่ 1

บทนำ

โรคฟันผุเป็นปัญหาสุขภาพช่องปากที่สำคัญ ผลการสำรวจทันตสุขภาพแห่งชาติครั้งที่ 6 พ.ศ. 2549 -2550 โดยพบว่าเด็กก่อนวัยเรียนอายุ 3 ปีและ 5 ปี มีแนวโน้มการปราศจากโรคฟันผุเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับอดีต เด็กอายุ 3 ปี และ 5 ปี ปราศจากโรคฟันผุ ร้อยละ 38.60 และ ร้อยละ 19.36 ตามลำดับ การสำรวจเด็กวัยเรียนในกลุ่มอายุ 12 ปี และ 15 ปี พบว่าสภาวะการเกิดโรคฟันผุค่อนข้างคงที่คือร้อยละ 56.87 ซึ่งเด็กกลุ่มนี้มีการเข้าถึงบริการทันตกรรมป้องกันเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน แต่ยังคงมีปัจจัยเสี่ยงคือพฤติกรรมการบริโภคขนมกรุบกรอบและการดื่มน้ำอัดลม ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามกระแสนิยม ในกลุ่มวัยทำงานและผู้สูงอายุปัญหาหลัก คือ การสูญเสียฟัน วัยทำงานมีการสูญเสียฟันร้อยละ 82.84 โดยเฉลี่ย 3.92 ซี่ต่อคน ผู้สูงอายุเกือบทุกคน (ร้อยละ 94.04) มีการสูญเสียฟันเฉลี่ย 13.38 ซี่ต่อคน โดยมีปัญหาปริทันต์เป็นส่วนใหญ่ แม้ว่าสภาวะช่องปากของคนไทย มีแนวโน้มดีขึ้นในกลุ่มเด็ก แต่ยังคงมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของปัจจัยเสี่ยงต่อสภาวะโรค ซึ่งโดยภาพรวมแล้วการเกิดโรคฟันผุยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญ จำเป็นต้องมีการวางแผนเพื่อส่งเสริมการป้องกันโรค การประชาสัมพันธ์ให้เข้ารับบริการตั้งแต่ระยะต้นของโรค ในกลุ่มผู้สูงอายุมีปัญหากล้ามเนื้อมือ อาจต้องเพิ่มมาตรการในการควบคุมโรคเพิ่มเติมจากการแปรงฟัน เช่น การใช้น้ำยาบ้วนปาก [กองทันตกรรมสาธารณสุข กรมอนามัย, 2551] เป็นต้น

โรคฟันผุ (dental caries) เป็นโรคติดเชื้อเรื้อรังของเคลือบฟันหรือเนื้อฟัน การเกิดฟันผุเป็นกระบวนการที่เกิดจากการสูญเสียแร่ธาตุ (demineralization) ของเคลือบฟันหรือเนื้อฟัน [Featherstone J, 2000] โดยเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดออกมา ทำให้เคลือบฟันถูกทำลาย เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคมีอยู่หลายชนิด แต่เชื้อที่มีบทบาทสำคัญมากที่สุดในปัจจุบัน ได้แก่ มิวแทนส์สเตรปโตคอคไค (mutans streptococci) [van Houte J, 1994] โดยเฉพาะเชื้อสเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) [Jordan C, LeBlanc D, 2002; Loesche WJ, 1986] ที่มีความสำคัญในการเกิดฟันผุในระยะเริ่มต้น โดยสามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติค (lactic acid) ส่งผลให้เกิดการสลายแร่ธาตุของฟันทำให้เกิดฟันผุในที่สุด เชื้อนี้สามารถเกาะติดบนผิวฟันได้ โดยการสร้างกลูแคน (glucan) ซึ่งเป็น extracellular polysaccharide จากน้ำตาลซูโครส (sucrose) กลูแคนทำหน้าที่ยึดแบคทีเรียไว้ด้วยกันจนเกิดเป็นคราบจุลินทรีย์ในที่สุด

กระบวนการในการเกิดคราบจุลินทรีย์นั้น ขั้นแรกเชื้อแบคทีเรียจะต้องเข้าไปยึดเกาะบนผิวฟัน [Gibbons RJ, 1984; Hasty DL, et al, 1992] จากนั้นเชื้อจะเพิ่มจำนวนสะสม (accumulation) บนผิวฟัน เกิดการรวมกลุ่ม(aggregation) ของเชื้อ ผลคือการเกิดคราบจุลินทรีย์ เชื้อเหล่านี้ร่วมกันผลิตกรดออกมา ทำให้ชั้นเคลือบฟันและเนื้อฟันถูกทำลาย ระยะเริ่มแรกของการเกิดคราบจุลินทรีย์ เชื้อแบคทีเรียที่พบในมากที่สุดในตอนต้น ได้แก่ เชื้อกลุ่มสเตรปโตคอคไค รองลงมาคือกลุ่มไนซีเรียและอาจพบแบคทีเรียชนิดอื่นบ้าง จำนวนแบคทีเรียชนิดต่างๆนั้น จะแปรเปลี่ยนไปตามอายุของคราบจุลินทรีย์ และพบความสัมพันธ์ของชั้นคราบฟันที่สะสมหนาตัวขึ้นกับจำนวนแบคทีเรียที่ไม่สามารถเจริญในภาวะที่มีออกซิเจนเพิ่มมากขึ้นด้วย [Ritz HL, 1967] ดังนั้นการควบคุมการเกิดคราบจุลินทรีย์จึงเป็นพื้นฐานของการป้องกันโรคในช่องปากที่สัมพันธ์กับการเกิดคราบจุลินทรีย์ อาทิเช่น โรคฟันผุ โรคเหงือกอักเสบ และโรคปริทันต์ [Scheie AA, 1994]

วิธีการป้องกันฟันผุ คือ การกำจัดคราบจุลินทรีย์ มีวิธีการต่างๆ เช่น การแปรงฟัน การเคลือบร่องฟัน การใช้ฟลูออไรด์ การใช้น้ำตาลเทียม การใช้น้ำยาบ้วนปาก การใช้ยาปฏิชีวนะและสารต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ การใช้วัคซีนป้องกัน รวมถึงการทำให้ผิวภายในปากไม่เหมาะต่อการตั้งถิ่นฐานของแบคทีเรีย

สารเคมีที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในช่องปาก เช่น แอลกอฮอล์ หรือคลอเฮกซิดีน เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ มีข้อเสียบางประการ คือ ระคายเคืองเนื้อเยื่อในช่องปาก ก่อให้เกิดอาการแสบร้อน คลอเฮกซิดีนมีรสชาติขม ทำให้ปุ่มรับรสทำงานผิดปกติ หรือการเกิดคราบสีน้ำตาลบนตัวฟัน แผลในช่องปากและเหงือก หากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน [Beaudouin E, et al, 2004; Koshy G, et al, 2004; Ciancio S, 2003] ปัจจุบันทั่วโลกให้ความสนใจพืชสมุนไพรมากขึ้น การส่งเสริมให้มีการใช้สมุนไพรไทย เป็นการอนุรักษ์ภูมิปัญญาไทย การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกในการลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ ลดผลข้างเคียงที่อาจเกิดจากสารเคมีเหล่านั้น และอาจช่วยลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้ายาหรือสารเคมีจากต่างประเทศได้ด้วย

สมุนไพรไทยมีอีกหลายชนิดที่ยังไม่ได้มีการทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันฟันผุ แม้ว่าจะมีสมุนไพรบางชนิดจะมีงานวิจัยในแนวทางดังกล่าวบ้างแล้ว แต่การศึกษายังมีไม่มาก ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรได้แก่ ฝรั่ง ชะเอมเทศ ดีปลี กานพลูและฟักข้าว ที่มีผลยับยั้งเชื้อ *S. mutans* รวมทั้งศึกษาผลดังกล่าวของสารสกัดสมุนไพรเมื่ออยู่ในรูปแบบผสม ซึ่งอาจมีการเสริมฤทธิ์กันได้ การเสริมฤทธิ์กัน นอกจากช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแล้วยังลดการดื้อยาหรือลดปริมาณของตัวยาที่ใช้ด้วย ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นแนวทางในการนำสมุนไพรที่มีฤทธิ์ดังกล่าวมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในช่องปาก เช่น น้ำยาบ้วนปาก และจะได้เป็นข้อมูลในการพัฒนาและวิจัยสมุนไพรที่ช่วยป้องกันโรคที่ทางทันตสาธารณสุขต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบฝรั่ง ดอกดีปลี ดอกกานพลู รากชะเอมเทศและผลฟักข้าวในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์ในห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์ในห้องปฏิบัติการ มาตั้งตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่มีความคงตัวดี
3. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดสมุนไพรที่มีในตำรับน้ำยาบ้วนปาก
4. เพื่อทดสอบความพึงพอใจของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่พัฒนาได้ ในอาสาสมัคร

ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์ในห้องปฏิบัติการของสารสกัดเดี่ยวและสารสกัดคู่ผสมระหว่างสารสกัดจากใบฝรั่ง ดอกดีปลี ดอกกานพลู รากชะเอมเทศและผลฟักข้าว เพื่อหารูปแบบของสารสกัดคู่ผสมที่มีประสิทธิภาพดีและเสริมฤทธิ์กัน โดยวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา แต่ละการทดลองทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง จากนั้นคัดเลือกสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อสเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์มาพัฒนาเป็นตำรับน้ำยาบ้วนปาก แล้วทดสอบความคงตัวและความพึงพอใจในอาสาสมัคร และศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดสมุนไพรที่มีในตำรับน้ำยาบ้วนปาก

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเดี่ยวจากใบฝรั่ง ดอกดีปลี ดอกกานพลู รากชะเอมเทศและผลฟักข้าวในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์ในห้องปฏิบัติการ

2. ทราบฤทธิ์ของสารสกัดผสมระหว่างใบฝรั่ง ดอกดีปลี ดอกกานพลู รากชะเอมเทศและผลฟักข้าวในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งอาจมีฤทธิ์เสริมกัน ทำให้ได้ผลดีกว่าใช้สารสกัดเดี่ยว
3. ได้ตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรป้องกันฟันผุที่มีความคงตัว สามารถนำไปใช้ในทางคลินิกได้จริงต่อไป

ส่วนที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาวิจัยเรื่องนี้ ได้รวบรวมเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

1. ช่องปากและฟัน
2. เชื้อจุลินทรีย์ที่พบได้ตามปกติในช่องปาก
3. ไบโอฟิล์มบนฟัน (dental biofilm)
4. คราบจุลินทรีย์และการเกิดโรคฟันผุ
5. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับฟันผุ (cariogenic bacteria)
6. การป้องกันการเกิดฟันผุ
7. สมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง
8. น้ำยาบ้วนปาก

2.1 ช่องปากและฟัน

คุณสมบัติทางนิเวศวิทยาภายในปากทำให้สภาพภายในช่องปากมีความแตกต่างไปจากบริเวณอื่นของร่างกาย ภายในช่องปากในแต่ละบริเวณจะไม่ใช่ภาวะแวดล้อมแบบเดียวกันหมด ซึ่งแต่ละแห่งจะมีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดมากน้อยไม่เหมือนกัน โครงสร้างในช่องปากที่เป็นที่อาศัยของเชื้อจุลินทรีย์ที่เน้นมาก คือ ฟัน น้ำลาย และน้ำเหลืองเหงือก ภายในปากเป็นบริเวณเดี่ยวที่มีพื้นผิวส่วนแข็งที่ไม่หลุดลอกที่เอื้อต่อการตั้งถิ่นฐานของเชื้อจุลินทรีย์ เนื้อเยื่อที่มีลักษณะ เฉพาะนี้ยอมให้เชื้อจุลินทรีย์มีการสะสมเพิ่มจำนวนขึ้น พร้อมทั้งผลิตสารต่างๆออกมา จนก่อให้เกิดเป็นคราบจุลินทรีย์ (dental plaque) แม้จะสามารถพบได้ในปากตามปกติ แต่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคฟันผุและโรคปริทันต์ [Scheie AA, 1994]

2.1.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ภายในปาก

1. อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อการใช้พลังงานของแบคทีเรีย การทำงานของเอนไซด์ รวมถึงความเป็นอยู่ของแบคทีเรีย ภายในช่องปากมีอุณหภูมิค่อนข้างคงที่ คือ อยู่ระหว่าง 35-36 เซลเซียส ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะกับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด

2. ชีวิตที่รอดอยู่ได้โดยไม่ต้องพึ่งพาออกซิเจน (Anaerobiosis)

เชื้อจุลินทรีย์ภายในปากมีความแตกต่างระหว่างพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตกับพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต โดยดูที่ความสามารถมีชีวิตรอดในสภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มีทั้งพวกที่เจริญเติบโตได้ดีทั้งในที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic microorganism) เชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องมีออกซิเจนอยู่ด้วยเท่านั้นจึงจะเจริญเติบโตได้ (aerobic microorganism) และพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (anaerobic bacteria) การปรับเปลี่ยนสภาพแวดล้อมที่ละน้อยในบริเวณที่เชื้อจุลินทรีย์อาศัยอยู่เนื่องจากถูกรบกวนจากสภาพแวดล้อม จะมีผลต่อส่วนประกอบของชุมชนจุลินทรีย์ทั้งชนิดและปริมาณ

3. สภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ความเป็นกรด-ด่างภายในปากส่วนใหญ่ขึ้นกับน้ำลาย ค่าเฉลี่ยในสภาวะที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นมีค่าเท่ากับ 6.75 ในขณะที่มีของหวานอยู่ในปาก ความเป็นกรด-ด่างจะลดลงอย่างรวดเร็วเหลือแค่ 5 ซึ่งเกิดจากการเผาพลาญอาหารก่อให้เกิดกรดแลคติค จากนั้นความเป็นกรด ด่าง จะคืนกลับสู่ระดับความเป็นกลางอย่างช้าๆ น้ำลายมีหน้าที่ลดกรดที่เกิดจากผลิตผลของคราบจุลินทรีย์ แต่เนื่องจากลักษณะคราบจุลินทรีย์มีการรวมตัวของกลุ่มแบคทีเรียที่หนาแน่นและซับซ้อน จึงเกิดปัญหาว่าน้ำลายจะสามารถเข้าผ่านเข้าไปเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างที่บริเวณชั้นลึกๆได้หรือไม่ ความเป็นกรด – ด่างภายในคราบจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับรอยผุของฟันอาจมีค่าต่ำกว่าความเป็นกลาง จึงทำให้คราบจุลินทรีย์ดังกล่าวนี้มีเฉพาะชุมชนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทนกรดเท่านั้นอยู่รอด ซึ่งภาวะนี้ทำให้เชื้อสเตร็ปโตคอคไค(streptococci) และแลคโตบาซิลไล (*Lactobacilli*) บางชนิดเหมาะกับการเจริญเติบโต

4. โภชนาการ

ความเป็นอยู่ของประชากรจุลินทรีย์ภายในชุมชนของเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นกับอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ อาหารที่แบคทีเรียในปากนำไปใช้มาจากน้ำลายและน้ำเหลืองเหงือก ในน้ำลายประกอบด้วยสารพวกไนโตรเจน วิตามิน คาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายน้ำได้ที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีอยู่ในปากหลายชนิด ส่วนในน้ำเหลืองเหงือกจะประกอบด้วยปัจจัยที่ช่วยในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่สำคัญๆหลายชนิด คราบจุลินทรีย์มีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถผลิตโพลีแซคคาไรด์ทั้งภายในเซลล์และผลิตออกมานอกเซลล์จากน้ำตาลซูโครส ซึ่งโพลิ-เมอร์เหล่านี้ถูกประชากรของแบคทีเรียหลายชนิดนำมาไปใช้ในขณะที่ขาดแคลนอาหารพวกแป้งเกิดขึ้น

5. การเกาะติดแน่น (Adhesion)

ในขณะเคี้ยวอาหารและมีการไหลเวียนของน้ำลายนั้น เชื้อจุลินทรีย์ที่เกาะติดไม่แน่นกับผิวภายในปากจะถูกกำจัดออกจากปากได้ ดังนั้นการกลืนอาหารแต่ละครั้งจึงเป็นการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ออกจากปากได้เป็นอย่างดี เชื้อส่วนใหญ่จึงตั้งถิ่นฐานบริเวณที่ได้รับการป้องกันไม่ให้ถูกกำจัดออก เช่น บริเวณร่องฟัน ร่องเหงือก และบริเวณซอกฟัน มีเชื้อเพียงไม่กี่ชนิดที่มีคุณสมบัติพิเศษเพื่อช่วยในการยึดเกาะกล่าวคือ เชื้อเหล่านี้จะขับโพลีแซคคาไรด์ชนิดที่ไม่ละลายน้ำออกมานอกตัวเซลล์ ซึ่งช่วยในการยึดเกาะ

6. ระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system)

แอนติบอดีที่ทำหน้าที่ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในปากนั้น มีทั้งในน้ำลายและน้ำเหลืองเหงือก ซึ่งในน้ำเหลืองเหงือกยังมีภูมิคุ้มกันชนิดเซลลูลาร์อิมมูนิตี (cellular immunity) อยู่ด้วย ดังนั้นโอกาสที่เชื้อในช่องปากจะถูกควบคุมด้วยระบบภูมิคุ้มกันจึงเกิดขึ้น หลักฐานที่สนับสนุนทฤษฎีดังกล่าว มาจากการศึกษาพวกเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*S.mutans*) ซึ่งพบว่าในช่องปากบางตำแหน่งจะไม่มีเชื้อจุลินทรีย์พวกนี้เลย เพราะตำแหน่งดังกล่าวถูกควบคุมด้วยภูมิคุ้มกัน [จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2549]

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่พบได้ตามปกติในช่องปาก

นิเวศวิทยาภายในช่องปากจะทำหน้าที่ควบคุมส่วนประกอบของเชื้อจุลินทรีย์ภายในปากทั้งด้านชนิดและปริมาณ เชื้อจุลินทรีย์ที่พบภายในปากประกอบด้วยไวรัส ยีสต์ แบคทีเรีย และโปรโตซัว เหตุที่มีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้อง เนื่องจากนิเวศวิทยาในแต่ละแห่งภายในปากมีคุณสมบัติเฉพาะที่ไม่เหมือนกัน มีขีดจำกัดในเรื่องอาหารแตกต่างกัน แต่ละบริเวณดังกล่าวก็มีปัจจัยทางนิเวศวิทยาที่มีความสำคัญของมันภายใต้ภาวะดังกล่าว จึงทำให้ไม่มีประชากรของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียวที่ได้ประโยชน์ [จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2549]

ตารางที่ 1 แบคทีเรียชนิดต่างๆที่พบได้ในช่องปาก [จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2549]

Gram–Positive Genera	Gram-Negative Genera
Streptococcus	*Neisseria*
Micrococcus	*Moraxella*
Peptostreptococcus	*Veillonella*
Actinomyces	*Haemophilus*
Lactobacillus	*Actinobacillus*
Arachnia	*Capnocytophaga*
Propionibacterium	*Eikenella*
Bifidobacterium	*Campylobacter*
Eubacterium	*Selenomonas*
Rothia	*Centipeda*
Bacterionema	*Treponema*
	Bacteroides
	Fusobacterium
	Leptotrichia
	Wolinella

2.3 ไบโอฟิล์มบนฟัน (dental biofilm)

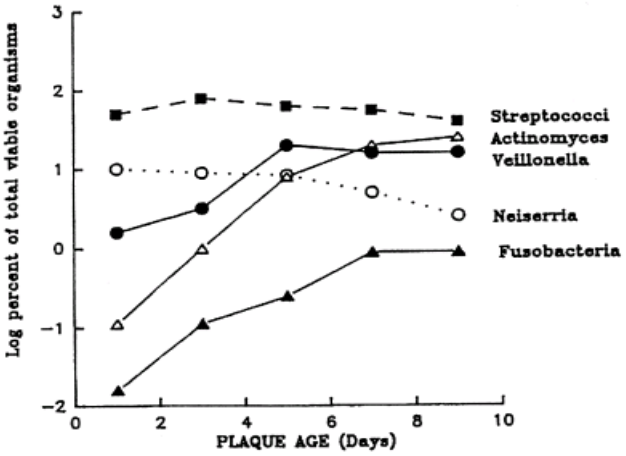
แบคทีเรียในน้ำลายจะอยู่ในสภาพเซลล์เดี่ยว ที่ล่องลอยในของเหลวคล้ายแพลงก์ตอน (planktonic bacteria) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียบางชนิดสามารถเกาะและเจริญเติบโตได้ดีบนพื้นผิวของวัสดุแข็งในช่องปาก อาทิ ฟัน วัสดุที่ใช้ในการบูรณะฟัน ฟันเทียมและรากฟัน ซึ่งเราเรียกแบคทีเรียที่เจริญบนวัสดุแข็งเหล่านี้ว่าไบโอฟิล์มบนฟัน (dental biofilm) หรือ คราบจุลินทรีย์ (dental plaque) อนึ่งคราบจุลินทรีย์เป็นคำที่ใช้กันมานานสำหรับคราบแบคทีเรียที่เกาะบนฟัน แต่ในปัจจุบันมีการให้นิยามและเรียกแผ่นฟิล์มจุลินทรีย์ไม่ว่าจะเกิดที่ใดว่าไบโอฟิล์ม (biofilm) ส่วนคำว่า ไบโอฟิล์มในช่องปาก (oral biofilm) หมายถึงชั้นแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อใดๆช่องปาก ซึ่งแตกต่างจากคำว่าไบโอฟิล์มบนฟัน ที่มีความหมายเฉพาะเจาะจงถึงคราบแบคทีเรียที่เกิดบนผิวฟันเท่านั้น ในงานวิจัยชิ้นนี้จึงใช้คำว่า คราบจุลินทรีย์แทนไบโอฟิล์มบนฟัน ซึ่งเป็นคำที่ได้บัญญัติไว้ในศัพท์ทันตแพทย์ศาสตร์ฉบับราชบัณฑิตยสถาน และเป็นคำที่ใช้และเข้าใจกันโดยทั่วไป คราบจุลินทรีย์ฟัน หมายถึง ประชากรที่ซับซ้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบบนผิวฟันที่ฝังอยู่ในเมทริกซ์(matrix) ของโพลิเมอร์ของแบคทีเรียและน้ำลาย คราบจุลินทรีย์ที่ถูกแคลซิไฟด์ (calcified) จะเปลี่ยนไปเป็นหินน้ำลาย (calculus or tartar) คราบจุลินทรีย์ประกอบด้วยแบคทีเรียหลายชนิดซึ่งมีประมาณร้อยละ 60-70 โดยปริมาตร แบคทีเรียเหล่านี้จะฝังตัวในเมทริกซ์ที่เกิดจากแบคทีเรียและเซลล์เจ้าของบ้าน (host) ทำให้เกิดการยึดจับเป็นแผ่น ซึ่งลักษณะทางคลินิกจะเห็นคราบสีเหลืองอ่อนเกาะยึดบนฟัน คราบบนผิวฟันที่เชื่อว่าเกิดจากการสะสมของแบคทีเรียในช่องปากการเกิดคราบจุลินทรีย์มีขั้นตอนใหญ่ๆดังนี้

2.3.1 การเกิดฟิล์มบางๆ (conditioning film) บนพื้นผิวอันเนื่องมาจากการเลือกดูดซับโปรตีนในน้ำลาย ซึ่งในกรณีที่เกิดบนเคลือบฟันเราเรียกฟิล์มว่า acquired pellicle

2.3.2 การเริ่มยึดเกาะ (adhesion) และยึดเกาะรวม (co-adhesion) ของแบคทีเรียที่สัมผัสกับ acquired pellicle [จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2549; สิทธิชัย ขุนทองแก้ว, 2552]

2.3.3 การเจริญเต็มที่ (maturation) ของแบคทีเรียและจับยึดกัน (cohesive) จนกลายเป็นคราบจุลินทรีย์ [Svensater G, Bergenholtz G, 2004; Bos R, et al, 1999]

การศึกษาที่อธิบายการเกิดคราบจุลินทรีย์ในงานวิจัยของ Ritz [Ritz HL, 1967] แสดงให้เห็นว่าการเกิดคราบจุลินทรีย์ในวันแรกๆจะพบเชื้อ Streptococci ซึ่งเป็นแบคทีเรีย gram-positive aerobe มีหลักฐานที่สนับสนุนยืนยันว่า Streptococci เป็นแบคทีเรียชนิดแรกๆที่ยึดเกาะกับ acquired pellicle บนเคลือบฟัน [Lie T, 1978] และเมื่อเวลาผ่านไปจะมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อ Actinomyces มากขึ้นในคราบจุลินทรีย์



ภาพประกอบ 1 สัดส่วนของแบคทีเรียในช่องปากที่พบในคราบจุลินทรีย์ในระยะเวลาต่างๆ [Ritz HL, 1967]

ปัจจุบันเรายังไม่ทราบรายละเอียดทั้งหมดในการยึดเกาะของแบคทีเรียบนผิวฟัน แต่สามารถแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนหลักคือ ในขั้นตอนแรกแบคทีเรียจะยึดเกาะกับผิวฟันโดยใช้กลไกไม่มีความ จำเพาะ(non-specific adherence) ได้แก่ การใช้อันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) และอันตรกิริยาระหว่างประจุ (electrostatic interaction) จากนั้นจึงมีการยึดเกาะของแบคทีเรียที่ผิวฟันที่มีลักษณะจำเพาะมากขึ้น (specific adherence) เป็นกระบวนการที่แบคทีเรียใช้โมเลกุล adhesin บนผนังเซลล์ที่มีความจำเพาะกับตัวรับที่เป็นไกลโคโปรตีนใน acquired pellicle เป็นกลไกที่มีความจำเพาะในแบคทีเรียแต่ละชนิด [สิทธิชัย ขุนทองแก้ว, 2552]

การพัฒนาของคราบจุลินทรีย์ [Ritz HL, 1967; จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2549; สิทธิชัย ขุนทองแก้ว, 2552; Rickard AH, et al, 2003] ภายหลังที่แบคทีเรียกลุ่มเริ่มต้นทำการยึดเกาะบน acquired pellicle โดยอาศัยกลไกทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะแล้ว หากสิ่งแวดล้อมเหมาะสมกับการเจริญเติบโต จะมีการแบ่งตัว มีการสร้างโพลิเมอร์เพื่อใช้ในการยึดจับแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ให้มีความแข็งแรงยิ่งขึ้น จากนั้นก็จะมีแบคทีเรียกลุ่มที่สอง (secondary colonizer) มายึดเกาะกับแบคทีเรียกลุ่มแรก ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่าการเกาะกลุ่ม (coaggregation) ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ทำให้แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถยึดเกาะกับคราบจุลินทรีย์ได้มากก็คือ ความสามารถในการสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่มีมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ การสร้างมิวแทน (mutan) ที่ไม่ละลายน้ำของพวก *S. mutans* ทำให้เกิดการยึดเกาะของแบคทีเรียหลากหลายในคราบจุลินทรีย์ การที่แบคทีเรียสามารถเกาะกลุ่ม มีการยึดเกาะระหว่างแบคทีเรียและมีการแบ่งตัวจะเป็นการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียเหมือนๆกันให้มีจำนวนมากขึ้น ซึ่งจะมีผลกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลากหลายชนิด กล่าวคือ หากแบคทีเรียกลุ่มแรกมีการสร้างและสลายสารที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มใด ก็จะเป็นผลให้เชื้อกลุ่มนั้นเจริญเติบโตได้ดี อาทิ คราบจุลินทรีย์ในระยะแรกๆมีแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนมาก ก็จะมีผลทำให้ออกซิเจนในคราบจุลินทรีย์ลดลง เป็นผลทำให้มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนมาก

ขึ้น จะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมของคราบจุลินทรีย์ทำให้เกิดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิดได้ดี ในขณะที่บางชนิดเจริญเติบโตช้าหรือตายไป

ส่วนประกอบของชุมชนเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะได้จากซอกฟัน จำนวน 59 ตัวอย่าง ที่แสดงในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่พบได้ในทุกตัวอย่าง คือ เชื้อจีนัส *Actinomyces* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Actinomyces viscosus* กับ *Actinomyces naeslundii* ส่วน *Streptococcus mitis* แม้จะไม่ได้มีแสดงในตารางแต่ก็เป็นเชื้อที่พบได้บ่อยที่สุดบริเวณซอกฟัน ส่วนเชื้อนัยซีเรีย (*Neisseria*) มีการเจริญเติบโตเต็มที่ในตอนท้ายๆ ค่อนข้างต่ำ [Bowden GH, et al, 1975]

ตารางที่ 2 เชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงออกมาได้จากคราบจุลินทรีย์ [Bowden GH, et al, 1975]

Population	Percentage of total cultivable flora	Range
Streptococci	22.9	0.4-70.00
Gram-positive rods (predominanty *Actinomyces*)	42.1	4.0-81.0
Gram-negative rods (predominanty *Bacteroides*)	7.8	0-66.0
Neisseria	1.5	0-44.0
Veillonella	13.1	0-59.0
Fusobacterium (individual species)	0.4	0-5.4
S. mutans	2.2	0-23.0
S. sanguis	5.9	0-64.0
S. milleri	0.5	0-33.0
S. salivarius	0.7	0-7.0
A. israelii	16.5	0-78.0
A. viscosus/naeslundii	19.1	0-74.0

2.4 คราบจุลินทรีย์และการเกิดโรคฟันผุ

กระบวนการพื้นฐานการเกิดโรคฟันผุเกิดจากการสลายแร่ธาตุ (demineralization) อันเนื่องมา จากกรด ซึ่งเกิดจากการย่อยน้ำตาลของแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ กระบวนการเกิดคราบจุลินทรีย์เป็นกระบวนการพลวัต กล่าวคือ ร่างกายจะมีการซ่อมแซมเคลือบฟันโดยการคืนกลับของแร่ธาตุ (remineralization) ทำให้มีการสมดุลระหว่างการสูญเสียและการคืนกลับของแร่ธาตุที่เคลือบฟัน การเกิดฟันผุจะเกิดเมื่อการสลายแร่ธาตุมากกว่าการคืนกลับแร่ธาตุ [Featherstone J, 2000] ซึ่งเป็นการสูญเสียสมดุลเป็นผลให้เกิดฟันผุในระยะเริ่มแรก (initial caries) [สิทธิชัย ขุนทองแก้ว, 2552] ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันได้มีการศึกษาจุลินทรีย์ที่เกี่ยว ข้องกับโรคฟันผุ และได้มีสมมุติฐานเกี่ยวข้องกับโรคฟันผุ 3 สมมุติฐานดังนี้

2.4.1 สมมุติฐานคราบจุลินทรีย์แบบไม่จำเพาะ เป็นสมมุติฐานที่เชื่อว่าการเกิดฟันผุไม่ได้เกิดจากแบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่งเป็นสำคัญ แต่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดในคราบจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำตาลให้เป็นกรด ดังนั้นการป้องกันฟันผุจึงมุ่งเน้นที่การกำจัดคราบจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นแนวคิดมาจาก chemoparasitic theory ซึ่งทฤษฎีนี้เป็นรากฐานที่สำคัญสำหรับวิทยาโรคฟันผุยุคใหม่ โดยระบุ

ความสำคัญของการย่อยคาร์โบไฮเดรตเป็นกรด รวมทั้งการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกรดและการเกิดฟันผุ [Fejerskov O, 1997]

2.4.2 สมมุติฐานคราบจุลินทรีย์แบบจำเพาะแสดงให้เห็นว่าเชื้อ สเตร็ปโตคอคคัสบางชนิดเท่านั้นที่สามารถก่อโรคฟันผุใน hamster ที่ถูกเลี้ยงด้วยน้ำตาลปริมาณสูง โดยเชื่อว่าถึงแม้คราบจุลินทรีย์จะประกอบด้วยแบคทีเรียหลายชนิด แต่จะมีแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้นที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ ดังนั้นการป้องกันฟันผุจึงมุ่งเน้นไปที่การกำจัดแบคทีเรียเป้าหมายมากกว่ากำจัดแบคทีเรียทุกชนิดในคราบจุลินทรีย์

2.4.3 สมมุติฐานคราบจุลินทรีย์แบบระบบนิเวศน์วิทยา โดยเสนอว่าการเกิดโรคฟันผุเป็นผลจากการเสียสมดุลของระบบนิเวศน์ในคราบจุลินทรีย์ โดยเชื่อว่าในสภาวะที่ไม่มีโรคฟันผุ คราบจุลินทรีย์อาจมีแบคทีเรียที่ก่อโรคอยู่ก่อนแต่มีจำนวนน้อย ซึ่งหากมีการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อโรค ก็จะทำให้เกิดโรคได้ ดังนั้นในการควบคุมโรคฟันผุอย่างมีประสิทธิภาพนอกจากการกำจัดแบคทีเรียเป้าหมายแล้วยังจำเป็นที่จะต้องมีกระบวนการควบคุมปัจจัยที่ส่งเสริมที่เอื้อต่อการเกิดโรคด้วย เช่น การควบคุมความถี่ในการบริโภคน้ำตาล การกำจัดคราบจุลินทรีย์โดยวิธีกล อาทิ การแปรงฟัน เป็นต้น [สิทธิชัย ขุนทองแก้ว, 2552]

2.5 แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับฟันผุ (Cariogenic bacteria)

ผลการศึกษาจำนวนมากที่สนับสนุนแนวคิดว่า mutans streptococci เป็นแบคทีเรียที่สำคัญในการก่อฟันผุ โดยพบว่าเชื้อนี้มีความสัมพันธ์มากกับการเริ่ม (initiation) เกิดรอยฟันผุบริเวณรอยแยก (fissure) หรือมีฟันผุแบบรุนแรง (rampant caries) การก่อโรคฟันผุในรอยโรคที่มีการผุลุกลาม (advance lesion) จะพบว่ามีปริมาณ mutans streptococci และ *Lactobacili* เป็นจำนวนมาก ซึ่งเชื่อว่าแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มมีบทบาทสำคัญในรอยโรคฟันผุลุกลาม นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่ม Fastidious Gram-positive อาทิ *Actinomyces naeslundii, Actinomyces odontolyticus, Propionibacterium* spp. *และ Eubacterium* spp. รวมทั้งแบคทีเรียกลุ่ม Gram-negative ได้แก่ *Fusobacterium* spp., *Capnocytophaga* spp. *และ Veillonella* spp. และในฟันผุที่รากฟันมักพบ mutans streptococci, *Lactobacili* และ *Actinomyces naeslundii* [สิทธิชัย ขุนทองแก้ว, 2552; Tanzer JM, 2001]

เชื้อ *streptococcus* ที่พบในปากที่พบมาก คือ *S. mutans* , *S. sanguis, S. mitis, S. milleri, S. salivarius* ซึ่งเชื้อสปีชีส์เหล่านี้มีบางสายพันธุ์สามารถทำให้สัตว์ทดลองที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นในปากเกิดฟันผุได้ การทดลองเลี้ยงสัตว์ทดลองด้วยน้ำตาลซูโครส พบว่า *S. mutans* จะเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงมากที่สุดที่สามารถทำให้เกิดโรคฟันผุ นอกจากนี้ streptococcus ตัวอื่นๆที่พบในปาก สามารถทำให้เกิดโรคได้เมื่อมีโอกาส เช่น *S. mitis* มักแยกออกมาได้จากเยื่อหุ้มหัวใจที่มีการติดเชื้อ *S.milleri* แยกออกมาจากหนองฝีที่เกิดขึ้นที่สมองและตับ [จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2549] ในงานวิจัยนี้ให้ความสำคัญกับแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุโดยเลือกแบคทีเรีย *S. mutans* มาใช้ในการศึกษา

เชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ เป็นแบคทีเรียที่ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Clarke ในปีค.ศ. 1942 โดยเพาะแบคทีเรียชนิดนี้จากรอยฟันผุในมนุษย์ และเสนอว่าแบคทีเรียนี้น่าจะมีบทบาทในการก่อฟันผุ เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิต dextran เจริญได้ดีในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ บางสายพันธุ์อาจแยกได้ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน หรือ microaeroplie ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงแปรผันได้ จัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobe อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 37 °C มีรูปร่างทรงกลมรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 2 ไมโครเมตร อยู่เป็นคู่หรือเรียงตัวเป็นสาย ในอดีตมีการแบ่งเชื้อเป็น 8 serotype โดยอาศัยตามชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่ผนังเซลล์ ซึ่งได้แก่ serotype a-h จากการศึกษา

โดยวิธี DNA hybridization ในเวลาต่อมาทำให้มีการแบ่งเป็น 4 กลุ่ม โดยอาศัยร้อยละของผลรวม guanine (G) และ cytosine (C) ใน DNA โดย *S. mutans* ในปัจจุบันหมายถึง *S. mutans* serotype c, e และ f (G+C เท่ากับ 36-38 %) และเป็น *S. mutans* ที่พบได้มากในคราบจุลินทรีย์มนุษย์ ความสามารถในการสร้างกรด (acidogenicity) โดยสร้างจากการใช้น้ำตาลโดยผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolytic pathway) และการหมัก (fermentation) ผลิตภัณฑ์ที่ได้ ได้แก่ กรดแลคติค ฟอร์มิก (formic acid) อะซีติก (acetic acid) และเอธานอลในสภาวะที่แตกต่างกันขึ้นกับการเพาะเลี้ยง [Loesche WJ, 1986; จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2549; สิทธิชัย ขุนทองแก้ว, 2552; Tanzer JM, et al. 2001; Hamada S, Slade HD, 1980]

2.6 การป้องกันการเกิดฟันผุ

กลไกการกำจัดคราบจุลินทรีย์ โดยการรักษาอนามัยช่องปาก สามารถป้องกันฟันผุได้ โดยจะต้องควบคุมการบริโภคน้ำตาล วิธีการป้องกันฟันผุอาจทำได้โดย

2.6.1 การเคลือบร่องฟัน (Fissure sealants) ตำแหน่งที่เกิดการผุได้ง่าย ได้แก่ บริเวณหลุมและร่องฟันที่อยู่ด้านบนบดเคี้ยว เป็นบริเวณที่ทำความสะอาดได้ยาก จึงมีการนำวัสดุที่เป็นพลาสติกมาเคลือบปิดร่องฟัน มีคุณสมบัติในการยึดเกาะกับผิวฟันได้เหนียวแน่น ป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์เข้ามาอยู่อาศัยในร่องฟัน [จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2549]

2.6.2 ฟลูออไรด์ (Fluoride) ผลของฟลูออไรด์ต่อแบคทีเรียที่ทดลองนอกกายแสดงให้เห็นว่ามีผลในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย แต่ต้องใช้ความเข้มข้นที่สูง คือ มากกว่า 1,000 ppm งานวิจัยในกายพบว่าการใช้ acidulated phosphate fluoride gel ที่มี NaF 1.1 % (5,000 ppmF) ไม่มีผลลดปริมาณเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ในน้ำลายของผู้ป่วย หลังใช้ 3-6 สัปดาห์ [Vierrou AM, et al. 1986] และหากจะลดปริมาณได้จะต้องใช้ปริมารฟลูออไรด์ 12,300 ppmF ทุกวัน ติดต่อกัน 8-10 วัน ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าการทำปฏิกิริยากับฟลูออไรด์ 1,000 ppmF ในระยะเวลาสั้นๆประมาณ 30 นาที อาจไม่ทำให้ปริมาณฟลูออไรด์ในคราบจุลินทรีย์สูงมากพอ ที่จะยับยั้งกระบวนการไกลโคไลซีสของแบคทีเรีย ผลการวิจัยจึงเชื่อว่ากลไกการป้องกันฟันผุของฟลูออไรด์ไม่น่าจะเกิดจากการต้านแบคทีเรีย แต่เป็นผลจากการไปยับยั้งการสลายแร่ธาตุและการเร่งการคืนกลับแร่ธาตุในรูปฟลูออร์ไฮดรอกซีอะปาไทต์ หรือ แคลเซียมฟลูออไรด์ [Featherstone J, 2000; Featherstone JDB, 1999; Ogaard B, 2001]

2.6.3 น้ำตาลเทียม (Artificial sweetener) สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่มีความหวานมากกว่าน้ำตาลซูโครส และกลุ่มที่มีความหวานน้อยกว่าน้ำตาลเทียมกลุ่มแรก ได้แก่ ซัยคลาเมท (cyclamate) ขัณฑสกร (saccharine) ปัจจุบันไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากการทดลองในสัตว์ทดลอง พบว่าปริมาณน้ำตาลที่สูงทำให้หนูเป็นมะเร็ง ส่วนน้ำตาลอีกกลุ่มหนึ่ง ได้แก่ แมนนิทอล (mannitol) ,ซอลบิทอล (sorbitol) และไซลิทอล (xylitol) ซึ่งน้ำตาลกลุ่มนี้แบคทีเรียไม่สามารถดูดซึมเข้าไปเพื่อให้เกิดการเมแทบอไลท์จนกลายเป็นกรดได้ แต่ *S. mutans* สามารถเมแทบอไลท์พวกโพลิออล (polyols)ของน้ำตาลเทียม mannitol และ sorbitol ได้ และผลิตกรดอินทรีย์ออกมาได้ แต่ไม่สามารถเมแทบอไลท์ xylitol ได้ เนื่องจากความแตกต่างของโครงสร้างโมเลกุล [จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2549]

2.6.4 ยาปฏิชีวนะและสารต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antibiotic and anti-microbial agents) เป็นที่ยอมรับในปัจจุบันว่า การใช้ยาปฏิชีวนะมาใช้ในการควบคุมคราบจุลินทรีย์ที่ก่อโรค เพราะอำนาจในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียกว้างมาก ซึ่งจะทำให้เชื้อมีการปรับตัวและเกิดการดื้อยาขึ้น อย่างไรก็ตามยังมีการใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมคราบจุลินทรีย์ยังมีอยู่ แต่มีการใช้เฉพาะรายเท่านั้น

สารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์มีหลายชนิด ที่นำมาใช้ร่วมในการควบคุมคราบจุลินทรียที่มีประสิทธิภาพคือ คลอเฮกซิดีน เช่น การใช้น้ำยาบ้วนปากคลอเฮกซิดีนบ้วนปากเป็นประจำทุกวัน สามารถลดปริมาณคราบจุลินทรีย์และการอักเสบของเหงือก และลดการฟันผุลงได้ คลอเฮกซิดีนเป็นโมเลกุลที่มีประจุบวกและมีความสมมาตร (sysmetrical cationic molecule) ประกอบด้วย 4-chlorophenyl ring 2 หน่วย และกลุ่มไบกัวไนด์ 2 หน่วย (bis-biguanide) [สิทธิชัย ขุนทองแก้ว, 2552] เป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในปาก ความเข้มข้นในขนาดสูงสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ ผลข้างเคียงที่พบเสมอคือ ทำให้ฟัน รอยโรคฟันผุ วัสดุอุดฟัน มีสีน้ำตาล การใช้คลอเฮกซิดีนจะมีผลต่อการรับรส โดยทำให้การรับรู้ (perceptual intensity) รสเค็มและรสขมลดลง และอาจมีผลต่อการหลุดลอกของเซลล์บุผิว และเกิดเป็นแผลที่เยื่อเมือกช่องปาก (oral mucosa) [Ciancio S, 2003]

2.6.5 วัคซีนป้องกันฟันผุ (dental caries vaccine) หน้าที่และกลไกการทำงานในการป้องกันฟันผุของวัคซีนนั้น ยังไม่ทราบแน่ชัด อาจกล่าวได้เพียงว่าวัคซีนเข้าไปขัดขวางการตั้งถิ่นฐานของเชื้อแบคทีเรีย และอาจลดการฟอร์มตัวของคราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น สำหรับข้อมูลในการศึกษาวัคซีนด้านประสิทธิภาพยังต้องการข้อมูลในมนุษย์ต่อไป [จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2549]

2.6.6 การเกาะติดแน่นระหว่างเชื้อจุลินทรีย์กับพื้นผิวในปาก (Adherence between microorganism and oral surface) การเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการในการเกาะติดของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีต่อผิวปากจะสามารถป้องกันโพลิเมอร์ที่จะมาเกาะติดบนผิวฟันได้ โดยการทำให้พื้นผิวฟันไม่อำนวยให้เชื้อจุลินทรีย์เข้ามาเกาะติด เป็นการดึงเอาความรู้ด้านจุลชีววิทยาเข้ามาใช้เป็นประโยชน์ [จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2549]

ปัจจุบันมีงานวิจัยที่จะนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆมากขึ้น เนื่องจากสมุนไพรส่วนใหญ่มีความปลอดภัย ไม่ค่อยมีความเป็นพิษหรืออาการข้างเคียงต่อคนและสัตว์ ซึ่งรวมถึงการใช้งานทางทันตกรรมด้วย การส่งเสริมให้มีการใช้สมุนไพร นอกจากเป็นการอนุรักษ์ภูมิปัญญาไทยแล้ว ยังเป็นการสนับสนุนนโยบายของรัฐบาลในการนำสมุนไพรมาใช้อย่างถูกต้อง จึงมีนักวิจัยหันมาให้ความสนใจกับสมุนไพรเหล่านี้ ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ทั้งพืช สัตว์ สมุนไพร และแร่ธาตุ จึงได้คัดเลือกสมุนไพรมาศึกษาประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียในช่องปาก เพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปาก โดยสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษามีจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ กานพลู, ดีปลี, ชะเอมเทศ, ฝรั่ง และฟักข้าว

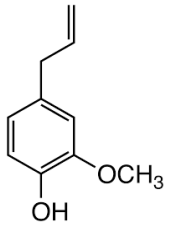
2.7 สมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง

2.7.1 กานพลู

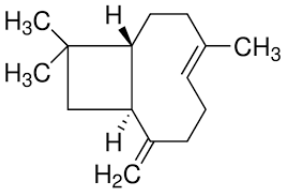
ชื่อวิทยาศาสตร์: *Syzygium aromaticum* (Linn.) Merr & Perry.

ชื่อท้องถิ่น : จันจิ (ภาคเหนือ)

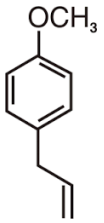
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ กานพลูเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูง 5-10 เมตร แตกกิ่งก้านสาขาเป็นระเบียบ ใบเดี่ยวและเรียงใบตรงกันข้าม ใบอ่อนสีแดงหรือสีน้ำตาลแดง เนื้อใบบาง ค่อนข้างเหนียว ใบมีจุดต่อมน้ำกระจายอยู่ทั่วไป ใบกว้าง 2.5-4 เซนติเมตร ยาว 6-10 เซนติเมตร ดอกช่อ ดอกอ่อนสีเขียว เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง ผลกลมรูปไข่ ส่วนที่ใช้เป็นยาใช้ดอกตูม รสและสรรพคุณยาไทย รสเผ็ดร้อน กลิ่นหอม แก้ท้องเสีย ขับลม แก้ท้องอืดเฟ้อ



eugenol



trans-β-caryophyllene



chavicol

ภาพประกอบ 2 ตัวอย่างสารสำคัญที่พบในกานพลู

งานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีดอกกานพลู สารสำคัญส่วนใหญ่ที่พบคือ eugenol พบเฉลี่ยประมาณ 82.3-91.4% รองลงมาคือ trans-β-caryophyllene พบ 6.3-12.7% และยังพบสารเคมีอีกหลายชนิดอาทิเช่น α-humulene, eugenyl acetate และ chavicol เป็นต้น [Bankar R, 2011] การศึกษาในห้องปฏิบัติการของสารสกัดจากการพลู 3 วิธี คือ การแช่ (infusion) การต้ม (decoction) และการใช้น้ำมันหอมระเหย (essential oil) โดยทำการเปรียบเทียบผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 10 สปีชีร์ ได้แก่ *Escherichia coli, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter aerogenes, Klebsiella ozaenae, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens, Salmonella typhi, Shigella dysentriae* และ *Vibrio cholerae* ใช้วิธี disc diffusion ผลการทดลองพบว่าสารสกัดที่ได้จากการแช่และต้มสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้มากที่สุดวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเท่ากับ 10.43 มิลลิเมตร และ 10.86 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อ *V. cholerae* ได้ดีที่สุด วัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเท่ากับ 23.75 มิลลิเมตร และยังเห็นผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *K. ozaenae, K. pneumoniae, S. marcescens, S. typhi* และ *S. dysentriae* ด้วย [Saeed S, Tariq P, 2008]

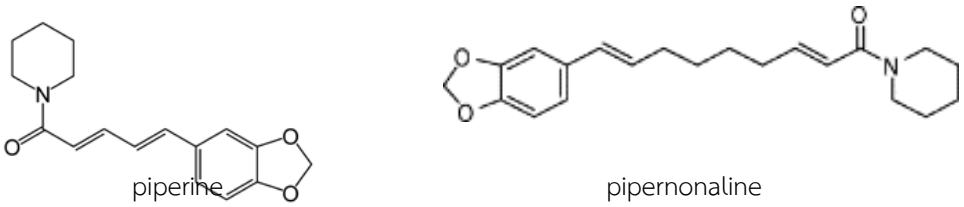
การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียในช่องปากพบว่าสารสกัดเมธานอลจากกานพลู ใช้ 96-well microtiter plates พบว่าสาร kaempferol ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปาก ได้แก่ *S. mutans, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia* และ *Actinomyces viscosus* โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC)มีค่าเท่ากับ 20-2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร [Cai L, 1996] การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างสารจากกานพลูโดยใช้น้ำและเมธานอลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด มีผลต่อการยึดเกาะของ *S. mutans* ที่ความเข้มข้น 5-15 มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร และนอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากกานพลูมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์กลูแคนของ *S. mutans* ด้วย [Rahim ZHA, Khan HBSG, 2006]

2.7.2 ดีปลี

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Piper retrofractum* Vahl.

ชื่อท้องถิ่น : ดีปลีเชือก (ภาคใต้) ประดงข้อ ปานนุ (ภาคกลาง)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ดีปลีเป็นไม้เถา รากฝอยออกบริเวณข้อเพื่อยึดพยุงลำต้น ใบเดี่ยวรูปไข่ แกมขอบขนาน ใบเขียวเข้ม ผิวใบมัน กว้าง 3-5 เซนติเมตร ยาว 7-10 เซนติเมตร ดอกช่อออกที่ช่อใบ ดอกย่อยอัดแน่น ผลเป็นผลสด ผลอ่อนสีเขียว เมื่อสุกจะเปลี่ยนเป็นสีแดง ใช้ผลแก่จัดเป็นยา ตากแดดให้แห้ง มีรสเผ็ดร้อน ใช้บำรุงธาตุ ขับลม และแก้จุกเสียด



ภาพประกอบ 3 ตัวอย่างสารสำคัญที่พบในดีปลี

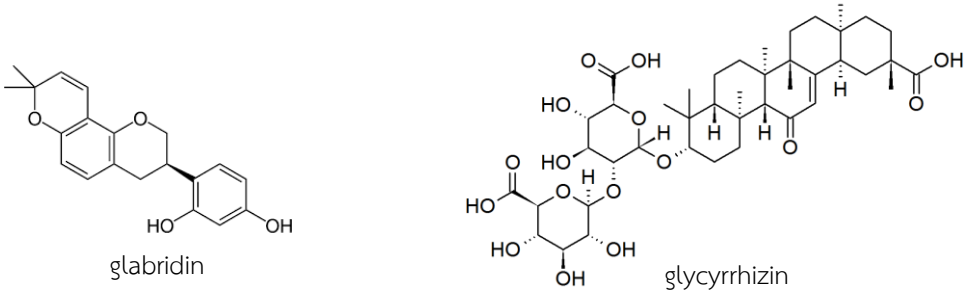
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของในผลของดีปลีพบสารในกลุ่ม alkaloid ที่สำคัญได้แก่ piperine, pipernonaline และ dehydropipernonaline [Kim KJ, et al. 2011] นอกจากนี้ยังมีน้ำมันหอมระเหยด้วย การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลของดีปลีสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylcoccus albus, Salmonella typhi, P. aeruginosa, E.coli, Bacillus megaterium* และ *Aspergillus niger* [Khan M, Siddiqui M, 2007] เมื่อนำสารสกัดเมธานอลของดีปลีมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ซึ่งมักพบปนเปื้อนในอาหารและก่อโรคอาหารเป็นพิษ การศึกษาพบว่าสารสกัดจากดีปลีสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้ได้ดีอีกด้วย [Stonsaovapak S, Saiyudthong S, 2010]

2.7.3 ชะเอมเทศ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Glycyrrhiza glabra* Linn.

ชื่อท้องถิ่น : ชะเอมป่า ส้มป่อยหวาน(ภาคเหนือ) ตาลอ้อย(ตราด)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ชะเอมเทศมีลำต้นสูงประมาณ 1-1.7 เมตร มีเหง้าใต้ดิน แผ่ขยายขนานกับพื้นดิน รากเป็นรูปกระสวย ต้นบนดินจะแตกกิ่งก้าน ใบประกอบ แผ่นใบเป็นรูปไข่ ปลายใบแหลม ใบมีสีเหลืองอ่อน ดอกช่อ ผลเป็นฝักแบน ภายในมีเมล็ดรูปไตหลายเมล็ด ใช้เหง้าและรากเป็นยา มีรสอมหวาน ค่อนข้างเย็นเล็กน้อย มีสรรพคุณระบายความร้อน ขับพิษ รากแก้กระหายน้ำ เป็นยาระบาย เนื้อไม้ขับเสมหะ แก้ไอ รักษาเลือดออกตามไรฟัน ดอกช่วยย่อยอาหาร



ภาพประกอบ 4 ตัวอย่างสารสำคัญที่พบในชะเอมเทศ

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพบว่าสารสกัดจากรากชะเอมเทศที่ชื่อว่า glabridin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium tuberculosi* [Gupta VK, et al. 2008] ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรควัณโรค เชื้อ*Helicobacter pylori* [Fukai T, et al. 2002a] และ *Staphylococcus aureus* [Fukai T, et al. 2002b] เชื้อก่อโรคทางเดินอาหารและทางเดินหายใจ การศึกษาพบว่าสาร polysaccharides ที่สกัดจากรากชะเอมเทศมีผลลดการยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* กับเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารในหลอดทดลองด้วย [Wittschier N, et al. 2009] สารสำคัญในชะเอมเทศชื่อ glycyrrhizin มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส ได้แก่ Herpes

zoster, Herpes simplex และ Varicella zoster [Hirabayashi K, et al. 1991; Kumar A, Dora J, 2012; Partridge M, Poswillo DE, 1984; Hoever G, et al. 2005]

งานวิจัยที่เกี่ยวกับแบคทีเรียที่ก่อโรคฟันผุ พบว่าสารสกัดเอทานอลของรากชะเอมเทศสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* และ *S. sanguis* ที่ MIC และ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อ *S. salivarius* ที่ MIC และ MBC เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mitis* และ *Lactobacillus acidophilus* ที่ MIC และ MBC เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร [Geetha RV, Anitha R, 2012] glycyrrhizin มีผลต่อลดการยึดเกาะและยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. mutans* [Hwang J, et al. 2004]

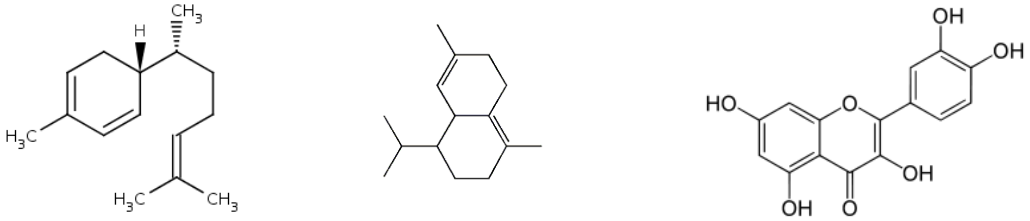
2.7.4 ฝรั่ง

ชื่อวิทยาศาสตร์*: Psidium guajava* L.

ชื่อท้องถิ่น : มะมั่น มะก้วย (ภาคเหนือ) ยามู ย่าหมู (ภาคใต้) บักสีดา (ภาคะวันออกเฉียงเหนือ) มะปุ่น (สุโขทัย, ตาก) มะแกว (แพร่) ชมพู่ (ปัตตานี)

ฝรั่งเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก กิ่งอ่อนมีเหลี่ยม ใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามกัน รูปวงรี กว้าง 3-8 เซนติเมตร ยาว 6-14 เซนติเมตร ดอกออกเดี่ยวหรือช่อละ 2-3 ดอก กลีบดอกสีขาว มีเกสรตัวผู้จำนวนมาก ผลมีหลายรูปร่างตั้งแต่กลมถึงรูปกลมรียาว เนื้อข้างในสีนวล สีแดง มีเมล็ดจำนวนมากส่วนที่ใช้เป็นยาใช้ใบแก่สด หรือผลอ่อน มีฤทธิ์ฝาดสมาน แก้ท้องเสีย ใบฝรั่งมีสรรพคุณระงับกลิ่นปาก ใช้ใบสด 2-3 ใบ เคี้ยวและคายทิ้งหลังรับประทานอาหาร

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในใบฝรั่งพบสารหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นน้ำมันหอมระเหย อาทิเช่น alpha-pinene, beta-pinene, limonene, menthol, terpenyl acetate, isopropyl alcohol, longicyclene, caryophyllene, beta -bisabolene, caryophyllene oxide, beta-copanene, farnesene, humulene, selinene, cardinene , curcumene, quercetin, guavanoic acid, kaempferal เป็นต้น เปลือก พบ tannin เป็นส่วนใหญ่ประมาณ 12-30% นอกจากนี้ยังพบสาร resin และ calcium oxalate ด้วย ในส่วนของรากพบสาร tannin มากเช่นเดียวกับเปลือก และสารอื่นๆ เช่น leukocyanidins, sterols, gallic acid เป็นต้น [Gutirrez RMP, et al. 2008]



curcumene cardinene quercetin

ภาพประกอบ 5 ตัวอย่างสารสำคัญที่พบในฝรั่ง

ฝรั่งเป็นพืชที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย อาทิเช่น ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย แก้ท้องเสีย แก้ไอ และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น [Gutirrez RMP, et al. 2008] ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียพบว่าสารสกัดจากเปลือกต้นฝรั่งที่สกัดด้วยน้ำและเมธานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Bacillus subtilis, S. aureus, E. coli, P. aeruginosa* [Abdelrahim SI, et al. 2002] สารสกัดใบฝรั่งที่ใช้

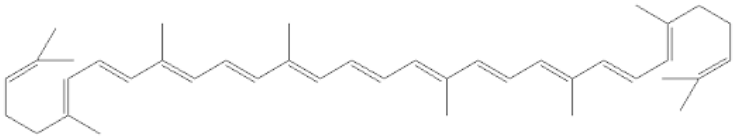
น้ำ , เมธานอล และคลอโรฟอร์มในการสกัด พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* และ β *-streptococcus group A* [Jaiarj P, et al. 1999] การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียในช่องปากพบว่าสารสกัดจากใบฝรั่งใช้วิธีการต้มในน้ำ (decoction) สามารถยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรีย *S. sanguinis, S. mitis* และ *Actinomyces* sp. กับผิวฟันได้ ซึ่งเป็นขั้นเริ่มต้นของการพัฒนาไปเป็นคราบจุลินทรีย์ [Razak FA, Rahim ZH, 2003; Razak FA, et al. 2006; Fathilah AR, et al. 2009a; Fathilah AR, et al. 2009b; Fathilah AR, 2011] โดยพบว่าสารสกัดจากใบฝรั่งมีผลกับ hydrophobic bonding สามารถลดการยึดเกาะของแบคทีเรียได้ที่ความเข้มข้นของสารสกัดฝรั่ง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร [Razak FA, Rahim ZH, 2003; Razak FA, et al. 2006; Fathilah AR, 2011] และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้น การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก็ยิ่งมีประสิทธิภาพมากขึ้นตามไปด้วย [Razak FA, Rahim ZH, 2003] การศึกษาโดยใช้สารสกัดความเข้มข้นที่ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างรูปร่างของแบคทีเรีย มีผลรบกวนกระบวนการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย และมีผลลดขนาดเซลล์ของแบคทีเรีย [Fathilah AR, et al. 2009a] การทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion (BHI) พบว่าสารสกัดจากใบฝรั่งที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้ได้ [Fathilah AR, et al. 2009b; Fathilah AR, 2011] มีค่า MIC เท่ากับ 2.61-4.69 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร [Fathilah AR, 2011] ผลยับยั้งเชื้อ *S. mutans* การศึกษาในหลอดทดลองพบว่า สารสกัดจากฝรั่งที่ใช้ 50% หรือ 90% เอทานอล เป็นตัวทำละลายมีผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อชนิดนี้กับผิวฟัน [Limsong J, et al. 2004] สารสกัดที่ใช้ เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลายสามารถยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อ disc วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเท่ากับ 20 มิลลิเมตร และเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อ disc มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเท่ากับ 18 มิลลิเมตร [Jebashree HS, et al. 2011]

2.7.5 ฟักข้าว

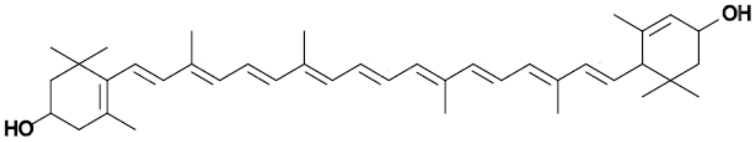
ชื่อวิทยาศาสตร์*: Momordica cochinchinensis* Spreng

ชื่อท้องถิ่น : ขี้กาเครือ (ปัตตานี) ผักข้าว (ตาก ภาคเหนือ) มะข้าว (แพร่) แก็ก (Gac เวียดนาม)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ฟักข้าวเป็นไม้เถาเลื้อย เถาสีเขียวอมเหลือง เถาแก่มีข้อโปนออก เป็นปุ่ม ผิวของเถาจะมีเม็ดสีขาวเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไป เจริญเติบโตมากน้อยขึ้นกับแหล่งที่ปลูก เส้นผ่าศูนย์กลางของเถา 0.5 - 1 เซนติเมตร ใบเป็นใบเดี่ยว รูปร่างคล้ายใบโพธิ์ ตัวใบแบ่งเป็น 3 ช่วง สีเขียว เส้นผ่าศูนย์กลางของใบประมาณ 10 - 20 เซนติเมตร ยาว 5 - 10 เซนติเมตร ดอกเป็นดอกแยกเพศ คือ ดอกตัวผู้และดอกตัวเมีย ดอกตัวผู้สีเหลือง มีกลีบดอก 5 กลีบ กลีบรูปไข่ยาวประมาณ 5 - 7 เซนติเมตร ดอกตัวเมียเล็กกว่า ผลรูปร่างกลมรี เนื้อแน่นฉ่ำน้ำ มีหนามเล็กขนาด 3 - 4 มิลลิเมตร อยู่บริเวณผิวรอบผล ผลยาว 10 - 15 เซนติเมตร กว้าง 6 - 10 เซนติเมตร ผลดิบสีเหลือง ผลสุกสีแดงหรือแดงส้ม เมล็ดรูปไข่ ใช้รากเป็นยามีรสเย็น สรรพคุณถอนพิษทั้งปวง ดับพิษไข้ทั้งปวง ใบใช้ถอนพิษปรุงเป็นยาเขียว เมล็ดมีสรรพคุณบำรุงปอด ยอดอ่อนและผลอ่อนรับประทานเป็นอาหารช่วยบรรเทาความร้อนในร่างกายได้



lycopene



lutein

ภาพประกอบ 6 ตัวอย่างสารสำคัญที่พบในฟักข้าว

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในใบฟักข้าวมีสารสำคัญกลุ่ม saponin และ phenolic compound เช่นเดียวกับที่พบในเมล็ดและราก [Iwamoto M, et al. 1985a; Iwamoto M, et al. 1985b] ส่วนผลสารที่พบมากคือ lycopene, beta-carotene, lutein และ phenolic compounds เปลือกหุ้มเมล็ดพบ lycopene และ beta-carotene มากกว่าส่วนเปลือก [Kubola J, Siriamornpun S, 2011] การศึกษาพบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบฟักข้าวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคกลากได้แก่ *Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes, Microsporum gypseum, Epidermophyton floccosum* มีค่า MIC เท่ากับ 78.12–312.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอล และเอทิลอะซิเตทยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. aureus* และ *S. pyogenes* MIC เท่ากับ 625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 4 ชนิดดังกล่าวข้างต้น ที่ MIC เท่ากับ 156.25 – 312.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร [บงกชวรรณ สุตะพาหะ, บรรยง คันธวะ, 2554] การศึกษาพบสารเคมีในใบฟักข้าวคือ momordica triterpenoid ester มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* และ *Candida albicans* [Nantachit K, Tuchinda P, 2009] ส่วนงานวิจัยเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคฟันผุยังขาดข้อมูลการวิจัย

2.8 น้ำยาบ้วนปาก

ผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปาก หมายถึง สารละลายที่ใช้อมกลั้วคอหลังอาหารและมีการบ้วนทิ้ง หรืออาจใช้เวลาอื่นเมื่อต้องการ จุดประสงค์ของการใช้ทางเครื่องสำอาง คือ เพื่อกลบหรือขจัดกลิ่นปาก ช่วยทำให้ลมหายใจและกลิ่นปากสะอาด สดชื่นขึ้น

การประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปาก

2.8.1 การประเมินลักษณะทั่วไป สังเกตสี กลิ่น รส ความใส และการวัดความเป็นกรด ด่าง (pH)

2.8.2 ความคงตัวของตำรับ การทดสอบความคงตัวนิยมกระทำ คือ การทดสอบแบบเร่ง ซึ่งทำโดยการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่จะทดสอบที่อุณหภูมิแตกต่างกัน จากนั้นจึงทดสอบคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่ง

2.8.2.1 เก็บที่อุณหภูมิ 45°C หรือ 50°C เป็นเวลา 2-3 เดือน

2.8.2.2 เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-18 เดือน

2.8.2.3 เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C เป็นเวลา 1 เดือน

2.8.2.4 ผ่าน Freeze thaw cycle โดยการเก็บที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ 8°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สลับกันจำนวน 6-8 รอบ

2.8.2.5 ผ่านการปั่นเหวี่ยง 2,000-3,000 รอบ ต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

2.8.2.6 ผ่านการเขย่า 60 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

จากนั้นสังเกตการณ์แยกชั้น การเปลี่ยนแปลงสี กลิ่น ตะกอน และ pH ซึ่งอาจเลือกทำในหลายสภาวะเพื่อเป็นการยืนยันการทดสอบความคงตัวน้ำยาบ้วนปาก

จากการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง จะเห็นได้ว่ามีสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ดังนั้นการคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ดังกล่าวมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปาก จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะและเป็นการช่วยป้องกันโรคทางทันตสาธารณสุข [พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2543]

ส่วนที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (experimental study) เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบฝรั่ง ดอกดีปลี ดอกกานพลู รากชะเอมเทศและผลฟักข้าวในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ในห้องปฏิบัติการ และคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์มาพัฒนาเป็นตำรับน้ำยาบ้วนปาก ซึ่งผู้วิจัยได้แบ่งหัวข้อในการดำเนินการวิจัย ดังนี้

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ

3.2 ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย

3.3 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

3.4 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

3.5 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ agar disc diffusion

3.6 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

3.7 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถฆ่าเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

3.8 การทดสอบประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร

- 3.8.1 การทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี double disc diffusion
- 3.8.2 การทดสอบด้วยวิธี checkerboard dilution

3.9 การเตรียมผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากจากสารสกัดสมุนไพร

3.10 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร

3.11 การทดสอบความคงตัวของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร

3.12 การทดสอบผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรในอาสาสมัคร

- 3.12.1 การทดสอบความปลอดภัยเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพร
- 3.12.2 การทดสอบความพึงพอใจของอาสาสมัครต่อผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพร

3.13 การศึกษาผลของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อหน่วยเวลา (time-kill curve assay)

3.14 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดสมุนไพร

3.15 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ

3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1, กระดาษกรอง 0.45 ไมครอน, กระบอกตวง, กรวยกรอง, จานเพาะเลี้ยงเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร, ช้อนตักสาร, แท่งแก้วคนสาร, บีกเกอร์, ปิเปต, หลอดทดลอง, ห่วงถ่ายเชื้อ, Micropipette และ Pipette tip, ตะเกียงแอลกอฮอล์,

ไม้พันสำลี, Paper disc, ขวดแก้ว, เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง(Sartorius LE 2445, Germany), เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Sartorius LE 2445, Germany), Vortex mixture (Biosan, Thailand) UV-VIS spectrophotometer (Jasco V530, Japan), Rotary evaporator(Buchi V700, Switzerland), Freeze dryer (Crist Alpha1-4, Germany), Autocave(Sanyo MSL-3780, Japan), Hot air oven (Contherm Thermotec 2000, Australia), Incubator with 5% Co_2 (Thermo Fisher Scientific, U.S.A), pH meter (Eutech instrument, Singapore), Shaking incubator (JS research inc., Korea)

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ 95% Ethanol(The Exicise Department, Ministry of Finance, Thailand), sodium chloride (Merck, Germany), Chlorhexidine gluconate 0.2 %(Sigma, U.S.A), Propylene glycol(Sigma, U.S.A), Glycerin(Sigma, U.S.A), Sorbital(Sigma, U.S.A), Peppermint oil(P.C. Drug center, Thailand), Menthol(ดีแลบซัพพลาย, Thailand), Dimethyl sulfoxide, DMSO(Carlo erba reagent, France), Brain heart infusion, BHI (Becton Dickinson and company, France)

3.1.3 เชื้อสำหรับทดสอบ

Streptococcus mutans DMST 18777 (Department of Medical Sciences, Thailand)

3.2 ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3 ตัวอย่างพืชสมุนไพร

ชนิดพืชสมุนไพร	ส่วนที่ใช้	แหล่งที่มา
กานพลู (*Syzygium aromaticum* Linn.)	ดอก	ร้านเอ๊ียแซ อ.เมือง จ.อุบลราชธานี
ดีปลี (*Piper retrofractum* Vahl.)	ดอก	ร้านเอ๊ียแซ อ.เมือง จ.อุบลราชธานี
ชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* Linn.)	ราก	ร้านเอ๊ียแซ อ.เมือง จ.อุบลราชธานี
ฝรั่ง (*Psidium guajava* L.)	ใบ	จาก อ.กุดชุม จ.ยโสธร
ฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis* Spreng)	ผล	จาก อ.ท่าลาด จ.ยโสธร

3.3 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

3.3.1 นำสมุนไพรไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง จากนั้นบดเป็นผงด้วยเครื่องบด

3.3.2 ชั่งสมุนไพรอย่างละ 200 กรัม ใส่ในขวดแก้วที่มีฝาปิด เติม 95% เอธานอล โดยใช้อัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลายเป็น 1:10 คนวันละหลายๆครั้ง หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นกรองตัวอย่างสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

3.3.3 นำสารสกัดไประเหยด้วย rotary evaporator ก่อนทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ -20°C

3.4 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในตู้อบเชื้อที่มี 5% CO_2 ที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เจือจางเชื้อจุลชีพและปรับปริมาณเชื้อ โดยให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลาย McFarland No 0.5

3.5 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ด้วยวิธี agar disc diffusion [CLSI, 2012a]

3.5.1 ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในขวดเพาะเชื้อเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ที่เตรียมไว้ กดไม้พันสำลีข้างหลอด จากนั้นนำมาเกลี้ยบนผิวหน้าอาหาร BHI ให้ทั่ว วางไว้ให้แห้ง

3.5.2 ชั่งสารสกัดสมุนไพร 500 มิลลิกรัม ใส่ในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติมตัวทำละลายคือ 95% เอธานอล ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ได้สารสกัดความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.5.3 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารสกัดแต่ละชนิดปริมาตร 30 ไมโครลิตรลงบน paper disc ขนาดเส้นศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปวางบนผิวหน้าอาหารแข็ง BHI ที่ทำการเกลี่ยเชื้อไว้แล้ว ใช้คลอเฮกซิดีน 0.02% , ตัวทำละลาย 95% เอธานอล และน้ำกลั่น เป็นชุดควบคุม

3.5.4 นำจานอาหารไปเข้าตู้อบเลี้ยงเชื้อ 5% CO_2 ที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้ง

หมายเหตุ : แต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.6 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) [CLSI, 2012b]

3.6.1 ทำการเจือจางสารสกัดแบบสองเท่าลำดับส่วน (Serial two-fold dilution) โดยให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 5 % DMSO

3.6.2 เพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหาร BHI broth ปรับปริมาณเชื้อโดยให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลาย McFarland No 0.5

3.6.3 เติมสารลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ปริมาณสารที่เติมในหลอดทดลองที่ 1-10 ในการหาค่า MIC

สาร	ปริมาณที่เติม (มิลลิลิตร) ในหลอดทดลองที่									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
สารสกัดหรือ 5%DMSO หรือ 0.2% คลอเฮกซิดีน	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	-	-
BHI broth	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0
เชื้อที่ทดสอบ	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เติม

หมายถึง ทำการเจือจางแบบสองเท่าลำดับส่วน โดยเริ่มจากหลอดที่ 2 คือ ผสมสารสกัดสมุนไพรหรือ 5%DMSO และ BHI broth ให้เข้ากันดี ก่อนใช้ปิเปตดูดออกมา 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 3 จากนั้นผสมสารในหลอดที่ 3 ให้เข้ากันดี ดูดออกมา 1.0 มิลลิลิตรใส่หลอดที่ 4 แล้วทำต่อไปจนถึงหลอดที่ 8 เมื่อผสมสารให้เข้ากันดีแล้ว ดูดสาร1.0 มิลลิลิตรทิ้ง

3.6.4 นำไปเข้าตู้อบเลี้ยงเชื้อ 5% CO_2 ที่ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง อ่านผลการเกิดความขุ่นของเชื้อในหลอดทดลองด้วยตาเปล่าเทียบกับหลอดควบคุม (หลอดที่ 9 และ 10) ค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดในหลอดทดลองที่ไม่เกิดความขุ่น

หมายเหตุ: ในการทดลองเพื่อหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจะทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.7 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถฆ่าเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

หาค่า MBC โดยใช้วิธี drop plate หยดสารตัวอย่างที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจากข้อ 3.6 ลงบนจานอาหาร BHI โดยแต่ละจุดใช้ปริมาณ 0.01 มิลลิลิตร ตัวอย่างจะถูกปล่อยให้แห้งอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปเข้าตู้อบเลี้ยงเชื้อ 5% CO_2 ที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากสารสกัดจากสมุนไพรสามารถฆ่าเชื้อได้ก็จะแสดงผลลบคือไม่มีโคโลนีของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ปรากฏ ความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถฆ่าเชื้อได้คือค่า MBC

3.8 การทดสอบประสิทธิภาพร่วมกันของสารสกัดสมุนไพร

3.8.1 การทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี double disc diffusion [Moody J, 2004]

นำสารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ด้วยวิธี double disc diffusion มาทดสอบประสิทธิภาพร่วมกันเบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพรโดยทดสอบเป็นคู่

ตารางที่ 5 คู่ของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดทดสอบการเสริมฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ด้วยวิธี agar disc diffusion

ลำดับที่	สารสกัดสมุนไพรชนิดที่ 1	สารสกัดสมุนไพรชนิดที่ 2
1	กานพลู	ฝรั่ง
2	กานพลู	ชะเอมเทศ
3	กานพลู	เมล็ดฟักข้าว
4	ฝรั่ง	ชะเอมเทศ
5	ฝรั่ง	เมล็ดฟักข้าว
6	ชะเอมเทศ	เมล็ดฟักข้าว

3.8.1.1 ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในขวดเพาะเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ที่เตรียมไว้ กดไม้พันสำลีข้างหลอด จากนั้นนำมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร BHI ให้ทั่ว วางไว้ให้แห้ง

3.8.1.2 ใช้สารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสารสกัดแต่ละชนิดปริมาตร 30 ไมโครลิตรลงบน paper disc ขนาดเส้นศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปวางบนผิวหน้าอาหารแข็ง BHI ที่ทำการเกลี่ยเชื้อ โดยวางสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละคู่ที่ทดสอบห่างกันเล็กน้อย

3.8.1.3 นำจานอาหารไปเข้าตู้อบเลี้ยงเชื้อ 5% CO2 ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลอง อ่านผลโดยดูการเสริมฤทธิ์ของ inhibition zone ของแผ่น paper disc แต่ละคู่

3.8.2 การทดสอบด้วยวิธี checkerboard dilution [Moody J, 2004]

คัดเลือกคู่ของสารสกัดจากสมุนไพรจากการทดลองข้อ 3.8.1 ที่น่าจะเสริมฤทธิ์กัน มาทำการทดลองต่อ ดังนี้

3.8.2.1 ทำการทดลองคล้ายข้อ 3.6 โดยการทำการเจือจางสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดแบบ Serial two-fold dilution ที่ระดับความเข้มข้นแต่ละชนิดตั้งแต่ 4×MIC ถึง 1/10×MIC โดยใช้อัตราส่วนที่เท่ากันผสมในแต่ละความเข้มข้น

3.8.2.2 จากนั้นเติมเชื้อทดสอบโดยปรับปริมาณเชื้อโดยให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลาย McFarland No 0.5

3.8.2.3 นำไปเข้าตู้อบเลี้ยงเชื้อ 5% CO_2 ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการเกิดความขุ่นของเชื้อในหลอดทดลองด้วยตาเปล่าเทียบกับหลอดควบคุม อ่านผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้

3.8.2.4 ประเมินประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรด้วยดัชนีชี้วัดที่เรียกว่า fractional inhibitory concentration index (FICI) ดังสูตร

ค่า FICI = FIC(A) + FIC(B)

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

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

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

MIC(A) คือ ค่า MIC ของสาร A

MIC(B) คือ ค่า MIC ของสาร B

การแปลผล FICI : ≤ 0.5 = เสริมฤทธิ์กัน (synergy), 0.5 < FICI ≤ 4.0 = ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (indifference), > 4.0 = ฤทธิ์ต้านกัน (antagonism)

3.9 การเตรียมผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากจากสารสกัดสมุนไพร (ดัดแปลงจากบังอรและคณะ, 2549)

นำสารสกัดสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ โดยใช้ความเข้มข้น 2 เท่าของ MIC ของสารสกัดแต่ละชนิดมาผสมเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปาก โดยผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรมีส่วนประกอบรายละเอียดดังตาราง 6

ตาราง 6 ส่วนประกอบในตำรับน้ำยาบ้วนปากต่างๆ

ส่วนประกอบ	ปริมาตรในตำรับ (มิลลิลิตร)				
	ตำรับ 1	ตำรับ 2	ตำรับ 3	ตำรับ 4	ตำรับ 5
สารสกัดสมุนไพร กานพลู, ชะเอม, ฝรั่ง (2 X MIC)					
Ethanol	-	1	0.5	0.8	0.5
Glycerin	4	4	4	4	4
Menthol, 20%	-	-	0.1	0.1	0.1
Peppermint water	-	-	0.5	0.5	0.5
Clove oil in alc, 4%	-	0.1	-	-	-
Propylene glycol	4	3	3	3	3
Sodium chloride, 5%	2	-	3	1	1
Sorbitol	2	4	3	2	2
Water qs ad	50	50	50	50	50

วิธีการเตรียมตำรับน้ำยาบ้วนปาก

1. ชั่งน้ำหนักสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด คือ กานพลู ชะเอม และฝรั่ง

2. ละลายสารสกัดสมุนไพรใน Ethanol (อาจใช้การ sonicate เพื่อช่วยในการละลายสารสกัดสมุนไพรให้เร็วขึ้น)
3. เติม Glycerin และ Propylene glycol และคนผสมสารให้เข้ากัน
4. เติม Sodium chloride และ Sorbital และคนผสมสารให้เข้ากัน
5. เติม Menthol และ Peppermint water และคนผสมสารให้เข้ากัน
6. ปรับปริมาตรโดยใช้น้ำกลั่นให้ครบ 50 ml
7. นำสารผสมที่ได้ไปกรอง โดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน

3.10 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร

นำผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากที่คัดเลือก มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Broth dilution คล้ายกับการทดสอบข้อ 3.6 และเปรียบเทียบกับน้ำยาบ้วนปากที่มีขายในท้องตลาด

3.10.1 ทำการเจือจางตำรับน้ำยาบ้วนปากแบบสองเท่าลำดับส่วน (Serial two-fold dilution)

3.10.2 เพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหาร BHI broth ปรับปริมาณเชื้อโดยให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลาย McFarland No 0.5

3.10.3 นำไปเข้าตู้อบเลี้ยงเชื้อ 5% CO2 ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการเกิดความขุ่นของเชื้อในหลอดทดลองด้วยตาเปล่าเทียบกับหลอดควบคุม ค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของตำรับน้ำยาบ้วนปากในหลอดทดลองที่ไม่เกิดความขุ่น

หมายเหตุ: ในการทดลองเพื่อหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจะทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.11 การทดสอบความคงตัวของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร

แบ่งน้ำยาบ้วนปากออกเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 30 มิลลิลิตร นำไปทดสอบความคงตัวโดย

3.11.1 ผ่าน freeze thaw cycle โดยการเก็บที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ 8°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สลับกันจำนวน 6 รอบ

3.11.2 ผ่านการเขย่า 60 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากนั้นสังเกตการณ์แยกชั้น การเปลี่ยนแปลงสี กลิ่น ตะกอน และ pH แล้วนำน้ำยาบ้วนปากไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์อีกครั้ง

3.12 การทดสอบผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรในอาสาสมัคร

3.12.1 การทดสอบความปลอดภัยเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพร

กลุ่มตัวอย่าง

อาสาสมัครสุขภาพดี จำนวน 10 คน

เกณฑ์คัดเข้า (Inclusion criteria)

1. มีสุขภาพดี
2. อายุระหว่าง 20-40 ปี

เกณฑ์คัดออก (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัว เช่น เบาหวาน, ความดันโลหิตสูง, โรคของระบบหัวใจและหลอดเลือด, โรคไต, โรคที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน เป็นต้น
2. ผู้ที่เป็นโรคในช่องปาก หรือมีแผลภายในช่องปาก
3. ผู้ที่ตั้งครรภ์หรือกำลังให้นมบุตร
4. ผู้ป่วยที่มีอาการแทรกซ้อนอื่นๆที่อาจก่อให้เกิดอันตรายได้
5. ผู้ที่ไม่สามารถสื่อสารด้วยวิธีการฟัง พูด อ่าน เขียนภาษาไทยได้
6. ผู้ที่มีประวัติแพ้ ใบฝรั่ง, รากชะเอมเทศ, ดอกกานพลู รวมทั้งผู้ที่มีประวัติแพ้พืชสมุนไพรชนิดอื่นๆ
7. ผู้ที่ไม่เต็มใจหรือสมัครใจที่จะเข้าร่วมในการวิจัยจนสิ้นสุดการวิจัยและร่วมมือปฏิบัติตามแผนที่ผู้วิจัยแนะนำ

ข้อปฏิบัติสำหรับอาสาสมัคร

1. ก่อนการทดสอบผลิตภัณฑ์ให้อาสาสมัครบ้วนปากด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง
2. ให้อาสาสมัครอมน้ำยาบ้วนปากที่ทดสอบปริมาตร 15 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 วินาที แล้วบ้วนออก
3. ให้อาสาสมัครประเมินอาการผิดปกติที่เกิดขึ้นภายใน 30 นาที หลังจากใช้น้ำยาบ้วนปาก ได้แก่ การรับรสเปลี่ยนแปลง คันตามใบหน้าหรือร่างกาย คลื่นไส้อาเจียน แสบร้อนในช่องปาก ชาบริเวณปากและใบหน้า รวมทั้งให้รายงานถึงอาการผิดปกติอื่นๆ (ถ้ามี)
4. หลังการทดสอบผลิตภัณฑ์ให้อาสาสมัครบ้วนปากด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง
5. ให้อาสาสมัครใช้น้ำยาบ้วนปากวันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 1 สัปดาห์
6. หากมีอาการระคายเคืองหรือความผิดปกติต่อร่างกายในขณะที่ทดสอบน้ำยาบ้วนปาก ให้อาสาสมัครหยุดการทดสอบทันที แจ้งให้ผู้วิจัยทราบ และบ้วนปากด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง หากอาการผิดปกติยังคงอยู่ให้รีบไปพบแพทย์ทันที

3.12.2 การทดสอบความพึงพอใจของอาสาสมัครต่อผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพร

การทดสอบความพึงพอใจของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่พัฒนาตำรับขึ้น (A) เปรียบเทียบกับน้ำยาบ้วนปากที่มีขายในท้องตลาด (B) การศึกษาเป็นแบบ single blind-test โดยให้อาสาสมัครอมน้ำยาบ้วนปากจำนวน 15 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 วินาที แล้วประเมินด้านความพึงพอใจต่อลักษณะทางกายภาพโดยรวม เช่น สี ตะกอนของผลิตภัณฑ์ ความพึงพอใจต่อรสชาติ ความพึงพอใจต่อกลิ่น ความสดชื่นหลังการบ้วนปาก อาการระคายเคืองบริเวณช่องปาก และประเมินความชอบโดยรวมต่อตำรับ การทดสอบความพึงพอใจของอาสาสมัครต่อผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุในงานวิจัยครั้งนี้ ได้ผ่านการพิจารณาโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เลขที่การรับรอง 282/2557

กลุ่มตัวอย่าง

อาสาสมัครสุขภาพดี จำนวน 50 คน

เกณฑ์คัดเข้า (Inclusion criteria)

1. มีสุขภาพดี
2. อายุระหว่าง 20-40 ปี

เกณฑ์คัดออก (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัว เช่น เบาหวาน, ความดันโลหิตสูง, โรคของระบบหัวใจและหลอดเลือด, โรคไต, โรคที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน เป็นต้น
2. ผู้ที่เป็นโรคในช่องปาก หรือมีแผลภายในช่องปาก
3. ผู้ที่ตั้งครรภ์หรือกำลังให้นมบุตร
4. ผู้ป่วยที่มีอาการแทรกซ้อนอื่นๆที่อาจก่อให้เกิดอันตรายได้
5. ผู้ที่ไม่สามารถสื่อสารด้วยวิธีการฟัง พูด อ่าน เขียนภาษาไทยได้
6. ผู้ที่มีประวัติแพ้ ใบฝรั่ง, รากชะเอมเทศ, ดอกกานพลู รวมทั้งผู้ที่มีประวัติแพ้พืชสมุนไพรชนิดอื่นๆ
7. ผู้ที่ไม่เต็มใจหรือสมัครใจที่จะเข้าร่วมในการวิจัยจนสิ้นสุดการวิจัยและร่วมมือปฏิบัติตามแผนที่ผู้วิจัยแนะนำ

ข้อปฏิบัติสำหรับอาสาสมัคร

1. ก่อนการทดสอบผลิตภัณฑ์ให้อาสาสมัครบ้วนปากด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง
2. ให้อาสาสมัครอมน้ำยาบ้วนปากที่ทดสอบปริมาตร 15 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 วินาที แล้วบ้วนออก
3. ให้อาสาสมัครประเมินความพึงพอใจ ด้านสี ความใส รสชาติ กลิ่น ความสดชื่นหลังการบ้วนปาก อาการระคายเคือง
4. หลังการทดสอบผลิตภัณฑ์ให้อาสาสมัครบ้วนปากด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง
5. หากมีอาการระคายเคืองหรือความผิดปกติต่อร่างกายในขณะที่ทดสอบน้ำยาบ้วนปาก ให้อาสาสมัครหยุดการทดสอบทันที แจ้งให้ผู้วิจัย และบ้วนปากด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง
6. หากอาการระคายเคืองหรือความผิดปกติยังไม่หายไปภายใน 15 นาที อาสาสมัครจะถูกนำส่งไปรับการรักษายังสถานพยาบาลทันที โดยจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่คิดมูลค่า
7. อาสาสมัครจะต้องทำการทดสอบผลิตภัณฑ์จำนวน 2 ตำรับ โดยแยกทดสอบเป็นจำนวน 2 ครั้ง ห่างกันเป็นระยะเวลา 1 วัน

3.13 การศึกษาผลของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อหน่วยเวลา (time-kill curve assay)

3.13.1 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยปรับปริมาณเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลาย McFarland No 0.5

3.13.2 นำตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรมาผสมกับเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ที่เตรียมไว้ อัตราส่วน 1:1 กลุ่มควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth แทนสารทดสอบ

3.13.3 นำหลอดทดลองที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เก็บตัวอย่าง 0, 30 วินาที, 1 นาที, 3 นาที, 1, 2, 4 และ 8 ชั่วโมง นำมาทำการเจือจางลำดับส่วนด้วย 0.9 % NaCl แล้ว spread plate บนอาหาร BHI agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.13.4 นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น แล้วนำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและปริมาณเชื้อ

3.14 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดสมุนไพร

3.14.1 การหาองค์ประกอบทางเคมีกลุ่ม flavonoids และ phenolic compounds ด้วย HPLC

1) ใช้ RP-HPLC, C12 column
2) เตรียมสารมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 µg/l และสารตัวอย่างที่จะทดสอบเตรียมที่ความเข้มข้น 1 mg/ml โดยใช้ตัวทำละลาย methanol เกรด HPLC กรองสารตัวอย่างที่เตรียมได้ด้วยตัวกรองขนาด 0.45 micron ปริมาตรการฉีด 10 µl
3) ใช้อัตราการไหล 1.0 ml/min ระบบตัวทำละลายประกอบด้วย acetonitrile และน้ำที่มี 0.01% trifluoroacetic acid
4) เริ่มต้นระบบด้วย 20% acetonitrile และค่อยเพิ่มเป็น 25% acetonitrile ที่ 5 นาที คงระดับไว้ได้ถึง 10 นาที
5) จากนั้นเพิ่มเป็น 30% acetonitrile ที่ 12 นาที และเป็น 40% acetonitrile ที่ 15 นาที
6) จากนั้นลดลงเป็น 30% acetonitrile ที่ 22 นาที และสุดท้ายเป็น 20% acetonitrile ที่ 27 นาที
7) สแกนสเปคตรัมที่ระหว่าง 200 ถึง 700 nm บันทึกข้อมูลที่ 280 nm

3.15 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard error of means; SEM)

วัดระดับคะแนนแบบสอบถามความพึงพอใจของน้ำยาบ้วนปาก ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS 19 ใช้การวิเคราะห์สถิติ Independent sample Student’s t-test หรือ Mann-Whitney U

ส่วนที่ 4

ผลการวิจัย

ฤทธิ์ของสารสกัดจากใบฝรั่ง ดอกดีปลี ดอกกานพลู รากชะเอมเทศและผลฟักข้าวในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ในห้องปฏิบัติการ และคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์มาพัฒนาเป็นตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร ผู้วิจัยได้นำเสนอผลการวิจัยตามลำดับ ดังนี้

4.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

4.2 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร

4.3.1 การทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี double disc diffusion

4.3.2 การทดสอบด้วยวิธี checkerboard dilution

4.4 ผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากจากสารสกัดสมุนไพร: ตำรับที่เตรียมได้และคุณสมบัติของแต่ละตำรับได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ และความคงตัวของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร

4.5 การทดสอบผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรในอาสาสมัคร

4.6 การศึกษาผลของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อหน่วยเวลา (time-kill curve assay)

4.7 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดสมุนไพร

4.7.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีกลุ่ม flavonoids และ phenolic compounds ด้วย HPLC

4.7.2 การหาองค์ประกอบทางเคมีด้วย LC-MS

4.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

จากการนำสมุนไพรมาสกัดด้วย 95% เอทานอล ในอัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลายเป็น 1:10 หลังจากนั้นนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ก่อนทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer จนได้สารสกัดหยาบ (crude extract) แล้วจึงนำมาคำนวณหาร้อยละผลผลิต ร้อยละผลผลิตและลักษณะของสารสกัดที่ได้แตกต่างกันขึ้นกับสมุนไพรแต่ละชนิด ดังแสดงในตาราง 7

$$\text{ร้อยละผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักสารหลังสกัด}}{\text{น้ำหนักผงสมุนไพร}} \times 100$$

ตารางที่ 7 ร้อยละผลผลิตของการสกัดสมุนไพร

สมุนไพร	ส่วนที่ใช้	ลักษณะสารสกัด	ร้อยละผลผลิต (%w/w)
กานพลู	ดอก	สารสีน้ำตาลอ่อนข้นหนืด	21.1
ดีปลี	ดอก	สารสีน้ำตาลส้มข้นหนืด	7.6
ชะเอมเทศ	ราก	ผงแห้ง สีน้ำตาลเข้ม	14.5
ฝรั่ง	ใบ	ผงแห้ง สีเขียวเข้ม	10.9
ฟักข้าว	เปลือก	สารสีส้มแดงข้นหนืด	4.6
	เยื่อหุ้มเมล็ด	สารสีแดงข้นหนืด	17.9
	เมล็ด	สารสีเหลืองอ่อนข้นหนืด	8.1

4.2 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

4.2.1 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ด้วยวิธี agar disc diffusion

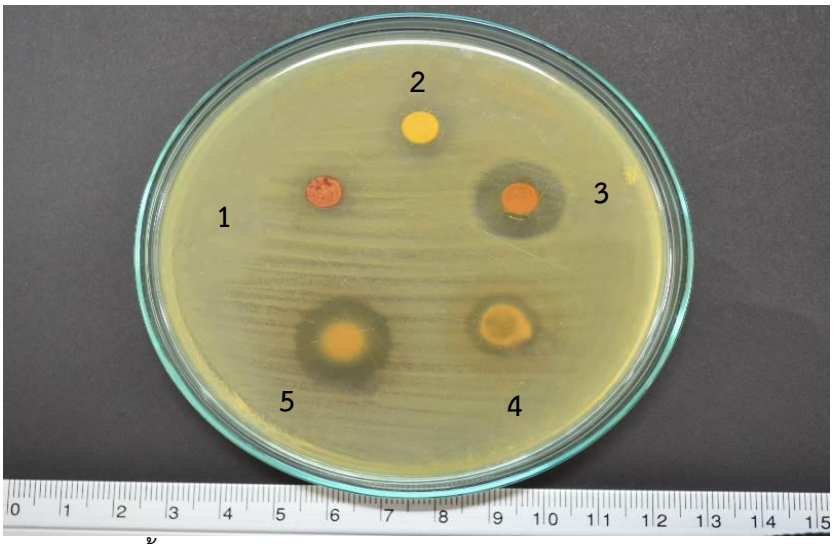
นำสารสกัดของพืชแต่ละชนิดที่ปริมาณ 15 มิลลิกรัมต่อแผ่น มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ พบว่าสารสกัดจากดอกกานพลูสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้มากที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 16.7±0.5 มิลลิเมตร รองลงมาคือรากชะเอมเทศ ใบฝรั่ง และเมล็ดฟักข้าว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเฉลี่ย คือ 16.3±0.5, 12.0±1.0 และ 11.0±0.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดจากดอกดีปลีสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เล็กน้อย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 6.7±0.5 มิลลิเมตร ส่วนสารสกัดจากเยื้อหุ้มเมล็ดและเปลือกของฟักข้าว พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ได้ (ตารางที่ 8 และภาพประกอบ 7-9)

ตารางที่ 8 การยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์โดยสารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ ด้วยวิธี agar disc diffusion

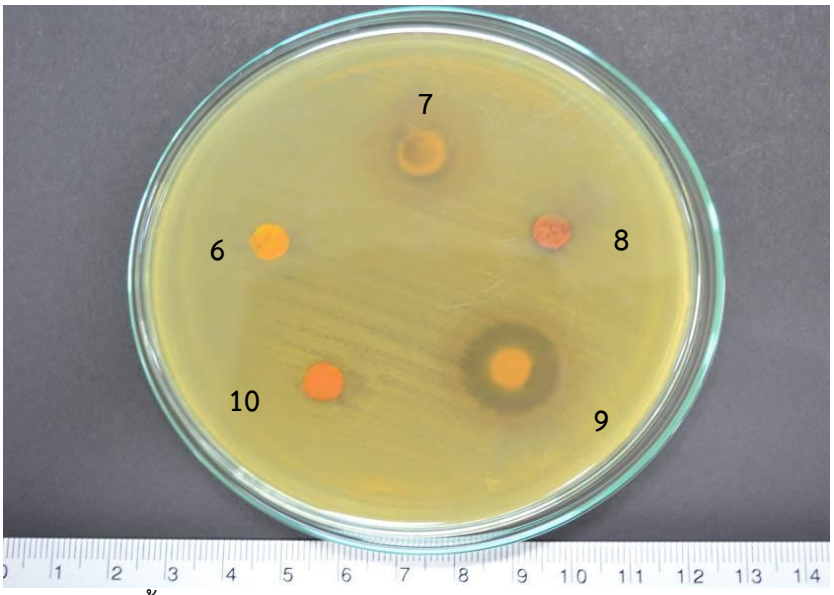
สมุนไพร	ส่วนที่ใช้	เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)
กานพลู	ดอก	16.7±0.5
ดีปลี	ดอก	6.7±0.5
ชะเอมเทศ	ราก	16.3±0.5
ฝรั่ง	ใบ	12.0±1.0
ฟักข้าว	เปลือก	ไม่พบ
	เยื่อหุ้มเมล็ด	ไม่พบ
	เมล็ด	11.0±0.0

คลอเฮกซิดีนความเข้มข้น 0.2% สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเฉลี่ย คือ 26.3±0.5 มิลลิเมตร ขณะที่ตัวทำละลาย 95% เอทานอล และน้ำกลั่นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ (ภาพประกอบ 9)

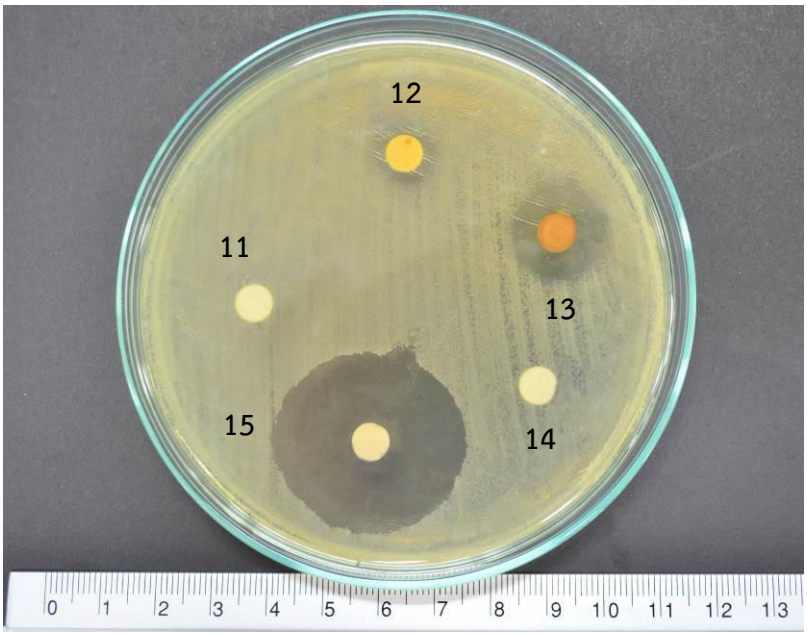
จากผลการทดลองดังกล่าวจึงได้คัดเลือกสารสกัดจาก ดอกกานพลู รากชะเอมเทศ ใบฝรั่ง และเมล็ดฟักข้าวมาทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป ส่วนสารสกัดจากดอกดีปลีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเล็กน้อยจึงคัดเลือกออกจากการศึกษา



ภาพประกอบ 7 การยับยั้งการเจริญของ *S. mutans* DMST 18777 โดย 1=สารสกัดดีปลี 2=สารสกัดเมล็ดฟักข้าว 3=สารสกัดชะเอมเทศ 4=สารสกัดฝรั่ง 5=สารสกัดกานพลู



ภาพประกอบ 8 การยับยั้งการเจริญของ *S. mutans* DMST 18777 โดย 6=สารสกัดเปลือกฟักข้าว 7=สารสกัดฝรั่ง 8=สารสกัดดีปลี 9=สารสกัดกานพลู 10=สารสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว



ภาพประกอบ 9 การยับยั้งการเจริญของ *S. mutans* DMST 18777 โดย 11=95% เอทานอล 12=สารสกัดเมล็ดฟักข้าว 13=สารสกัดชะเอม 14=น้ำกลั่น 15=0.2% คลอเฮกซิดีน

4.2.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ (MIC, MBC)

นำสารสกัดสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ได้ซึ่งทดสอบด้วยวิธี agar disc diffusion ได้แก่ สารสกัดจากดอกกานพลู รากชะเอมเทศ ใบฝรั่งและเมล็ดฟักข้าว (จากข้อ 4.2) มาหาค่า MIC ด้วยวิธีการ broth dilution พบว่าสารสกัดจากรากชะเอมเทศให้ค่า MIC เท่ากับ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ดอกกานพลูและใบฝรั่งให้ค่า MIC เท่ากับ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมล็ดฟักข้าวมีค่า MIC สูงที่สุดคือ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตาราง 8

จากการทดลองหาค่า MIC นำหลอดที่ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อไปหาค่า MBC โดยใช้วิธี drop plate บนอาหาร BHI agar การทดลองใช้สารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 5%DMSO เป็นความเข้มข้นเริ่มต้นในการทดลองและทำการเจือจางแบบสองเท่าลำดับส่วน พบว่าสารสกัดจากรากชะเอมเทศให้ค่า MBC ต่ำสุด เท่ากับ 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ดอกกานพลู ใบฝรั่งและเมล็ดฟักข้าวมีค่า MBC มากกว่า 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนคลอเฮกซิดีนมีค่า MIC และ MBC น้อยกว่า 0.00156 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถฆ่าเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ได้ (MBC)

พืชสมุนไพร/สารเคมี	ส่วนที่ใช้	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
		MIC	MBC
กานพลู	ดอก	1.56	>12.50
ชะเอมเทศ	ราก	0.19	3.12
ฝรั่ง	ใบ	1.56	>12.50
ฟักข้าว	เมล็ด	6.25	>12.50
คลอเฮกซิดีน	-	< 0.00156	< 0.00156

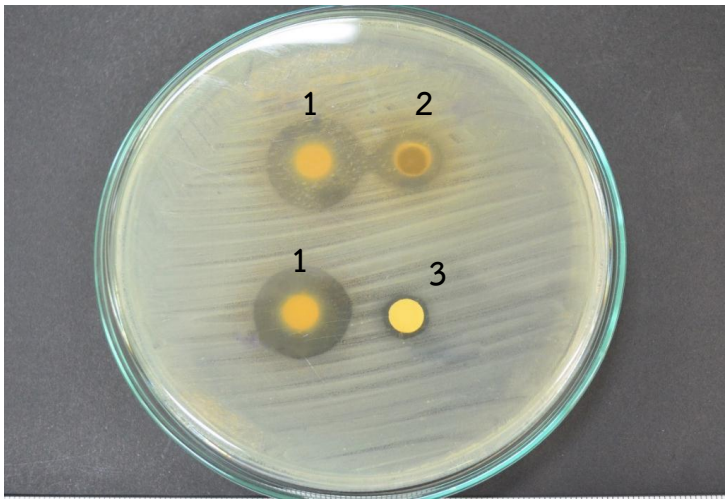
4.3 การทดสอบประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร

4.3.1 การทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี double disc diffusion

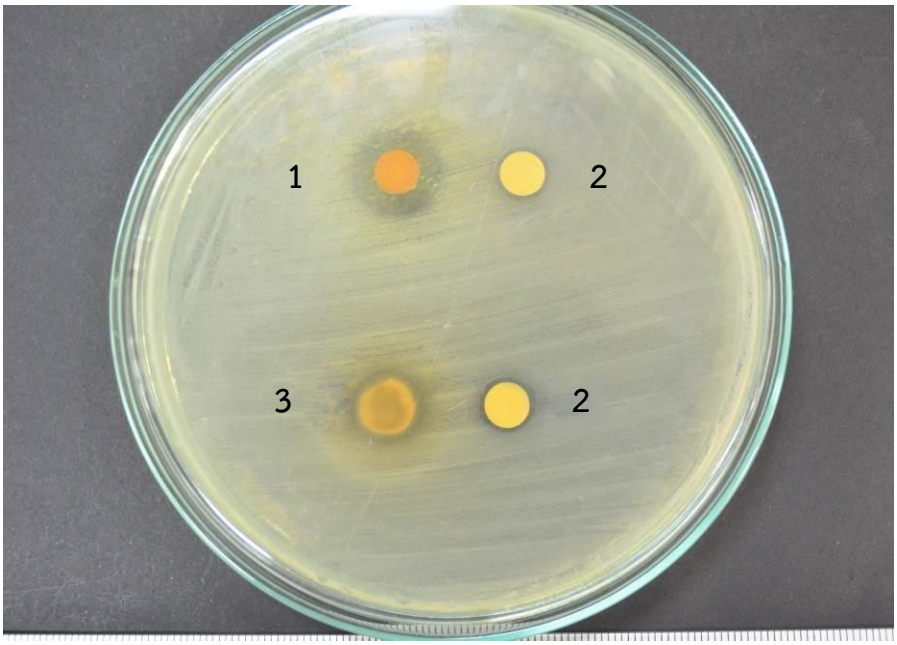
ทำการจับคู่สมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพร่วมกันของสารสกัดสมุนไพร ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากดอกกานพลูและใบฝรั่งพบวงใสยับยั้งของสารสกัดดังกล่าวร่วมกัน ดังตารางที่ 10 และภาพประกอบ 10-12 ดังนั้นจึงได้คัดเลือกมาใช้ทดสอบยืนยันประสิทธิภาพร่วมกันของสารสกัดดังกล่าวด้วยวิธี checkerboard dilution

ตารางที่ 10 ผลการทดลองการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด ด้วยวิธี double disc diffusion

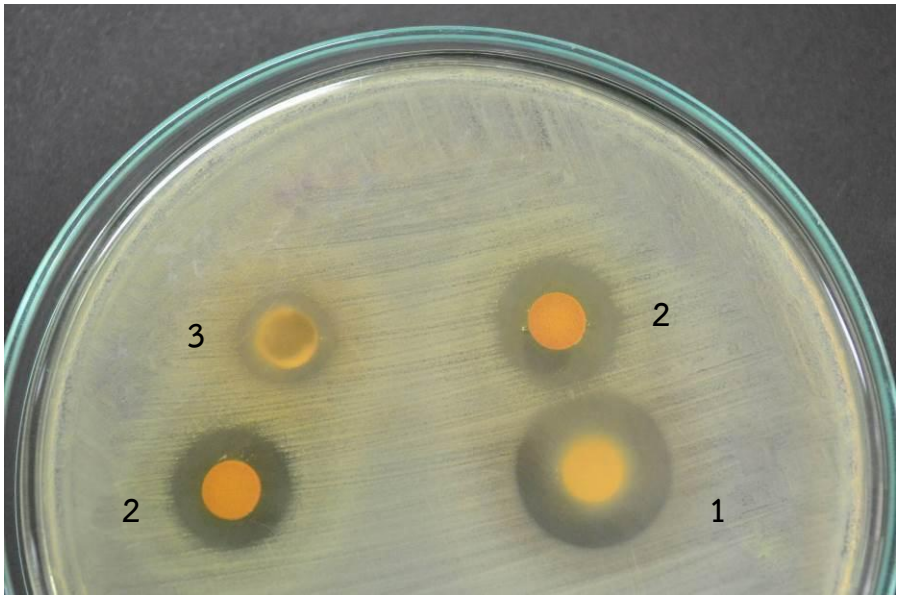
ลำดับที่	สารสกัดสมุนไพรชนิดที่ 1	สารสกัดสมุนไพรชนิดที่ 2	ผลการทดลองการเสริมฤทธิ์
1	กานพลู	ฝรั่ง	Positive
2	กานพลู	ชะเอมเทศ	Negative
3	กานพลู	เมล็ดฟักข้าว	Negative
4	ฝรั่ง	ชะเอมเทศ	Negative
5	ฝรั่ง	เมล็ดฟักข้าว	Negative
6	ชะเอมเทศ	เมล็ดฟักข้าว	Negative



ภาพประกอบ 10 การทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรโดย 1=สารสกัดกานพลู 2=สารสกัดฝรั่ง 3=สารสกัดเมล็ดฟักข้าว



ภาพประกอบ 11 การทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรโดย 1=สารสกัดชะเอมเทศ 2=สารสกัดเมล็ดฟักข้าว 3=สารสกัดฝรั่ง



ภาพประกอบ 12 การทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรโดย 1=สารสกัดกานพลู 2=สารสกัดชะเอมเทศ 3=สารสกัดฝรั่ง

4.3.2 การทดสอบด้วยวิธี checkerboard dilution

ทำการเจือจางสารสกัดจากดอกกานพลูและใบฝรั่งแบบ Serial two-fold dilution ที่ระดับความเข้มข้นแต่ละชนิดตั้งแต่ 4×MIC ถึง 1/10×MIC โดยใช้อัตราส่วนที่เท่ากันผสมในแต่ละความเข้มข้นมาทดสอบ

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ พบว่าค่า MIC ของสารสกัดจากดอกกานพลูและใบฝรั่งในสารผสมต่อเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์มีค่าลดลง 8 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรเพียงชนิดเดียว และเมื่อคำนวณค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพการยับยั้งร่วมหรือ Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) ของสารสกัดจากดอกกานพลูร่วมกับใบฝรั่ง พบว่าค่า FICI ต่อเชื้อทดสอบ มีค่าเท่ากับ 0.25 หมายความว่าฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดจากดอกกานพลูและใบฝรั่งเป็นแบบเสริมฤทธิ์กัน

จากการทดลองหาค่า MIC, MBC และการทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร พบว่าชะเอมเทศให้ค่า MIC ต่ำสุดคือ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดใบฝรั่งเสริมฤทธิ์กับสารสกัดจากดอกกานพลู ดังนั้นจึงได้คัดเลือกนำสารสกัดจากสมุนไพรรากชะเอมเทศ ใบฝรั่งและดอกกานพลู มาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพร โดยต้องการใช้ปริมาณของสารสกัดความเข้มข้น 2 เท่าของ MIC ในการเตรียมตำรับ และเนื่องจากสารสกัดกานพลูและใบฝรั่งเสริมฤทธิ์กัน จึงใช้ค่า MIC ใหม่เท่ากับ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการเตรียมผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพร

4.4 ผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากจากสารสกัดสมุนไพร

4.4.1 ลักษณะทางกายภาพน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับต่างๆ

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อพบว่าสารสกัดรากชะเอมเทศมีฤทธิ์ดีที่สุด และเมื่อใช้สารสกัดดอกกานพลูร่วมกับสารสกัดใบฝรั่งเกิดการเสริมฤทธิ์กันจนมีค่า MIC ใหม่เทียบเท่ากับสารสกัดรากชะเอมเทศ ดังนั้นจึงได้คัดเลือกสมุนไพรในการเตรียมผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากคือสารสกัดสมุนไพรดอกกานพลู รากชะเอมเทศและใบฝรั่ง โดยใช้ความเข้มข้น 2 เท่าของ MIC คือ 0.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากันทั้ง 3 ชนิด (ตาราง 9 และผลจากข้อ 4.5) ตามส่วนประกอบต่างๆ 5 ตำรับ (ตาราง 6) พบว่าตำรับที่ 1 มีตะกอนของสมุนไพร และมีรสขม จึงได้พัฒนามาเป็นตำรับที่ 2 โดยใช้แอลกอฮอล์เพิ่มการละลาย จึงไม่พบตะกอนของสมุนไพรแต่กลิ่นและรสชาติของผลิตภัณฑ์ยังไม่น่าใช้ จึงปรับแต่งกลิ่นและรสชาติโดยใช้ peppermint water, menthol และเกลือแกง พบว่าตำรับที่ 3 มีกลิ่นและรสชาติดีขึ้น แต่มีตะกอนที่ไม่ละลาย ตำรับที่ 4 จึงได้ทดลองลดปริมาณของเกลือแกงลง พบว่ารสชาติ กลิ่น และลักษณะทางกายภาพคือ สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีตะกอนดีกว่า 3 ตำรับแรก แต่ยังมีรสขมเล็กน้อย จึงพัฒนามาเป็นตำรับที่ 5 โดยลดปริมาณของแอลกอฮอล์ที่ช่วยเพิ่มการละลายลงพบว่ามีรสขมลดลง ไม่มีตะกอนของสมุนไพร มีกลิ่นดีและรสหวานซ่า ดังนั้นจึงได้คัดเลือกตำรับน้ำยาบ้วนปากที่ 5 มาทดสอบความคงตัว และทดสอบความพึงพอใจเปรียบเทียบกับน้ำยาบ้วนปากในท้องตลาด ซึ่งตำรับที่ 5 มีองค์ประกอบเป็นสารสกัดจากสมุนไพรดอกกานพลู รากชะเอมเทศ และใบฝรั่ง มีสารช่วยละลายคือ propylene glycol, glycerin, ethanol และน้ำ มีสารแต่งรสหวานคือ sorbitol เกลือแกงและ menthol ช่วยแต่งรส peppermint water ช่วยแต่งกลิ่น ผลิตภัณฑ์หลังตั้งตำรับเสร็จจะทำการกรองผ่านกระดาษกรอง 0.45 ไมครอน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีความใสมากขึ้น แล้วจึงนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 11 ลักษณะทางกายภาพน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับต่างๆ

ตำรับ	สี	กลิ่น	ตะกอน	pH
1	สีเขียวอ่อน	กลิ่นของสมุนไพร/ไม่หอม	มีตะกอน	4.77
2	สีเขียวอ่อน	กลิ่นสมุนไพร/หอมเล็กน้อย	ไม่มีตะกอน	4.45
3	สีเขียวอ่อน	กลิ่นหอมอ่อนๆ	มีตะกอน	4.78
4	สีเขียวอ่อน	กลิ่นหอมอ่อนๆ	ไม่มีตะกอน	4.93
5	สีเขียวอ่อน	กลิ่นหอมอ่อนๆ	ไม่มีตะกอน	4.97

ภาพประกอบ 13 ลักษณะทางกายภาพของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับต่างๆ

ภาพประกอบ 14 ลักษณะทางกายภาพของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับ 5 หลังการกรองผ่านกระดาษกรอง 0.45 ไมครอน

4.4.2 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร

นำผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่คัดเลือก คือ ตำรับที่ 5 มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าให้ค่า MIC ที่หลอดที่ 3 (เจือจางลง 4 เท่า) ซึ่งคิดเป็นความเข้มข้นของสารสกัดดอกกานพลู รากชะเอมเทศ และใบฝรั่ง เท่ากับชนิดละ 0.095 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ให้ผลเทียบเท่ากับตำรับน้ำยาบ้วนปากชื่อการค้า (B) ที่มีขายในท้องตลาดซึ่งได้นำมาใช้ในการเปรียบเทียบ ทั้งนี้ ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ของกระสายยาและสารเติมแต่งของตำรับ (ตำรานำ้ยาบ้วนปากตำรับ 5 ที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพรดอกกานพลู รากชะเอมเทศและใบฝรั่ง)

4.4.3 การทดสอบความคงตัวของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร

การนำผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับที่ 5 มาทดสอบความคงตัวด้วยโดยทดสอบ Freeze thaw cycle และผ่านการเขย่า 60 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าหลังการทดสอบ Freeze thaw cycle เป็นเวลา 24 วัน พบว่าน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรมีสีเข้มขึ้น กลิ่นหอมอ่อนๆ ไม่มีตะกอน ค่า pH 5.01 (pH ก่อนทดสอบความคงตัวเท่ากับ 4.97) ความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียให้ค่า MIC ลดลงคือที่หลอด 2 (เจือจางลง 2 เท่าหรือคิดเป็นความเข้มข้นของสารสกัดดอกกานพลู รากชะเอมเทศ และใบฝรั่ง เท่ากับ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทดสอบความคงตัวหลังการเขย่าตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร 60 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าลักษณะทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลง กลิ่นหอมอ่อนๆ และค่า pH 4.92 (pH ก่อนทดสอบความคงตัวเท่ากับ 4.97) ความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียคงเดิม

ภาพประกอบ 15 ลักษณะทางกายภาพของน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรหลัง Freeze thaw cycle

ภาพประกอบ 16 ลักษณะทางกายภาพของน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรหลังผ่านการเขย่า 60 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.5 การทดสอบผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรในอาสาสมัคร

ก่อนการทดสอบความพึงพอใจต่อน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรต่ออาสาสมัคร ได้ทดสอบความปลอดภัยของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่พัฒนาขึ้น (A) โดยทำการทดสอบในอาสาสมัครจำนวน 10 คน ให้ใช้บ้วนปากตำรับที่พัฒนาขึ้น บ้วนปากวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็นเป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นใช้แบบสอบถามประเมินความปลอดภัยหลังการใช้น้ำยาบ้วนปากสมุนไพร ผลการทดลองพบว่าอาสาสมัครทุกคนไม่พบความผิดปกติใดๆหลังการใช้น้ำยาบ้วนปากสมุนไพร (ตารางที่ 12)

ตาราง 12 ผลการประเมินความปลอดภัยหลังการใช้น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรโดยอาสาสมัคร (n=10)

อาการประเมิน	ผลการประเมิน	
	มี	ไม่มี
อาการรับรสเปลี่ยนแปลง	0	10
อาการคันตามใบหน้าหรือร่างกาย	0	10
อาการคลื่นไส้อาเจียน	0	10
อาการแสบร้อนบริเวณปาก	0	10
อาการชาบริเวณปากและใบหน้า	0	10

การทดสอบผลความพึงพอใจของอาสาสมัครต่อผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุที่พัฒนาขึ้น (A) และตำรับที่มีจำหน่ายในท้องตลาด (B) โดยใช้แบบสอบถามในการให้คะแนน โดยใช้อาสาสมัครจำนวน 50 คน อายุเฉลี่ย 22.58±0.97 ปี แบ่งเป็นเพศชาย 15 คน และเพศหญิง 35 คน โดยการประเมินความพึงพอใจต่อลักษณะทางกายภาพโดยรวม รสชาติ กลิ่น ความสดชื่นหลังการบ้วนปาก อาการระคายเคืองบริเวณช่องปาก และความชอบโดยรวมต่อตำรับ โดยการให้คะแนนระดับ 4 หมายถึง ดีมาก คะแนนระดับ 3 หมายถึง ดี คะแนนระดับ 2 หมายถึง พอใช้ และคะแนนระดับ 1 คือ ไม่ชอบ ผลการประเมินแสดงดังตารางที่ 13

ตาราง 13 คะแนนความพึงพอใจต่อตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุที่พัฒนาขึ้น (A) และตำรับที่มีในท้องตลาด (B) (n=50)

รายการประเมิน	ตำรับ A		ตำรับ B		*p*-value
	Mean±SD	ระดับความพึงพอใจ	Mean±SD	ระดับความพึงพอใจ	
1.ความพึงพอใจต่อสีของผลิตภัณฑ์	2.60±0.80	พอใช้	3.30±0.71	ดี	<0.001*
2.ความพึงพอใจต่อความใสหรือตะกอนของผลิตภัณฑ์	2.38±0.75	พอใช้	3.88±0.33	ดี	<0.001*

3.ความพึงพอใจต่อรสชาติ	3.24±0.80	ดี	2.06±0.94	พอใช้	<0.001*
4.ความพึงพอใจต่อกลิ่น	2.96±0.88	พอใช้	3.24±0.66	ดี	0.075#
5.ความสดชื่นหลังการบ้วนปาก	3.22±0.79	ดี	2.96±0.83	พอใช้	0.112#
6.อาการระคายเคืองบริเวณช่องปาก	3.92±0.24	ดี	2.26±0.97	พอใช้	<0.001*
7.ความชอบโดยรวมต่อตำรับ	3.10±0.61	ดี	2.48±0.71	พอใช้	<0.001*

*Mann-Whitney U-test, # Independent sample Student's *t*-test

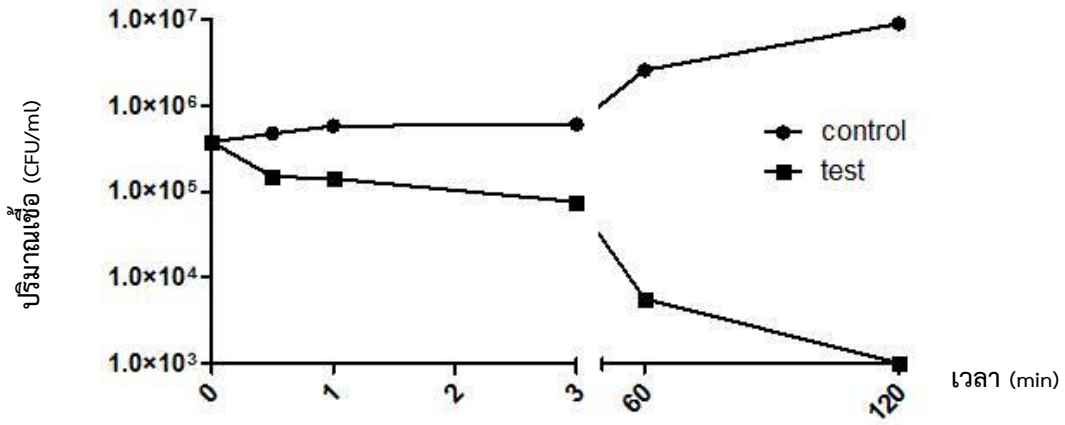
จากคะแนนการประเมิน (ตารางที่ 13) พบว่าอาสาสมัครมีความพึงพอใจต่อตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุที่พัฒนาขึ้นมากกว่าตำรับน้ำยาบ้วนปากที่มีจำหน่ายในท้องตลาดในด้านรสชาติ การระคายเคืองช่องปาก และความชอบโดยรวม (p<0.05) นอกจากนี้ยังมีคะแนนความพึงพอใจต่อความสดชื่นหลังการบ้วนปากที่สูงกว่าตำรับน้ำยาบ้วนปากที่มีจำหน่ายในท้องตลาด แต่คะแนนความพึงพอใจนี้ไม่แตกต่างกันเมื่อทดสอบทางสถิติ (p = 0.112) อย่างไรก็ตามอาสาสมัครมีความพึงพอใจต่อสีและความใสของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุที่พัฒนาขึ้น ต่ำกว่าตำรับน้ำยาบ้วนปากที่มีจำหน่ายในท้องตลาด (p<0.05) อีกทั้งมีความพึงพอใจต่อกลิ่นของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุที่พัฒนาขึ้น ต่ำกว่าตำรับน้ำยาบ้วนปากที่มีจำหน่ายในท้องตลาดด้วยเช่นกัน แต่คะแนนความพึงพอใจนี้ไม่แตกต่างกันเมื่อทดสอบทางสถิติ (p = 0.075)

สำหรับข้อเสนอแนะต่อตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุที่พัฒนาขึ้นมีดังต่อไปนี้

1) ควรพัฒนาให้ตำรับมีความใสมากขึ้น (20 คน)
2) โดยรวมรสชาติดีมาก (8 คน)
3) หลังจากบ้วนเสร็จแล้วยังไม่รู้สึกสดชื่นเท่าที่ควร (7 คน)
4) หลังบ้วนปากรู้สึกสดชื่น เย็นในปาก ไม่แสบ ไม่ระคายเคือง (5 คน)
5) กลิ่นยังมีความแรง แต่พออมในปากก็ไม่ได้กลิ่นฉุน (3 คน)
6) รสชาติยังขมเล็กน้อย (3 คน)
7) อยากให้มีการระคายเคืองเล็กน้อย มีรสเผ็ดกว่านี้ เพิ่มความสดชื่น (2 คน)
8) รสชาติและกลิ่นมีความแตกต่างจากน้ำยาบ้วนปากตามท้องตลาด ถือว่ามีความแปลกใหม่ทางรสชาติและกลิ่น (1คน)
9) ชอบที่เหมือนได้บ้วนปากด้วยสมุนไพรจริงๆ (1 คน)

4.6 การศึกษาผลของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อหน่วยเวลา (time-kill curve assay)

ผลของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อต่อหน่วยเวลาตาม Time kill method พบว่าเชื้อในหลอดควบคุมมีการเจริญเติบโตของเชื้ออย่างต่อเนื่อง ขณะที่เชื้อที่ได้รับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรพบการลดลงของเชื้ออย่างต่อเนื่องตั้งแต่ 30 วินาที และการเจริญเติบโตของเชื้อน้อยกว่า 10^3 CFU/ml หลังจากสัมผัสน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรไปแล้ว 2-8 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อลงมากกว่า 500 เท่า ขณะที่ตัวควบคุมมีเชื้อเจริญมากขึ้นประมาณ 20 เท่า ณ เวลา 2 ชั่วโมง ดังแสดงตามรูป

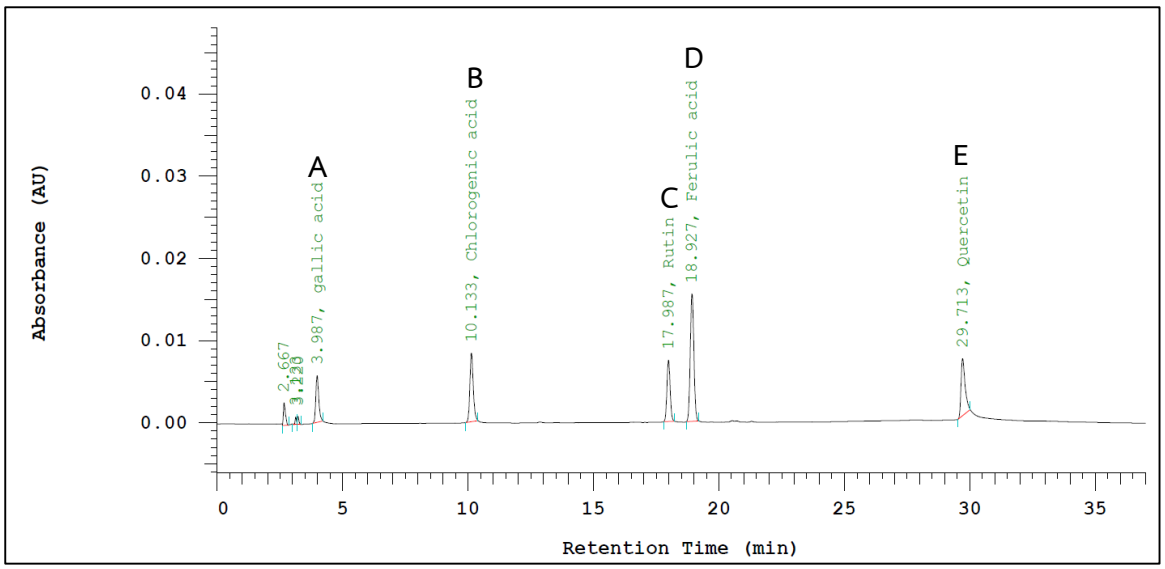


ภาพประกอบ 17 แสดงตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อต่อหน่วยเวลา

4.7 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดสมุนไพร

4.7.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีกลุ่ม flavonoids และ phenolic compounds ด้วย HPLC

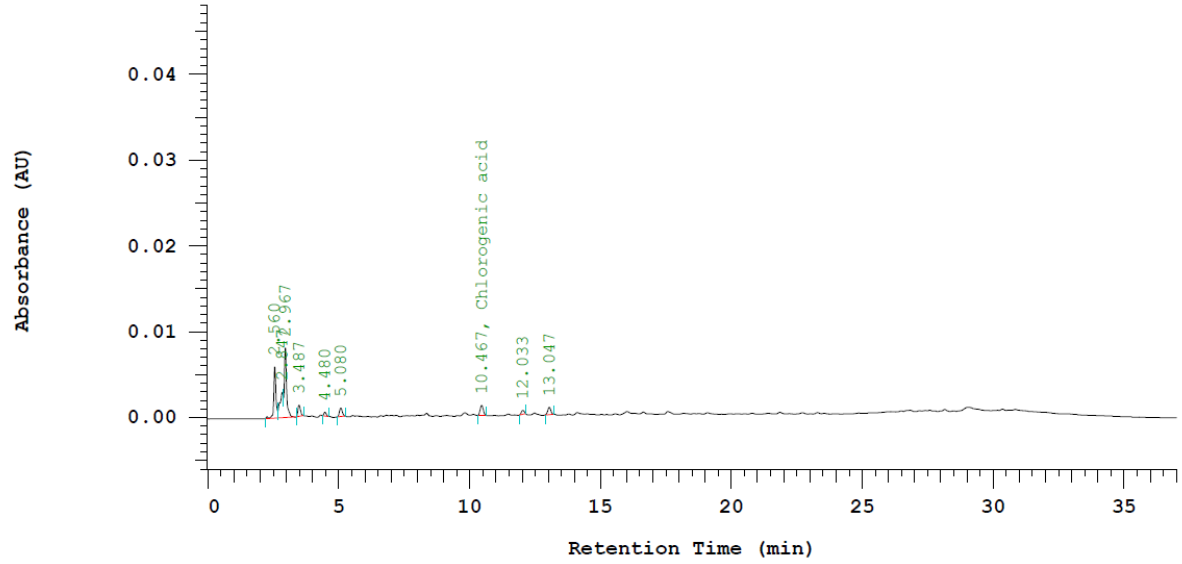
จากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีกลุ่ม flavonoids และ phenolic compounds ด้วย HPLC ตรวจวัดด้วย UV detector ความยาวคลื่น 240-400 nm เทียบกับสารมาตรฐาน 5 ชนิด ได้ chromatogram ของสารมาตรฐานดังภาพประกอบที่ 18 โดย peak ของสารมาตรฐานชนิดต่างๆ มี retention time ตามตาราง 14 ส่วนภาพประกอบที่ 19-25 แสดง chromatogram ของสารสกัดสมุนไพร ทั้งนี้สารสกัดสมุนไพรยังไม่สามารถสรุปได้ว่ามีชนิดองค์ประกอบทางเคมีตามสารมาตรฐานที่นำมาศึกษา ต้องศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยด้วยวิธีอื่น เช่น LC-MS ต่อไป



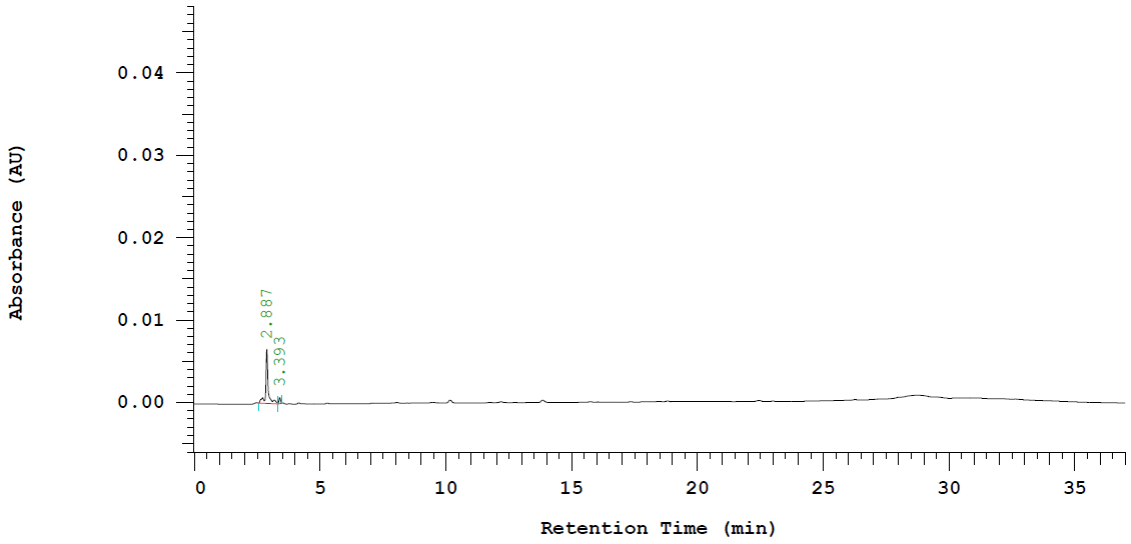
ภาพประกอบที่ 18 Chromatogram ของสารมาตรฐาน ความเข้มข้น 25 µg/ml โดย A = gallic acid, B = chlorogenic acid, C = Rutin, D = Ferulic acid, E = Quercetin

ตาราง 14 ค่า retention time ของสารมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา

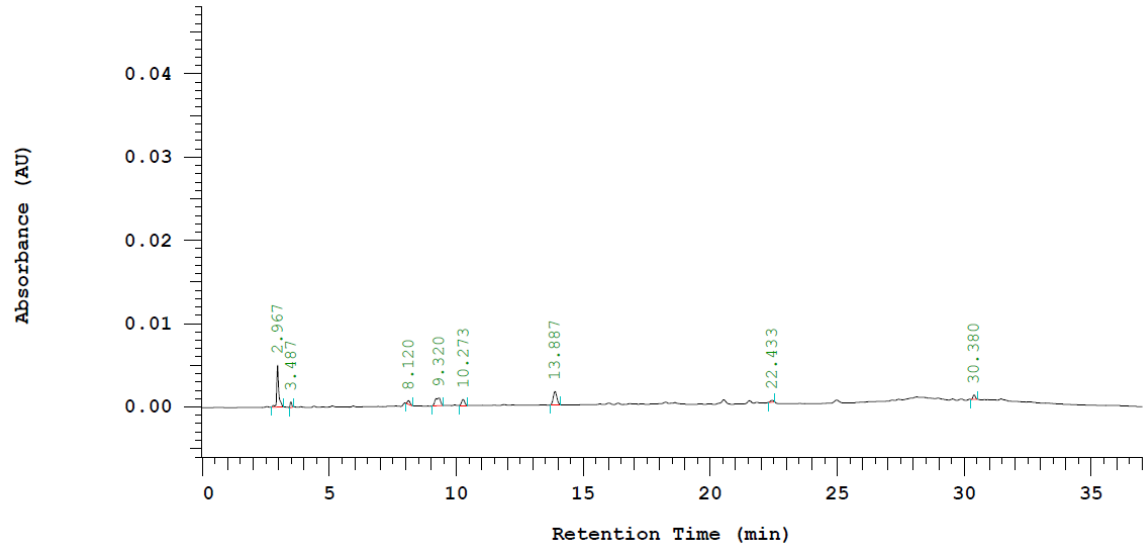
Peak	สาร	Retention time
A	Gallic acid	3.987
B	Chlorogenic acid	10.133
C	Rutin	17.987
D	Ferulic acid	18.927
E	Quercetin	29.713



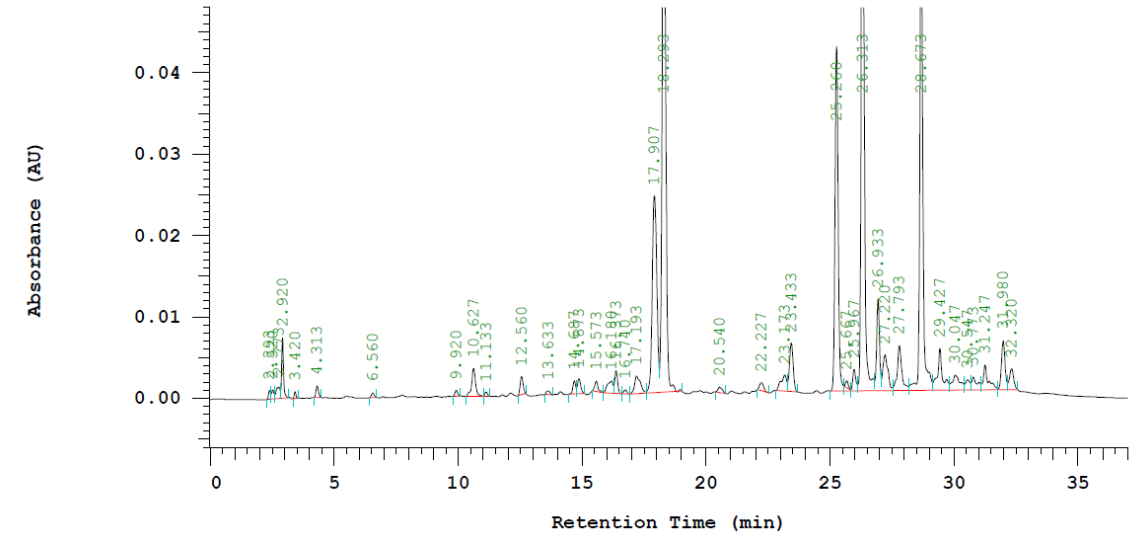
ภาพประกอบที่ 19 Chromatogram ของเปลือกผลฟักข้าว



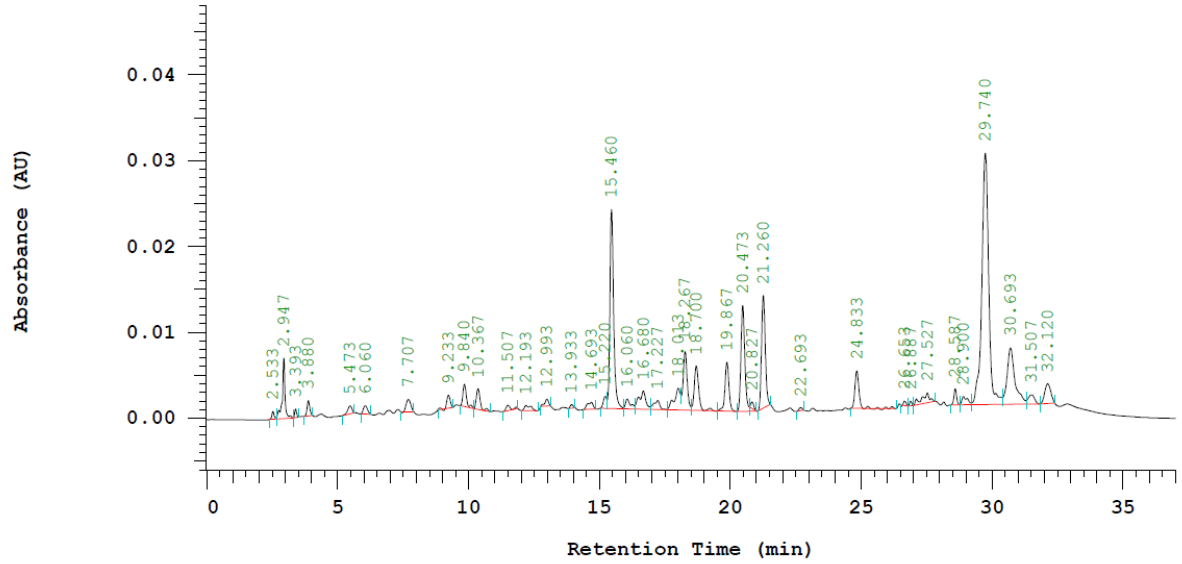
ภาพประกอบที่ 20 Chromatogram ของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว



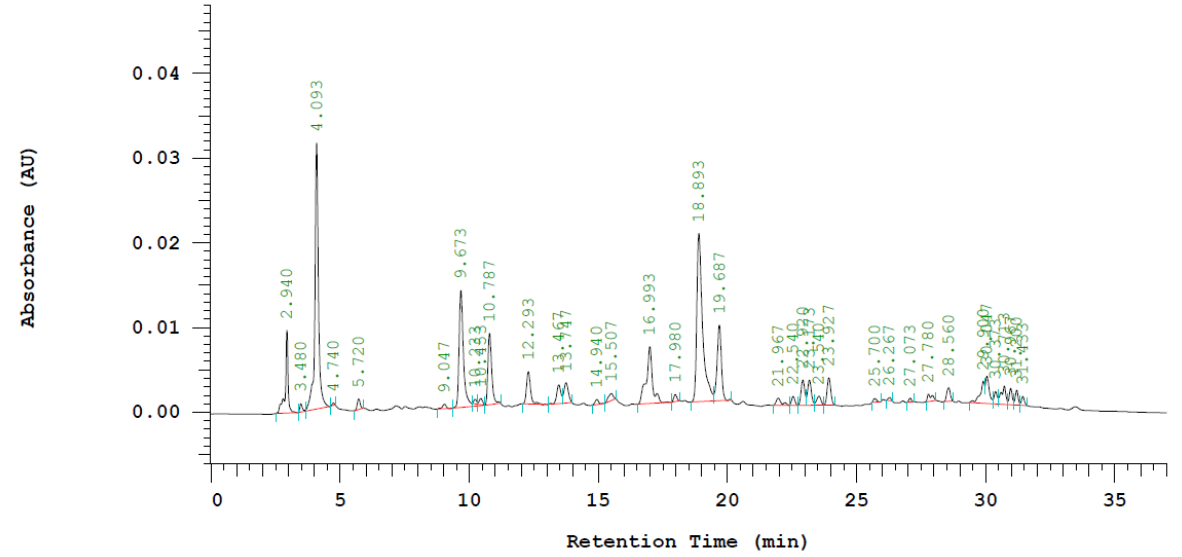
ภาพประกอบที่ 21 Chromatogram ของเมล็ดฟักข้าว



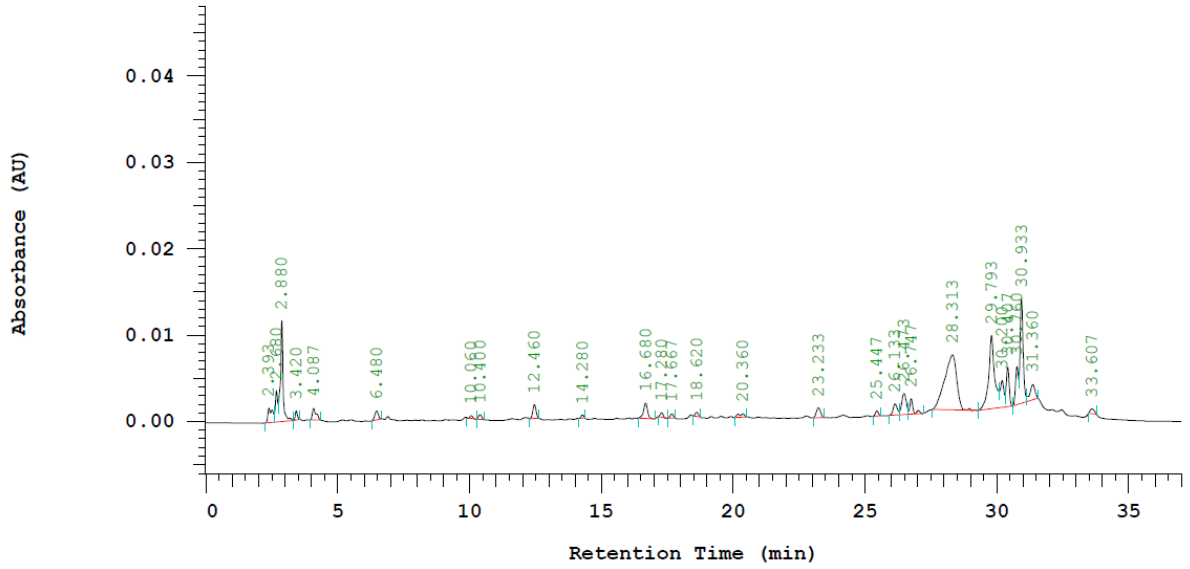
ภาพประกอบที่ 22 Chromatogram ของชะเอมเทศ



ภาพประกอบที่ 23 Chromatogram ของฝรั่ง



ภาพประกอบที่ 24 Chromatogram ของกานพลู



ภาพประกอบที่ 25 Chromatogram ของดีปลี

ส่วนที่ 5

สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้นำเสนอการอภิปรายผลการศึกษาตามลำดับ ดังนี้

5.1 สรุปผลการศึกษา

5.2 อภิปรายผลการศึกษา

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการศึกษา

การศึกษาการพัฒนาและประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรแสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์โดยการคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ การคัดเลือกตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ที่ดีมาศึกษาความคงตัวของตำรับและทดสอบความพึงพอใจของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรในอาสาสมัครเปรียบเทียบกับตำรับน้ำยาบ้วนปากในท้องตลาด และผลของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่พัฒนาขึ้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ต่อหน่วยเวลา สรุปผลได้ดังนี้

5.1.1 สารสกัดเอทานอลจากใบฝรั่ง ดอกดีปลี ดอกกานพลู รากชะเอมเทศและผลฟักข้าว มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์เมื่อทดสอบด้วย วิธี agar disc diffusion ที่ปริมาณ 15 มิลลิกรัมต่อแผ่น พบว่าสารสกัดจากดอกกานพลูและรากชะเอมเทศ มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 16.7±0.5 และ 16.3±0.5 มิลลิเมตรตามลำดับ สารสกัดจากใบฝรั่ง เมล็ดฟักข้าวและดอกดีปลี มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 12.0±1.0, 11.0±0.0 และ 6.7±0.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ จึงได้คัดเลือกสารสกัดสมุนไพรได้แก่ ใบฝรั่ง ดอกกานพลู รากชะเอมเทศ และเมล็ดฟักข้าวมาทดสอบในขั้นตอนต่อไป สารสกัดจากดอกดีปลีมีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเพียงเล็กน้อยจึงถูกคัดออกจากการศึกษา

นำสารสกัดจากสมุนไพรที่คัดเลือกได้แก่ ใบฝรั่ง ดอกกานพลู รากชะเอมเทศ และเมล็ดฟักข้าว ไปหาค่า MIC และ MBC พบว่าสารสกัดจากชะเอมเทศให้ค่า MIC และ MBC ต่ำสุด เท่ากับ 0.19 และ 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือดอกกานพลู และ ใบฝรั่งค่า MIC เท่ากับ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมล็ดฟักข้าวมีค่า MIC สูงที่สุดคือ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดมีค่า MBC มากกว่า 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อจับคู่สมุนไพรแต่ละชนิดได้แก่ 1) กานพลู-ฝรั่ง 2) กานพลู-ชะเอมเทศ 3) กานพลู-เมล็ดฟักข้าว 4) ฝรั่ง-ชะเอมเทศ 5) ฝรั่ง-เมล็ดฟักข้าว 6) ชะเอมเทศ-เมล็ดฟักข้าว เพื่อทดสอบการเสริมฤทธิ์กันของสมุนไพรแต่ละคู่ด้วยวิธี double disc diffusion พบว่าให้ผลบวกเฉพาะคู่ของสารสกัดดอกกานพลูและใบฝรั่ง โดยพบเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งร่วมกัน ดังนั้นจึงได้นำสารสกัดคู่ดังกล่าวมาทดสอบด้วยวิธี checkerboard assay โดยนำสารสกัดสมุนไพรดังกล่าวมาทำการเจือจางแบบ serial two-fold dilution ที่ระดับความเข้มข้นแต่ละชนิดตั้งแต่ 4×MIC ถึง 1/10×MIC พบว่าค่า MIC ของสารสกัดผสมดอกกานพลูและใบฝรั่งต่อเชื้อสเตร็ป

โตคอคคัส มิวแทนส์มีค่าลดลง 8 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรเพียงชนิดเดียว โดยค่า FICI คำนวณได้เท่ากับ 0.25 ซึ่งหมายความว่าสารสกัดจากดอกกานพลูและใบฝรั่งออกฤทธิ์เสริมกัน

5.1.2 จากการทดลองหาค่า MIC, MBC และการทดสอบการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร ดังนั้นจึงได้คัดเลือกสารสกัดสมุนไพรจากรากชะเอมเทศ ใบฝรั่งและดอกกานพลู มาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพร เนื่องจากสารสกัดจากรากชะเอมเทศมีค่า MIC และ MBC น้อยที่สุดในการศึกษา และสารสกัดจากใบฝรั่งและดอกกานพลูมีการเสริมฤทธิ์กันจนทำให้ค่า MIC ของสารสกัดลดลงเทียบเท่ากับ MIC ของรากชะเอมเทศ

5.1.3 ผลจากการพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากทั้งหมด 5 ตำรับ พบว่าตำรับที่ 5 มีลักษณะทางกายภาพที่ดี ไม่มีตะกอนของสมุนไพร มีกลิ่นและรสชาติหวานซ่า จึงได้คัดเลือกมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป ผลการศึกษาพบว่าตำรับที่ 5 เมื่อทดสอบด้วยวิธี broth macrodilution สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้เท่ากับน้ำยาบ้วนปากตามท้องตลาดยี่ห้อหนึ่งที่นำมาทดสอบเปรียบเทียบ โดยเมื่อเจือจางลงถึง 4 เท่า ยังสามารถยับยั้งเชื้อได้ คือมีค่า MIC ลดลงจากค่า MIC ของสารสกัดเดี่ยวอีก 25% หรือเท่ากับ 0.095 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.1.4 การศึกษาความคงตัวด้วยการทดสอบ freeze thaw cycle พบว่าน้ำยาบ้วนปากตำรับที่ 5 มีสีเข้มขึ้น ความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียลดลงเล็กน้อย แต่การทดสอบความคงตัวโดยการเขย่าตำรับน้ำยาบ้วนปากที่ 60 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีลักษณะทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลง และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียคงเดิม

5.1.5 ผลการศึกษาตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อต่อหน่วยเวลาเมื่อใช้วิธี Time kill method พบว่าน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรพบการลดปริมาณลงของเชื้ออย่างต่อเนื่องตั้งแต่ 30 วินาที และการเจริญเติบโตของเชื้อลดลงจาก 3.8 x 10^5 CFU/ml เหลือน้อยกว่า 10^3 CFU/ml หลังจากสัมผัสน้ำยาบ้วนปากไปแล้วตั้งแต่ที่เวลา 2 ชั่วโมง และยังควบคุมปริมาณเชื้อให้น้อยกว่า 10^3 CFU/ml ได้อย่างน้อยถึงเวลา 8 ชั่วโมง

5.1.6 เมื่อนำตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่พัฒนาขึ้นมาทดสอบความปลอดภัยเบื้องต้น ไม่พบความผิดปกติใดๆในอาสาสมัครผู้ทำการทดสอบจำนวน 10 คน และจากการทดสอบความพึงพอใจในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 50 คน เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์อ้างอิง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด พบว่าผู้ทดสอบมีความพึงพอใจในด้านรสชาติ การระคายเคืองช่องปาก และความชอบโดยรวมต่อผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นสูงกว่าผลิตภัณฑ์อ้างอิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามผู้ทดสอบมีความพึงพอใจต่อสีและความใสของผลิตภัณฑ์ต่ำกว่าผลิตภัณฑ์อ้างอิง ขณะที่ความพึงพอใจต่อกลิ่นและความสดชื่นหลังการบ้วนปากต่อผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ไม่ต่างกัน

5.1.7 จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี HPLC ยังไม่สามารถระบุสารพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบได้ จึงจำเป็นต้องมีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคอื่น เช่น LC-MS เพิ่มเติมในอนาคต

5.2 อภิปรายผลการศึกษา

สารสกัด 95% เอทานอลจากพืชสมุนไพรจำนวน 5 ชนิด ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ สมุนไพรที่ถูกคัดเลือกมาพัฒนาตั้งตำรับน้ำยาบ้วนปากได้แก่ ดอกกานพลู รากชะเอมเทศ และใบฝรั่ง สารเคมีที่สำคัญที่มีงานวิจัยว่าสามารถสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม Phenolic compound, flavonoids, essential oils, alkaloids,

lectins/polypeptides [Cowan MM, 1999] การวิจัยในครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่พบว่าสารสกัดเอทานอลจากดอกกานพลูและชะเอมเทศสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ DMST18777 มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเท่ากับ 14 และ 15 มิลลิเมตร ตามลำดับ ค่า MIC ของสารสกัดทั้ง 2 ชนิดน้อยกว่า 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ MBC เท่ากับ 50 และ 25มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ [Chaiya A, et al. 2013] การทดสอบโดยใช้น้ำมันกานพลูให้ผลในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าสารสกัดหยาบ โดยพบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ MTCC*497 มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 34.32 มิลลิเมตร ค่า MIC เท่ากับ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร [Aneja KR and Joshi R, 2010] ซึ่งกานพลูมีสารเคมีที่สำคัญคือ eugenol, carvacrol, thymol, tannin และ cinnamaldehyde [Chaiya A, 2013; Chaieb K, et al. 2007] โดยเฉพาะ eugenol นอกจากมีฤทธิ์ต้านเชื้อแล้วยังมีฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่ ช่วยลดอาการปวดฟันได้ [Hosseini M, et al. 2011] ส่วนชะเอมเทศสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์และ *S. sanguis* ที่ MIC และ MBC เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร [Geetha RV and Anitha R, 2012] สารสำคัญในชะเอมเทศ คือ glycyrrhizin ซึ่งสามารถยับยั้งกระบวนการกลูโคซิลทรานเฟอร์เรส (glucosyltransferases; GTFs) และลดการยึดเกาะของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ได้ [Messier C, et al. 2012] ใบฝรั่งมีสรรพคุณในการป้องกันโรคฟันผุ และระงับกลิ่นปากได้ดี [Gutirrez RMP, et al. 2008] การศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าสารสกัดน้ำของใบฝรั่งสามารถยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ATCC 25175 มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร [Saraya S, et al. 2008] องค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่ tannin, guajaverin, quercerin, ellagic acid และ essential oil [Segal R, et al. 1985] โดยเฉพาะ guaijaverin สามารถยับยั้งการทำงานของ GTFs ลดการสร้างกรด และลดการยึดเกาะของเชื้อกับผิวฟันได้ [Prabu GR, et al. 2006] ในแต่ละการศึกษาแสดงค่า MIC และ MBC ที่แตกต่างกันแม้จะเป็นพืชชนิดเดียวกัน ซึ่งผลการศึกษาอาจขึ้นกับสายพันธุ์จุลินทรีย์ ตัวทำละลายในการสกัด แหล่งที่ปลูก ฤดูกาลเก็บเกี่ยวและปริมาณสารสำคัญในพืชแต่ละชนิด

การเสริมฤทธิ์กันของสารผสมมีความสำคัญในการพัฒนายา เนื่องจากช่วยป้องกันหรือลดอัตราการดื้อยาของเชื้อและช่วยลดขนาดการใช้ยาหรือสารแต่ละชนิดลง อันเป็นการลดความเสี่ยงในการเกิดพิษหรือผลไม่พึงประสงค์และลดต้นทุน ทั้งยังทำให้ตำรับออกฤทธิ์ได้กว้างขึ้นด้วย [Eliopoulos GM and Moellering RC, 1996] การเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดที่นำมาศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดจากดอกกานพลูและใบฝรั่งเสริมฤทธิ์กันในการต้านเชื้อ สเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์ อาจเป็นเพราะในสมุนไพรมีสารหลายชนิดเป็นองค์ประกอบอยู่ดังนั้นสารที่ออกฤทธิ์อาจเป็นสารสำคัญตัวเดียวหรือสารหลายชนิดที่ออกฤทธิ์ร่วมกันสารสำคัญที่อยู่ในกานพลูและใบฝรั่งโดยเฉพาะ eugenol และ guaijaverin มีการศึกษาชัดเจนว่ามีผลยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GTFs ลดการยึดเกาะของเชื้อกับผิวฟัน และลดการสร้างกรด [Prabu GR, et al. 2006; Shuxu J, et al. 2013] ดังนั้นการเสริมฤทธิ์อาจเกิดจากกลไกการทำงานที่คล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ยังพบว่า eugenol สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ ซึ่งมีผลทำให้ตัวยาอื่นๆสามารถผ่านเข้าไปออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีขึ้น [Hemaiswarya S and Doble M, 2009] ดังนั้นจึงอาจเป็นอีกกลไกหนึ่งในการเสริมฤทธิ์กัน

การพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรได้ทั้งหมด 5 ตำรับ คัดเลือกตำรับที่ 5 โดยทำการหาส่วนผสมของกระสายยาที่สามารถละลายสารสกัดให้ใส ไม่ขุ่น ไม่แยกชั้น จากนั้นได้ทำการแต่งกลิ่นเพิ่มความสดชื่นโดยใช้ peppermint และเพิ่มความหวานซ่าโดยใช้ sorbitol และ menthol ตำรับนี้ใช้สีธรรมชาติของสารสกัด ส่วนการกรองตำรับน้ำยาบ้วนปากช่วยเพิ่มความน่าใช้ของผลิตภัณฑ์ โดยที่ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อเมื่อทดสอบด้วยวิธี broth dilution ยังคงเดิม และมีฤทธิ์เทียบเท่ากับตำรับน้ำยาบ้วนปากในท้องตลาดยี่ห้อหนึ่งที่

นำมาทดสอบเปรียบเทียบ อย่างไรก็ตามฤทธิ์การยับยั้งเชื้อของน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่พัฒนาขึ้น แม้ยังไม่เทียบเท่า chlorhexidine digluconate ซึ่งเป็นสารกลุ่ม bigaunides แต่ chlorhexidine digluconate มีผลข้างเคียงคือ การติดสีบนฟัน และทำให้การรับรสของลิ้นมีการเปลี่ยนแปลง [สิทธิชัย ขุนทองแก้ว, 2552]

ผลการทดสอบความคงตัวของตำรับน้ำยาบ้วนปากเมื่อผ่าน freeze thaw cycle เป็นเวลา 24 วัน น้ำยาบ้วนปากมีสีเข้มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของบังอรและคณะ [2549] ที่พบว่าตำรับน้ำยาบ้วนปากจากสารสกัดใบฝรั่งเมื่อเก็บที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นและระยะเวลานานขึ้นน้ำยาบ้วนปากจะมีสีเข้มขึ้นและปริมาณแทนนินของผลิตภัณฑ์มีแนวโน้มลดลงเมื่อเก็บในที่อุณหภูมิสูงมากกว่าอุณหภูมิที่ต่ำกว่า ซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ลดลง

จากการทดสอบความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุที่พัฒนาขึ้นในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 10 คน เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์พบว่าอาสาสมัครทุกคนไม่มีอาการของความผิดปกติใดๆเกิดขึ้นหลังการใช้น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรแสดงให้เห็นในเบื้องต้นว่าตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรมีความปลอดภัยในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตามการศึกษาในขั้นถัดไปควรทำการทดสอบความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น เนื่องจากเมื่อนำผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากไปใช้จริง อาจมีการใช้ผลิตภัณฑ์ต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้ควรทำการศึกษาในกลุ่มประชากรที่มีความหลากหลายมากขึ้นด้วย เช่น ในผู้สูงอายุ หรือในเด็กวัยเรียน

เมื่อวิเคราะห์ผลจากระดับคะแนนความพึงพอใจพบว่าน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่พัฒนาขึ้นมีคะแนนมากกว่าตำรับในท้องตลาดที่นำมาทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในหัวข้อรสชาติ การระคายเคืองช่องปาก และความชอบโดยรวม ($p<0.05$) นอกจากนี้ยังมีคะแนนความพึงพอใจต่อความสดชื่นหลังการบ้วนปากที่สูงกว่าตำรับน้ำยาบ้วนปากที่มีจำหน่ายในท้องตลาด แต่คะแนนความพึงพอใจนี้ไม่แตกต่างกันเมื่อทดสอบทางสถิติ ($p = 0.112$) ทั้งนี้รสชาติและการระคายเคืองช่องปากจัดเป็นหัวข้อที่มีความสำคัญสำหรับการใช้ผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากเนื่องจากต้องมีการสัมผัสภายในช่องปากและลิ้นโดยตรง ดังนั้นผลการประเมินที่ดีทางด้านรสชาติและการระคายเคืองจึงเป็นตัวบ่งชี้สำคัญที่แสดงถึงแนวโน้มการยอมรับที่ดีของผู้ใช้ผลิตภัณฑ์ ส่วนความสดชื่นหลังจากการบ้วนปากนั้นเป็นความรู้สึกที่ผู้ใช้มักคาดหวังให้เกิดขึ้นหลังการใช้ผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากและเป็นปัจจัยที่ควรพัฒนาเพิ่มขึ้น ซึ่งผู้ใช้ในแต่ละช่วงอายุอาจมีความชอบต่อความรู้สึกสดชื่น หรือรสชาติซ่าภายในปากที่แตกต่างกันออกไป โดยในกลุ่มผู้สูงอายุเยื่อบุภายในช่องปากจะบางลง และความทนต่อรสชาติเผ็ดร้อนหรือรสซ่าจะต่ำกว่าในวัยผู้ใหญ่ ดังนั้นผลการประเมินความพึงพอใจในด้านความสดชื่นหลังการบ้วนปากที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้อาจไม่สามารถนำไปใช้ได้กับผู้สูงอายุ อย่างไรก็ตามอาสาสมัครมีความพึงพอใจต่อสีและความใสของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุที่พัฒนาขึ้น ต่ำกว่าตำรับน้ำยาบ้วนปากที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ($p<0.05$) อีกทั้งมีความพึงพอใจต่อกลิ่นของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุที่พัฒนาขึ้น ต่ำกว่าตำรับน้ำยาบ้วนปากที่มีจำหน่ายในท้องตลาดด้วยเช่นกัน แต่คะแนนความพึงพอใจนี้ไม่แตกต่างกันเมื่อทดสอบทางสถิติ ($p = 0.075$) ดังนั้นจึงมีควรพัฒนาปรับปรุงด้านความใส สี และกลิ่นของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรให้มากขึ้น

การทดสอบความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์ตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุที่พัฒนาขึ้นได้มีการเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากที่มีจำหน่ายในท้องตลาด โดยทำการศึกษาแบบ single-blind study คืออาสาสมัครไม่ทราบถึงชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ทดสอบ ทั้งนี้เพื่อลดอคติที่อาจเกิดขึ้น เนื่องจากประสบการณ์ ปัจจัยทางร่างกายและจิตใจอาจมีผลต่อการให้ข้อมูล การเลือกกลุ่มอาสาสมัครในการศึกษาครั้งนี้เลือกช่วงอายุที่ช่วงอายุวัยรุ่นและวัยทำงาน ซึ่งอาจจะไปปรับใช้กับผู้สูงอายุได้ยาก เนื่องจากอายุของผู้ทดสอบก็มีผลต่อการรับรส โดยพบว่าผู้สูงอายุมีความสามารถในการรับรสที่ลดลง จากการศึกษาของ Mojet

et al. (2003) รายงานว่าผู้สูงอายุ (อายุ 60-75 ปี) รับรู้รสชาติต่างๆได้แก่ เปรี้ยว หวาน เค็ม และขม ที่ละลายในน้ำได้ลดลง โดยกลุ่มผู้สูงอายุรับรู้ถึงความเข้มของรสชาติต่างๆต่ำกว่ากลุ่มของผู้ที่มีอายุ 19-33 ปีอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่เมื่อทดสอบโดยผสมรสชาติต่างๆลงในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มพบว่าผู้สูงอายุมีการรับรสที่ลดลงสำหรับรสเค็มและรสขมเท่านั้น อย่างไรก็ตามเมื่อให้กลุ่มตัวอย่างสวมใส่ nose clip เพื่อป้องกันการรับกลิ่นขณะที่ทดสอบการรับรู้รสชาติ พบว่ากลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มมีการรับรู้ถึงรสชาติต่างๆที่ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นรสเค็มที่พบว่าผู้สูงอายุมีการรับรู้รสเค็มที่ลดลง แสดงให้เห็นว่าการได้กลิ่นส่งผลต่อการรับรู้รสชาติ โดยที่กลุ่มตัวอย่างที่อายุน้อยอาศัยการได้กลิ่นช่วยในการรับรู้ถึงรสชาติ ขณะที่กลุ่มตัวอย่างสูงอายุมีความสามารถในการรับกลิ่นที่ลดลงไป เนื่องจากมีความไวในการทำงานของระบบประสาท olfactory sensitivity ที่ลดลง [Doty, 1989; Murphy et al., 1991] ดังนั้นการแต่งกลิ่นในผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรให้มีความหอมสดชื่นจึงอาจช่วยเพิ่มความพึงพอใจในกลุ่มผู้ใช้อายุน้อยได้ แต่อาจส่งผลน้อยหรือไม่มีผลต่อผู้ใช้ที่เป็นสูงอายุ ซึ่งควรทำการศึกษาความพึงพอใจและการรับรู้ถึงกลิ่นและรสชาติของผลิตภัณฑ์ในผู้สูงอายุเพิ่มเติมในอนาคต

ปัจจัยด้านเพศก็อาจส่งผลต่อการรับรสเช่นเดียวกัน จากการศึกษาของ Hyde and Feller (1981) พบว่าเพศหญิงรับรู้ถึงรสขมและรสเปรี้ยวได้มากกว่าเพศชาย (โดยเฉพาะเพศชายสูงอายุ) แต่จากการศึกษาของ Mojet et al. (2003) พบว่าเพศชายรับรู้ถึงรสขมของ caffeine และ quinine ได้มากกว่าเพศหญิง และทั้ง 2 เพศรับรู้ถึงรสเปรี้ยวได้ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามไม่มีรายงานการศึกษาที่พบความแตกต่างของการรับรสเค็มหรือรสหวานระหว่างเพศหญิงและเพศชาย กลุ่มตัวอย่างในการทดสอบความพึงพอใจในงานวิจัยครั้งนี้ส่วนใหญ่เป็นเพศหญิง ซึ่งอาจส่งผลให้ความพึงพอใจต่อรสชาติมีความแตกต่างไปจากเพศชาย โดยเฉพาะการรับรู้ถึงรสขมที่อาจเกิดจากสารสกัดสมุนไพรและเอทานอลที่เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปาก เพศยังอาจส่งผลต่อการยอมรับการใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพร โดยมีการศึกษาของ Stjernberg et al. (2006) ซึ่งทำการศึกษาในผู้ที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไปที่อาศัยในเมือง Blekinge ประเทศสวีเดน พบว่ากลุ่มตัวอย่างจำนวน 19.1% มีการใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรและเพศหญิงมีการใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรมากกว่าเพศชาย การศึกษาในเด็กและวัยรุ่นในประเทศเยอรมันอายุ 0-17 ปีพบว่า เพศหญิงมีแนวโน้มที่จะใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรมากกว่าเพศชายเช่นเดียวกัน [Du et al., 2014] ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าเพศหญิงมีการยอมรับและความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่แตกต่างไปจากเพศชาย การศึกษาในอนาคตจึงควรทำการทดสอบความพึงพอใจทั้งในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 เพศในจำนวนที่ใกล้เคียงกัน

นอกจากปัจจัยด้านอายุและเพศแล้ว ปัจจัยอื่นๆที่อาจส่งผลต่อการรับรสซึ่งอาจส่งผลต่อเนื่องไปถึงความพึงพอใจของผู้ใช้ผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรได้แก่ อาหาร ความหิว การสูบบุหรี่ โรคอ้วน การเจ็บป่วย และอุณหภูมิ [Walker, 2015] โดยความไวของการรับรสจะลดลงในช่วง 1-4 ชั่วโมงหลังรับประทานอาหาร โดยเฉพาะในผู้ที่ได้รับประทานอาหารที่มีรสชาติเผ็ดร้อนก่อนการทดสอบ, ความหิวส่งผลต่อการรับรสได้โดยผู้ที่หิวจะมีความไวต่อรสเค็มและรสหวานมาก, การสูบบุหรี่มีผลทำให้การรับรสชาติต่างๆแย่ลง, โรคอ้วนส่งผลต่อการรับรสทำให้ความไวของการรับรสลดลงเช่นเดียวกัน, การเจ็บป่วยแม้การเจ็บป่วยเล็กน้อยเช่น เป็นหวัด แพ้อากาศ อาจส่งผลต่อการทำงานของ olfactory system ทำให้การรับกลิ่นและการรับรสผิดไปได้, อุณหภูมิสามารถส่งผลต่อการทำงานของปุ่มรับรส โดยที่อุณหภูมิสูงจะเพิ่มความไวต่อการรับรสหวาน แต่ทำให้ความไวต่อการรับรสขมและเค็มลดลง ดังนั้นจึงควรมีการควบคุมปัจจัยต่างๆข้างต้นด้วยเช่นเดียวกันเพื่อให้ผลการทดสอบความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรมีความถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อในช่องปากชนิดอื่น และการทดลองในประสิทธิภาพการต้านเชื้อของน้ำยาบ้วนปากในอาสาสมัคร

5.3.2 ควรมีการศึกษาความคงตัวของน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรในระยะยาว เพื่อการกำหนดอายุของการใช้น้ำยาบ้วนปาก ปรับปรุงสีและรสชาติให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากขึ้น

5.3.3 ควรมีการศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อและกลไกการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดสมุนไพร

เอกสารอ้างอิง

กองทันตกรรมสาธารณสุข กรมอนามัย. ผลการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพช่องปากระดับประเทศ ครั้งที่ 6 ประเทศไทย พ.ศ. 2549-2550 กรกฎาคม 2551 [25 ธันวาคม 2555]. Available from: http://www.anamai.ecgates.com/.

จินตกร คูวัฒนสุชาติ. จุลชีววิทยาช่องปาก. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2549.

บงกชวรรณ สุตะพาหะ, บรรยง คันธวะ. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราจากสารสกัดใบฟักข้าว. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่. 2554;44(1):31-7.

บังอร ศรีพานิชกุลชัย, อารมณ์ ตัตตะวะศาสตร์, วัชรี คุณกิตติ, และ อุรชา รังสาดทอง. พัฒนาตำรับน้ำยาป้วนปากจากสารสกัดใบฝรั่ง. Isan J Pharm Sci 2549; 2(1): 35-42.

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ. เครื่องสำอางเพื่อความงาม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์; 2543.

สิทธิชัย ขุนทองแก้ว. วิทยาการโรคฟันผุ. กรุงเทพมหานคร: ไอกรุ๊ป เพรส จำกัด; 2552.

Abdelrahim SI, Almagboul AZ, Omer MEA, Elegami A. Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. Fitoterapia. 2002;73(7-8):713-5.

Aneja KR, Joshi R. Antimicrobial activity of *Syzygium aromaticum* and its bud oil against dental caries causing microorganisms. Ethnobot Leaflets. 2010;14:960-75.

Bankar R, Kumar A, Puri S. Phytochemical constituent of *Syzygium aromaticum* L. Int J Curr Res. 2011;3(7):215-7.

Beaudouin E, Kanny G, Morisset M, Renaudin JM, Mertes M, Laxenaire MC, et al. Immediate hypersensitivity to chlorhexidine: literature review. Eur Ann Allergy Clin immunol. 2004;36(4):123-6.

Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. FEMS Microbiol Rev. 1999;23(2):179-230.

Bowden GH, Hardee JM, Slack GL. Microbial variations in approximal dental plaque. Caries Res. 1975;9(4):253-77.

Cai L. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. J Nat Prod. 1996;59(10):987-90.

Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae) a short review. Phytother Res. 2007;21(6):501-6.

Chaiya A, Saraya S, Chuakul W, Temsiririrkkul R. Screening for dental caries: preventive activities of medicinal plants against *Streptococcus mutans*. Mu J Pharm. 2013;40(1):9-17.

Ciancio S. Improving oral health: current considerations. J Clin Periodontol. 2003;30:4-6.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standard M02-A11, 11th ed. CLSI Wayne PA. 2012a;32: 1.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard M7-A9. 9th ed. CLSI Wayne PA. 2012b; 32: 2.

Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999;12(4):564-82.

Doty RL. Age-related alterations in taste and smell functions. Geriatric Otorhinolaryngology. B.C. Decker publishing. 1989.

Du et al. BMC Complementary and Alternative Medicine 2014, 14:218. Available from http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/218.

Eliopoulos GM, Moellering RC. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, editor. Antibiotics in laboratory medicine. 4 ed. Baltimore (MD): William & Wilkins; 1996. p. 330-8.

Fathilah AR, Rahim ZH, Othman Y, Yusoff M. Bacteriostatic effect of *Piper betle* and *Psidium guajava* extracts on dental plaque bacteria. Pak J Biol Sci. 2009b;12(6):518-21.

Fathilah AR, Yusoff M, Rahim ZHA. The effect of *Psidium guajava* and *Piper betle* extracts on the morphology of dental plaque bacteria. Pak J Med Sci. 2009a;25(6):928-33.

Fathilah AR. *Piper betle* L. and *Psidium guajava* L. in oral health maintenance J Med Plants Res. 2011;5(2):156-63.

Featherstone J. The science and practice of caries prevention. JADA. 2000;131(7):887-99.

Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. Community Dent Oral Epidemiol. 1999;27(1):31-40.

Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. Community Dent Oral Epidemiol. 1997;25(1):5-12.

Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S, Nomura T. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. Life Sci. 2002a;71(12):1449-63.

Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S, Nomura T. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Fitoterapia. 2002b;73(6):536-9.

Geetha RV, Anitha R. *In vitro* evaluation of antibacterial activity of ethanolic root extract of *Glycyrrhiza glabra* on oral microbes. Int J Drug Dev Res. 2012;4(4):161-5.

Gibbons RJ. Microbial ecology adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. JDR. 1984;63(3):378-85.

Gupta VK, Fatima A, Faridi U, Negi AS, Shanker K, Kumar JK, et al. Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots. J Ethnopharmacol. 2008;116(2):377-80.

Gutirrez RMP, Mitchell S, Solis RV. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. J Ethnopharmacol. 2008;117(1):1-27.

Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev. 1980;44(2):331-84.

Hasty DL, Ofek I, Courtney HS, Doyle RJ. Multiple adhesins of Streptococci. Infect Immun. 1992;60(6):2147-52.

Hemaiswarya S, Doble M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against gram-negative bacteria. Phytomedicine. 2009;(16):997-1005.

Hirabayashi K, Iwata S, Matsumoto H, Mori T, Shibata S, Baba M, et al. Antiviral activities of glycyrrhizin and its modified compounds against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1) in vitro. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1991;39(1):112-5.

Hoever G, Baltina L, Michaelis M, Kondratenko R, Baltina L, Tolstikov GA, et al. Antiviral activity of alycyrrhizic acid derivatives against SARS-coronavirus. J Med Chem. 2005;48(4):1256-9.

Hosseini M, Kamkar M, Rakhshandeh H. Analgesic effect of clove essential oil in mice. Avicenna J Phytomed. 2011;1(1):1-6.

Hwang J, Shim J, Chung J. Anticariogenic activity of some tropical medicinal plants against *Streptococcus mutans*. Fitoterapia. 2004;75(6):596-8.

Hyde RJ and Feller RP. Age and sex effects on taste of sucrose, NaCl, citric acid and caffeine. Neurobiol. Aging. 1981; 2, 315–318.

Iwamoto M, Okabe H, Yamauchi T, Tanaka M, Rokutani Y, Hara S, et al. Studies on the constituents of *Momordica cochinchinensis* SPRENG. I. Isolation and characterization of the seed saponins, Momordica sapponins I and II. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1985b;33(2):464-78.

Iwamoto M, Okabe H, Yamauchi T. Studies on the constituents of *Momordica cochinchinensis* Spreng. II. Isolation and characterization of the root saponins, Momordins I, II and III. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1985a;33(1):1-7.

Jaiarj P, Khoohaswan P, Wongkrajang Y, Peungvicha P, Suriyawong P, Sumal Saraya ML, et al. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. J Ethnopharmacol. 1999;67(2):203-12.

Jebashree HS, Kingsley SJ, Sathish ES, Devapriya D. Antimicrobial activity of few medicinal plants against clinically isolated human cariogenic pathogens—an *in vitro* study. ISRN Dentistry. 2011;2011:541421.

Jordan C, LeBlanc D. Influences of orthodontic appliances on oral populations of mutans streptococci. Oral Microbiol Immunol. 2002;17(2):65-71.

Khan M, Siddiqui M. Antimicrobial activity of piper fruits. Nat Prod Radiance. 2007;6(2):111-3.

Kim KJ, Lee M-S, Jo K, Hwang J-K. Piperidine alkaloids from Piper retrofractum Vahl. protect against high-fat diet-induced obesity by regulating lipid metabolism and activating AMP-activated protein kinase. Biochem Biophys Res Commun. 2011;411(1):219-25.

Koshy G, Corbet EF, Ishikawa I. A full-mouth disinfection approach to nonsurgical periodontal therapy – prevention of reinfection from bacterial reservoirs. Periodontol 2000. 2004;36(1):166-78.

Kubola J, Siriamornpun S. Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). Food Chem. 2011;127(3):1138-45.

Kumar A, Dora J. Review on *Glycyrrhiza glabra* (liquorice). J Pharma Sci Innov. 2012;1(2):1-4.

Lie T. Ultrastructural study of early dental plaque formation. J Periodontal Res. 1978;13(5):391-409.

Limsong J, Benjavongkulchai E, Kuvatanasuchati J. Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. J Ethnopharmacol. 2004;92(2–3):281-9.

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev. 1986;50(4):353-80.

Messier C, Epifano F, Genovese S, Grenier D. Licorice and its potential beneficial effects in common oro-dental diseases. Oral Dis. 2012;18:32-9.

Michalek SM, Childers NK. Development and outlook for a caries vaccine. Crit Rev Oral Biol Med. 1990;1(1):37-54.

Mojet J, Heidema J and Christ-Hazelhof E. Taste Perception with Age: Generic or Specific Losses in Supra-threshold Intensities of Five Taste Qualities? Chem. Senses 2003; 28: 397–413.

Moody J. Synergism testing: broth macrodilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: Isenber H, editor. Clinical microbiology procedures handbook. 2 ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 2004. p. 1-23.

Moody J. Synergism testing: broth macrodilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: Isenber HD (ed) Clinical microbiology procedures handbook. 2nd edition. Volume 2. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 2004. pp. 1-23.

Murphy C, Cain WS, Gilmore MM and Skinner B. Sensory and semantic factors in recognition memory for odors and graphic stimuli: elderly versus young persons. Am. J. Psychol. 1991; 104, 161–192.

Nantachit K, Tuchinda P. Antimicrobial activity of hexane and dichloromethane extracts from *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng leaves. Thai Pharm Health Sci J. 2009;4(1):15-20.

Ogaard B. CaF2 formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. Caries Res. 2001;35(Suppl. 1):40-4.

Partridge M, Poswillo DE. Topical carbenoxolone sodium in the management of herpes simplex infection. Brit J Oral Max Surg. 1984;22(2):138-44.

Pieroni A, Torry B. Dose the taste matter? Taste and medicinal perception associated with five selected herbal drugs among three ethnic groups in West Yorkshire, Northern England. J Ethnobiol Ethnomed. 2007; 3: 21.

Prabu GR, Gnanamani A, Sadulla S. Guaijaverin – a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. J Appl Microbiol. 2006;101:487-95.

Rahim ZHA, Khan HBSG. Comparative studies on the effect of crude aqueous (CA) and solvent (CM) extracts of clove on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans*. J Oral Sci. 2006;48(3):117-23.

Razak FA, Othman RY, Rahim ZH. The effect of *Piper betle* and *Psidium guajava* extracts on the cell-surface hydrophobicity of selected early settlers of dental plaque. J Oral Sci. 2006;48(2):71-5.

Razak FA, Rahim ZH. The anti-adherence effect of *Piper betle* and *Psidium guajava* extracts on the adhesion of early settlers in dental plaque to saliva-coated glass surfaces. J Oral Sci. 2003;45(4):201-6.

Reed DR, Tanaka T, McDaniel AH. Diverse tastes: Genetics of sweet and bitter perception. Physiol Behav 2006; 88(3): 215-226.

Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. Trends Microbiol. 2003;11(2):94-100.

Ritz HL. Microbial population shifts in developing human dental plaque. Arch Oral Biol. 1967;12(12):1561-8.

Saeed S, Tariq P. *In vitro* antibacterial activity of clove against gram negative bacteria. Pak J Bot. 2008;40(5):2157-60.

Saraya S, Kanta J, Sarisuta N, Temsiririrkkul R, Suvathi Y, Samranri K, et al. Development of guava extract chewable tablets for anticariogenic activity against *Streptococcus mutans*. Mu J Pharm. 2008;35(1-4):18-23.

Scheie AA. Mechanisms of dental plaque formation. Adv Dent Res. 1994;8(2):246-53.

Segal R, Pisanty S, Wormser R, Azaz E, Sela MN. Anticariogenic activity of licorice and glycyrrhizine I: Inhibition of in vitro plaque formation by *Streptococcus mutans*. J Pharm Sci. 1985;74(1):79-81.

Shuxu J, Li Y, Xue C, Yun C. The effect of eugenol on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans* and dental caries development in rats. Exp Ther Med. 2013;5:1667-70.

Stonsaovapak S, Saiyudthong S. Antilisterial effects of ethanolic extracts of some edible Thai plant on refrigerated cooked pork. Maejo Int J Sci Technol. 2010;4(3):540-6.

Svensater G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. Endod Topics. 2004;9(1):27-36.

Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. J Dent Educ. 2001;65(10):1028-37.

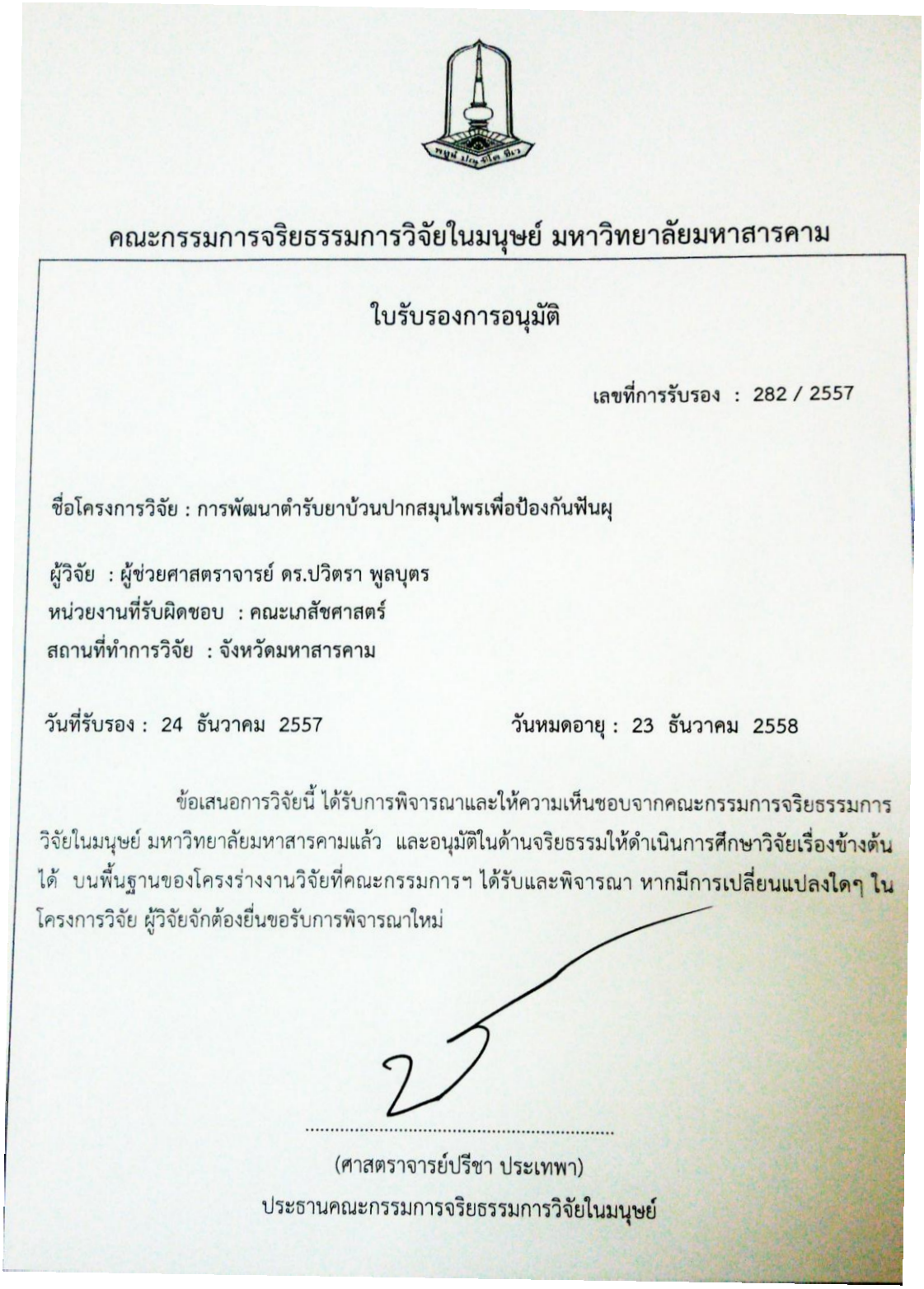
van Houte J. Role of Micro-organisms in Caries Etiology. J Dent Res 1994;73(3):672-81.

Vierrou AM, Manwell MA, Zamek RL, Sachdeva RC, Tinanoff N. Control of *Streptococcus mutans* with topical fluoride in patients undergoing orthodontic treatment. J Am Dent Assoc. 1986;113(4):644-6.

Walker L. Factors influencing taste perception. Fona International. Available from http://www.fona.com/sites/default/files/WhitePaper_Factors%20Influencing%20Taste%20Perception.pdf. Accessed on 7th July 2015.

Wittschier N, Faller G, Hensel A. Aqueous extracts and polysaccharides from Liquorice roots (*Glycyrrhiza glabra* L.) inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. J Ethnopharmacol. 2009;125(2):218-23.

ภาคผนวก



คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ใบรับรองการอนุมัติ

เลขที่การรับรอง : 282 / 2557

ชื่อโครงการวิจัย : การพัฒนาตำรับยาบ้วนปากสมุนไพรเพื่อป้องกันฟันผุ

ผู้วิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวิตรา พูลบุตร
หน่วยงานที่รับผิดชอบ : คณะเภสัชศาสตร์
สถานที่ทำการวิจัย : จังหวัดมหาสารคาม

วันที่รับรอง : 24 ธันวาคม 2557 วันหมดอายุ : 23 ธันวาคม 2558

ข้อเสนอการวิจัยนี้ ได้รับการพิจารณาและให้ความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามแล้ว และอนุมัติในด้านจริยธรรมให้ดำเนินการศึกษาวิจัยเรื่องข้างต้นได้ บนพื้นฐานของโครงร่างงานวิจัยที่คณะกรรมการฯ ได้รับและพิจารณา หากมีการเปลี่ยนแปลงใดๆ ในโครงการวิจัย ผู้วิจัยจักต้องยื่นขอรับการพิจารณาใหม่

.....

(ศาสตราจารย์ปรีชา ประเทพา)
ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์