



ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดใบปับต่อเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวเทนส์
Antibacterial Efficacies of Leaf Extract of *Millingtonia hortensis* Linn on
Streptococcus mutans.

ลัดดา ตรีสุพัฒน์ศิลป์

กองทันตสาธารณสุข สำนักอนามัย กรุงเทพมหานคร 10400

Ladda Trisupatsil

Dental Health Division, Health Department, Bangkok 10400

Email : paetripat@gmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดใบปับและหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวเทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 (*Streptococcus mutans* DMST 18777) รูปแบบการวิจัยเป็นแบบการทดลอง โดยการนำใบปับมาสกัดด้วยเอทานอล ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวเทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 ด้วยวิธี อการ์ ดิสค์ ดิฟฟิวชัน (agar disc diffusion) รวมทั้งหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบปับด้วยวิธี อการ์ ไดลูชัน (agar dilution) วิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว กำหนดค่าระดับนัยสำคัญ 0.01

ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดใบปับมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวเทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 โดยมีค่าความกว้างของบริเวณยับยั้ง 11.87 มิลลิเมตร ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบปับ 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวเทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777

คำสำคัญ : ปับ สเตรปโตค็อกคัส มิวเทนส์ อการ์ ดิสค์ ดิฟฟิวชัน

Abstract

The purpose of this paper was to study the antibacterial efficacy and determine the minimal inhibitory concentration of *Millingtonia hortensis* leaf extract on *Streptococcus mutans* DMST 18777. The research model was an experimental design. *Millingtonia hortensis* leaves were extracted with 95% ethanol to assess the antibacterial activity with agar disc diffusion method. The minimal inhibitory concentration of *Millingtonia hortensis* leaf extract was examined by agar dilution method. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance, with the level of significance of 0.01.

We found that *Millingtonia hortensis* leaf extract was able to inhibit *Streptococcus mutans* DMST 18777. The inhibition zone diameter was 11.87 mm. Minimal inhibitory concentration of *Millingtonia hortensis* leaf extract was 40 mg/mL.

Keywords : *Millingtonia hortensis*, *Streptococcus mutans*, agar disc diffusion



บทนำ

โรคในช่องปากที่เป็นปัญหาสำคัญคือ ฟันผุ สภาวะช่องปากมักเกี่ยวข้องกับสภาวะความเป็นอยู่โดยทั่วไป และสัมพันธ์กับคุณภาพชีวิตของประชากร สภาวะต่อสุขภาพช่องปากมีความสัมพันธ์กับโรคทางระบบ เช่น โรคของหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis)⁽¹⁻³⁾ จากการสำรวจสภาวะช่องปากแห่งชาติของสำนักทันตสาธารณสุข กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข^(4,5) เมื่อปี พ.ศ. 2560 ในกลุ่มประชากรช่วงอายุต่าง ๆ ของประเทศไทย พบว่า กลุ่มอายุ 3 ปี มีความชุกในการเกิดโรคฟันผุ ร้อยละ 52.9 กลุ่มอายุ 5 ปี มีความชุกในการเกิดโรคฟันผุ ร้อยละ 75.6 กลุ่มอายุ 12 ปี ความชุกในการเกิดโรคฟันผุ ร้อยละ 52 มีฟันผุที่ยังไม่ได้รับการรักษา ร้อยละ 31.5 กลุ่มอายุ 15 ปี ความชุกในการเกิดโรคฟันผุ ร้อยละ 62.7 มีฟันผุที่ยังไม่ได้รับการรักษา ร้อยละ 40.1 กลุ่มวัยทำงานอายุ 35-44 ปี มีฟันผุที่ยังไม่ได้รับการรักษา ร้อยละ 43.3 มีการสูญเสียฟันร้อยละ 85.3 และกลุ่มผู้สูงอายุ 60-74 ปี มีฟันผุที่ยังไม่ได้รับการรักษา ร้อยละ 52.6 มีการสูญเสียฟัน ร้อยละ 96.8

แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคฟันผุ คือ สเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ทั้งในที่ที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) พบได้ในผู้ที่มีภาวะติดเชื้อในกระแสโลหิต (bacteremia) รวมทั้งในผู้ที่มีการอักเสบของผนังและลิ้นหัวใจ (infective endocarditis)⁽⁶⁾ อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคในช่องปากมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะและเคมีที่ใช้บำบัดรักษา (chemotherapeutics) รวมทั้งมีการเพิ่มขึ้นของการติดเชื้อฉวยโอกาสในกลุ่มที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง^(7,8) ถึงแม้จะมีการใช้ยาปฏิชีวนะและเคมีต่าง ๆ เพื่อรักษาโรคในช่องปาก แต่ยาปฏิชีวนะและเคมีเหล่านี้อาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปาก และก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ เช่น อาเจียน ท้องเสีย และคราบติดบนตัวฟัน⁽⁹⁾ หรือในกรณีของเอทานอล (ethanol) ซึ่งพบในน้ำยาบ้วนปาก จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งช่องปากได้ (oral cancer)⁽¹⁰⁾ ดังนั้น จึงได้มีการพิจารณาทางเลือกใหม่ในการใช้สมุนไพรหรือสารสกัดจากพืชเพื่อเป็นทางเลือกในการรักษาและป้องกันโรคในช่องปาก มีการศึกษาวิจัยอย่างมากมายเกี่ยวกับพืชสมุนไพรที่นำมารักษาโรค รวมทั้งโรคในช่องปาก เนื่องจากมีความปลอดภัย และไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ นอกจากนั้นยังเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้ายาจากต่างประเทศด้วย

ป๊อบเป็นพืชที่พบแพร่หลายทั่วไป มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า มิลลิงโทเนีย ฮอเรนซิส (*Millingtonia hortensis* Linn) วงศ์ บิกโนเนียเซีย (Bignoniaceae) ชื่อสามัญว่า Indian cork tree ชื่อพื้นเมืองต่าง ๆ เช่น กาชะลอง กาดสะลอง เต็กตองไฟ ป๊อบเป็นไม้ยืนต้นสูงประมาณ 5-10 เมตร ลำต้นตั้งตรง ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก ดอกเป็นช่อกระจุกแยกแขนง กลีบดอกสีขาวมีกลิ่นหอม ป๊อบเป็นพืชที่มีสรรพคุณสามารถนำมาใช้รักษาโรคได้⁽¹¹⁾ รากใช้รักษาวัณโรค บำรุงปอด ดอกใช้รักษาหอบหืด และไข่น้ำส้ม ใบใช้รักษาไข่น้ำส้ม⁽¹¹⁾ ส่วนของใบตรวจพบว่าประกอบด้วย ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แทนนิน (tannin) อัลคาลอยด์ (alkaloids) Jetty & Iyengar⁽¹²⁾ ได้ศึกษาวิจัยสารสกัดจากใบป๊อบด้วยเมทานอลผสมน้ำ (aqueous methanol) ในอัตราส่วน 1:1 พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล เอ็นซีไอเอ็ม 2345 (*Escherichia coli* NCIM 2345) บาซิลลัส ซับทิลิส เอ็นซีไอเอ็ม 2329 (*Bacillus subtilis* NCIM 2329) ซาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียม เอ็นซีไอเอ็ม 1535 (*Salmonella typhimurium* NCIM 1535) เคลบเซลลา แอโรจีเนส เอ็นซีไอเอ็ม 2386 (*Klebsiella aerogenes* NCIM 2386) สตาฟิโลค็อกคัส ออเรียส เอ็นซีไอเอ็ม 2079 (*Staphylococcus aureus* NCIM 2079) แคนดิดา อัลบิแคนส์ เอ็มทีซีซี 227 (*Candida albicans* MTCC 227) โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ 0.00625, 0.0125, 0.0125, 0.025, 0.05 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ Banavar et al.⁽¹³⁾ ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ เอทีซีซี 25175 ของสารสกัดสมุนไพรด้วยเมทานอล พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลของกิ่งมะม่วงและยูคาลิปตัส ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ เอทีซีซี 25175 โดยมีค่าความกว้างของบริเวณยับยั้ง 16 ± 1.0 และ 11.2 ± 0.25 มิลลิเมตร ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ 0.256 และ 1.024 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ



Chiewpattanakul et al.⁽¹⁴⁾ ได้ศึกษาสารสกัดด้วยเอทานอลของสมุนไพรจำนวน 5 ชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ พบว่าสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ สูงที่สุด รองลงมาคือขมิ้นชัน มะรุมและโหระพา ส่วนสารสกัดจากใบบัวบกไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ แต่อย่างใด

ปัทมาวดี เสตะกัณณะ และคณะ⁽¹⁵⁾ ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 22 ชนิด ของสมุนไพรจำนวน 20 ชนิด พบว่าสมุนไพรจำนวน 17 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และได้สรุปแนะนำว่าสมุนไพร 7 ชนิดที่สมควรนำไปศึกษาวิจัยต่อไปเพื่อประโยชน์ต่อการพัฒนาการผลิตยาได้แก่ กะเม็ง กระเจียวแดง โด่ดอกขาว ผักขมหิน ยมหิน เหงือกปลาหมอ และป๊อบ และพบว่า สารสกัดจากใบป๊อบมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อพาสเจอร์เรลลา (*Pasteurella* sp.) โปรเทียส วัลการิส (*Proteus vulgaris*) ชิเกลลา ดิสเซนเทอร์เรีย (*Shigella dysenteriae*) วิบริโอ คอเลอเร (*Vibrio cholerae*) ไมโครค็อกคัส (*Micrococcus* sp.) สตาฟีโลค็อกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) สตาฟีโลค็อกคัส อีพิดERMิดิส (*Staphylococcus epidermidis*) และแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*Candida albicans*) การศึกษาทดสอบนี้ไม่ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์

อย่างไรก็ตาม การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาสารสกัดสมุนไพรจากใบป๊อบต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในช่องปากเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและเป็นแนวทางในการนำสารสกัดสมุนไพรนี้มาพัฒนาเพื่อประโยชน์ในการป้องกันโรคฟันผุ หรืออาจนำมาเป็นส่วนผสมในยาสีฟันหรือน้ำยาบ้วนปากเพื่อช่วยป้องกันโรคฟันผุ ซึ่งเป็นปัญหาทางทันตสาธารณสุขที่สำคัญของชาติต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดใบป๊อบและหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการทดลองศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบผลของสารสกัดใบป๊อบ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 ของสารสกัดใบป๊อบ ด้วยวิธีอการ์ ดิสก์ ดิฟฟิวชัน (agar disc diffusion)⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1.1 การสกัดสารจากใบป๊อบ⁽¹⁹⁾ นำใบป๊อบมาอบให้แห้งในตู้อบความร้อน อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อบให้แห้งสนิทแล้ว จึงนำมาบดให้เป็นผงละเอียด โดยผงใบป๊อบแห้งมีน้ำหนัก 826.34 กรัม ทำการพรมให้เปียกด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 (บริษัท Labscan Ireland Ltd.) ตั้งทิ้งไว้ในถังหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้ว นำมาบรรจุลงในถุงผ้า แล้วใส่ลงไปในถังสกัด เติมเอทานอลให้ท่วมถุงผ้า โดยเอทานอลที่ใช้ปริมาตร 2.5 ลิตร หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ระหว่างการหมักให้เขย่งสารสกัด และเติมสารสกัดกลับเข้าไปในถังสกัดเพื่อให้เกิดการหมุนเวียน เมื่อครบ 48 ชั่วโมง ทำการไขสารสกัดกรองผ่านสำลี และเก็บสารสกัดที่ได้ใส่ไว้ในถังสแตนเลสเพื่อรอการระเหย จากนั้นเติมเอทานอลลงในถังสกัดอีกเพื่อทำการสกัดซ้ำให้ได้ครบ 3 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดมาทำการระเหยให้แห้งภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ⁽¹⁵⁾ (rotary evaporator, บริษัท Buchi, Switzerland) จะได้สารสกัดใบป๊อบจากการสกัดด้วยเอทานอล น้ำหนัก 121.79 กรัม

1.2 การเตรียมสารสกัดใบป๊อบ นำสารสกัดใบป๊อบที่ได้มาเติมด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเพื่อปรับให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้น 800 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นหยดสารสกัดใบป๊อบลงบนแผ่นกระดาษช้วงกลมที่ปราศจากเชื้อ (sterile blank disc, บริษัท BBL™, England) โดยให้แผ่นกระดาษช้วงกลมที่ปราศจากเชื้อมีความเข้มข้นของสารสกัดใบป๊อบ 25 มิลลิกรัม/แผ่น



1.3 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ สเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้มาจากศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์แห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (Culture Collection for Medical Microorganism Department of Medical Sciences Thailand; DMST) นำเชื้อจุลินทรีย์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะหัวเชื้อเริ่มต้น (inoculum) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 เลี้ยงในอาหารเหลวหมัลเลอร์ อินตัน บรธ (Mueller Hinton broth, บริษัท Difco, USA) ในสภาวะใช้ออกซิเจนโดยบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มเพาะ นำเชื้อมาปรับปริมาณให้ได้ 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ด้วยอาหารเพาะหัวเชื้อเริ่มต้น⁽¹⁸⁾ โดยเปรียบเทียบความขุ่น (turbidity) กับแมคฟาร์แลนด์มาตรฐานหมายเลข 0.5 (McFarland's standard no.0.5)^(13,16,18)

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 ของสารสกัดใบปีบ เปรียบเทียบกับแผ่นยาอม็อกซิซิลิน (amoxicillin) เตรียมจานอาหารทดสอบของเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร วางไว้ให้แห้งตัวที่อุณหภูมิห้อง โดยอาหารทดสอบเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 คือ อาหารวุ้นแข็ง หมัลเลอร์ อินตัน (Mueller Hinton agar, บริษัท Difco, USA) ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ จุ่มลงในหลอดทดลองที่มีเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ปรับปริมาณเชื้อแล้ว บิดหมาด ๆ กับข้างหลอด แล้วป้ายให้ทั่วลงไปในจานอาหารทดสอบ (sterile cotton swab inoculation)⁽¹⁶⁾ นำแผ่นกระดาษขั้ววงกลมที่มีสารสกัดใบปีบความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/แผ่น และแผ่นยามาตรฐานซึ่งได้แก่ แผ่นยาอม็อกซิซิลิน (amoxycillin disc, บริษัท Oxoid, England) ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/แผ่น วางบนผิวหน้าอาหารทดสอบ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะใช้ออกซิเจน มีแผ่นยาอม็อกซิซิลินเป็นตัวควบคุมที่ได้ผล (positive control) และแผ่นกระดาษขั้ววงกลมชุบน้ำกัลที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมที่ไร้ผล (negative control) ทำการทดลองดังกล่าวซ้ำ 5 ครั้ง ตรวจสอบและบันทึกผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 ของสารสกัดใบปีบ และแผ่นยาอม็อกซิซิลิน ด้วยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ด้วยเวอร์เนียร์ คาลิเปอร์ (Vernier caliper, บริษัท Guogen, China) หน่วยวัดเป็นมิลลิเมตร

3. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 ของสารสกัดใบปีบด้วยวิธี อการ์ ไดลูชัน (agar dilution)^(15, 20) ที่ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

3.1 การเตรียมสารสกัดใบปีบ เตรียมสารสกัดใบปีบที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 800 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำมาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อในอัตราส่วน 1:20 1:40 และ 1:80 ซึ่งจะได้สารสกัดใบปีบที่มีความเข้มข้น 40, 20, 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

3.2 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ทำเช่นเดิม นำเชื้อมาปรับปริมาณให้ได้ 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ด้วยน้ำเกลือ⁽¹⁸⁾ ซึ่งมีความเข้มข้นร้อยละ 0.9 โดยเปรียบเทียบความขุ่นกับแมคฟาร์แลนด์มาตรฐานหมายเลข 0.5^(13,16,18)

3.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบปีบ เตรียมจานอาหารทดสอบปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยอาหารวุ้นแข็งที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 18 มิลลิลิตร และสารละลายสารสกัดใบปีบที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำมาหลอมที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ให้แห้งตัวที่อุณหภูมิห้อง สำหรับอาหารวุ้นแข็งของสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 คืออาหารวุ้นแข็ง หมัลเลอร์ อินตัน ตัวควบคุมที่ไร้ผล คือ จานอาหารทดสอบที่มีเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 ซึ่งใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อแทนสารสกัดใบปีบ และจานอาหารทดสอบที่มีเฉพาะเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 ทำการจุดหัวเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น (spot inoculation)⁽²¹⁻²³⁾ โดยการปิเปต (บริษัท Biohit, USA)

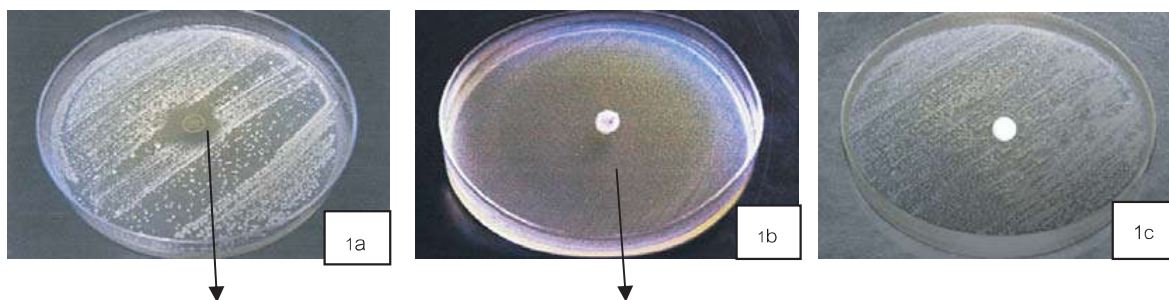
หัวเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนผิวหน้าของจานอาหารทดสอบ จากนั้นนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง ตรวจสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบปิบที่เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในจานอาหารทดสอบ

การวิเคราะห์ทางสถิติ การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (oneway analysis of variance) กำหนดค่าระดับนัยสำคัญที่ 0.01 และวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่ด้วยวิธีเชฟเฟ (Scheffe) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 ของสารสกัดใบปิบและแผ่นยาอม็อกซิซิลิน

ผลการวิจัย

ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 ของสารสกัดใบปิบ สารสกัดใบปิบที่ได้จะมีลักษณะเป็นสารสกัดหยาบสีเขียว ข้นหนืด และมีกลิ่นเฉพาะตัว เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 ระหว่างสารสกัดใบปิบ แผ่นยาอม็อกซิซิลิน และแผ่นกระดาษซับวงกลมชุบน้ำกัลันที่ปราศจากเชื้อ พบว่า ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังในตารางที่ 1 โดยสารสกัดใบปิบมีความกว้างของบริเวณยับยั้ง 11.87 มิลลิเมตร ดังปรากฏในรูปที่ 1a แผ่นยาอม็อกซิซิลินมีความกว้างของบริเวณยับยั้ง 53.71 มิลลิเมตร ดังปรากฏในรูปที่ 1b ขณะที่แผ่นกระดาษซับวงกลมชุบน้ำกัลันที่ปราศจากเชื้อไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ดังปรากฏในรูปที่ 1c

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบปิบ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบปิบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 เท่ากับ 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังปรากฏในรูปที่ 2 ขณะที่จานอาหารทดสอบที่มีเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 และน้ำกัลันที่ปราศจากเชื้อ รวมทั้งจานอาหารทดสอบที่มีเฉพาะเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 พบว่า เชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 สามารถเจริญเติบโตได้ในจานอาหารทดสอบ และไม่เกิดบริเวณยับยั้ง ตามตารางที่ 2



แถบวงกลมสีทึบเข้มคือบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ

พื้นที่ว่างกลมสีทึบเข้มคือบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ

รูปที่ 1 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสารสกัดใบปิบ (1a) แผ่นยาอม็อกซิซิลิน (1b) และแผ่นกระดาษซับวงกลมชุบน้ำกัลัน(1c) ต่อเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777

1a ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ของสารสกัดใบปิบ ปรากฏบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ

1b ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ของแผ่นยาอม็อกซิซิลิน ปรากฏบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อเป็นแถบที่เข้มรูปวงกลมขนาดใหญ่ในจานอาหารทดสอบ

1c ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ของแผ่นกระดาษซับวงกลมชุบน้ำกัลัน เชื้อสามารถเจริญได้ในจานอาหารทดสอบ



ไม่มีเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์

มีกลุ่มเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์

มีกลุ่มเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์

รูปที่ 2 ผลของสารละลายสารสกัดใบป๊อปที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ดีเอ็มเอสที่ 18777

- 2a คือสารสกัดใบป๊อปความเข้มข้นต่ำสุด 40 มก./มล. ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ โดยไม่มีการเจริญของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ในจานอาหารทดสอบ
- 2b คือสารสกัดใบป๊อปความเข้มข้น 20 มก./มล. มีการเจริญของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์บริเวณตรงกลางของจานอาหารทดสอบ
- 2c คือสารสกัดใบป๊อปความเข้มข้น 10 มก./มล. มีการเจริญของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์บริเวณตรงกลางของจานอาหารทดสอบ

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวและการวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่ด้วยวิธีเชฟเฟจากความแตกต่างของค่าเฉลี่ยความกว้างของบริเวณยับยั้งของสารสกัดใบป๊อป แผ่นยาอม็อกซิซิลิน และแผ่นกระดาษซับขั้ววงกลมชุบน้ำกลั่นต่อเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ดีเอ็มเอสที่ 18777

		Descriptive		ความกว้างของบริเวณยับยั้งของสารทดสอบ				
					99% Confidence Interval for Mean			
		Std.						
สารทดสอบ	N	Mean	Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
สารสกัดใบป๊อป	5	11.8680	0.25646	0.11469	11.340	12.396	11.48	12.11
แผ่นยาอม็อกซิซิลิน	5	53.7100	0.4203	0.18796	52.8446	54.5754	53.31	54.20
แผ่นกระดาษซับขั้ววงกลมชุบน้ำกลั่น	5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Total	15	21.8593	23.8471	6.1573	3.530	40.1886	0.00	54.20

ANOVA ความกว้างของบริเวณยับยั้งของสารทดสอบ					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7960.611	2	3980.305	49257.141	.000
Within Groups	0.970	12	0.081		
Total	7961.580	14			



Post Hoc Tests Multiple Comparisons Dependent Variable: ความกว้างของบริเวณยับยั้งของสารทดสอบ
Scheffe

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
สารสกัดใบปีบ	แผ่นยาหม้อกซีซิลิน	-41.8420 [*]	0.17979	0.0000	-42.5112	-41.1728
สารสกัดใบปีบ	แผ่นกระดาษซับ วงกลมชุบน้ำกลั่น	11.8680 [*]	0.17979	0.0000	11.1988	12.5372
แผ่นยาหม้อกซี ซิลิน	แผ่นกระดาษซับ วงกลมชุบน้ำกลั่น	53.710 [*]	0.17979	0.0000	53.0408	54.3792

^{*}The mean difference is significant at the 0.01 level.

I หมายถึง ความกว้างของบริเวณยับยั้งของสารทดสอบในคอลัมน์ I

J หมายถึง ความกว้างของบริเวณยับยั้งของสารทดสอบในคอลัมน์ J

I - J หมายถึงผลต่างของความกว้างของบริเวณยับยั้งของสารทดสอบในคอลัมน์ I และคอลัมน์ J

ตารางที่ 2ฤทธิ์ของสารสกัดใบปีบในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์						
เชื้อจุลินทรีย์	จำนวน ครั้งของ การ ทดสอบ	ความเข้มข้น ของสารสกัด ใบปีบ 10 มก./มล.	ความเข้มข้น ของสารสกัด ใบปีบ 20 มก./มล.	ความเข้มข้น ของสารสกัด ใบปีบ 40 มก./มล.	อาหารวัน แข็ง+น้ำกลั่น	อาหาร วันแข็ง
<i>S. mutans</i> DMST 18777	5	+	+	-	+	+

+ = มีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

- = ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

สรุปและอภิปรายผล

การทดลองศึกษานี้แตกต่างจากการทดลองของ Banavar et al.⁽¹³⁾ ซึ่งศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ เอทีซีซี 25175 ของสารสกัดสมุนไพรด้วยเมทานอล พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลของกิ่งมะม่วงและยูคาลิปตัสความเข้มข้น 2 มก. มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ เอทีซีซี 25175 โดยมีค่าความกว้างของบริเวณยับยั้ง 16 ± 10 และ 11.25 ± 0.25 มม. ตามลำดับ โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 0.25 และ 1.024 มก./มล. การทดลองให้ผลที่แตกต่างกันเนื่องจากการสกัดโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดสารสำคัญจากกิ่งมะม่วงและยูคาลิปตัส เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบต่างชนิดกันและต่างสายพันธุ์กันจึงให้ผลการทดสอบที่ไม่เหมือนกัน



การทดลองศึกษานี้แตกต่างจากการทดลองของ Janaki et al.⁽²⁴⁾ ซึ่งนำไปป้อนมาสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง (soxhlet extraction) ด้วยเอทานอล ศึกษาหาสารพิษทุกชนิดที่เป็นองค์ประกอบในใบป๊อป พบว่าประกอบด้วยแทนนิน ซาโปนิน (saponin) ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ และศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของสารสกัดใบป๊อปจากเอทานอล พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อซาลโมเนลลา ไทฟิ (*Salmonella typhi*) ชูโดโมแนส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) เอสเชอริเชีย โคไล และเคลบเซลลา นิวโมนี (*Klebsiella pneumonia*) โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เท่ากับ 10 มก./มล. 10 มก./มล. 15 มก./มล. และ 15 มก./มล. ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม Janaki et al. ไม่ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ การทดลองให้ผลที่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบต่างชนิดและต่างสายพันธุ์กัน

นอกจากนี้ยังมีผู้ทำการศึกษาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ด้วยสารสกัดสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ซึ่งให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดต่างกัน เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบต่างสายพันธุ์กัน ดังนี้

Saraya et al.⁽²⁵⁾ ได้ศึกษาสารสกัดด้วยน้ำของใบฝรั่งพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุด 5 มก./มล. สารสกัดใบฝรั่งขนาดความเข้มข้น 160 มก./มล. มีค่าความกว้างของบริเวณยับยั้ง 12.5 ± 0.71 มม.

Wongkham et al.⁽²⁶⁾ ได้ศึกษาพบว่า สารสกัดจากใบข่อยมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อคือ 2 มก./มล.

Saladyanant et al.⁽²⁷⁾ ศึกษาพบว่า สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้น 100 และ 150 มก./มล. สามารถฆ่าเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ได้

Torrungruang et al.⁽²⁸⁾ ศึกษาพบว่า สารสกัดจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุด 0.000625 มก./มล.

อย่างไรก็ตาม National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS)⁽²⁹⁾ ได้กำหนดมาตรฐานฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่มสเตรปโตค็อกคัส (*streptococcus*) ของยาแอมพิซิลิน (ampicillin) ขนาด 0.01 มก. ซึ่งเป็นยาในกลุ่มที่ใช้ในการรักษาโรคทางทันตกรรมและเป็นยาในกลุ่มเดียวกับยาอะม็อกซิซิลินที่ใช้ในการศึกษานี้ เนื่องจากไม่มีกำหนดมาตรฐานฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ของยาอะม็อกซิซิลินโดยตรง ยาแอมพิซิลินถือเป็นตัวแทนของยาในกลุ่มนี้ในการกำหนดมาตรฐานฤทธิ์ยับยั้งเชื้อกลุ่มสเตรปโตค็อกคัส ซึ่งได้แก่เชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ โดยพิจารณาจากค่าความกว้างของบริเวณยับยั้ง และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่มสเตรปโตค็อกคัส โดยยาแอมพิซิลินขนาด 0.01 มก. ควรมีความไว (susceptible) ต่อการยับยั้งเชื้อกลุ่มสเตรปโตค็อกคัส โดยมีค่าความกว้างของบริเวณยับยั้งมากกว่าหรือเท่ากับ 24 มม. และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาแอมพิซิลินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ คือน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.00025 มก./มล. จากการทดลองนี้พบว่าแผ่นยาอะม็อกซิซิลินขนาด 0.01 มก. มีค่าความกว้างของบริเวณยับยั้ง 53.71 มม. ขณะที่สารสกัดใบป๊อปมีค่าความกว้างบริเวณยับยั้ง 11.87 มม. และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ 40 มก./มล. ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์ของสารสกัดใบป๊อปกับยาแอมพิซิลินตามมาตรฐานของ NCCLS สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดใบป๊อปมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ แต่มีประสิทธิภาพน้อยกว่ามากเมื่อเทียบกับยาแอมพิซิลิน หากพิจารณานำไปใช้ในการรักษาโรคทางทันตกรรม ดังนั้น จึงอาจมีการศึกษาเพื่อพัฒนาสารสกัดใบป๊อปมาเป็นส่วนผสมในยาสีฟันหรือน้ำยาบ้วนปากเพื่อช่วยป้องกันโรคฟันผุ



สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า สารสกัดใบปีบมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 โดยมีค่าความกว้างของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 11.87 มิลลิเมตร ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบปีบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ดีเอ็มเอสที 18777 เท่ากับ 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ข้อเสนอแนะ

ควรจะมีการศึกษาและทำการวิเคราะห์แยกสารสกัดจากใบปีบเพื่อนำมาศึกษาวิจัยต่อไป โดยอาจศึกษาวิธีการสกัดในรูปแบบวิธีอื่นเพื่อให้ได้สารสำคัญของสารสกัดจากใบปีบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปาก รวมถึงศึกษากลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปาก เพื่อนำไปสู่การค้นคว้าพัฒนาสารสกัดสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปากที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคฟันผุ หรืออาจนำมาเป็นส่วนผสมในยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปากเพื่อช่วยป้องกันโรคฟันผุซึ่งเป็นปัญหาทางทันตสาธารณสุขที่สำคัญ เนื่องจากข้อมูลเกี่ยวกับสารสกัดใบปีบต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในช่องปากมีไม่มาก ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาวิจัยสารสกัดใบปีบต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคทั่วไปในมนุษย์ (pathogenic microbe) นอกจากนั้น ใบปีบที่ใช้ในการทดลองศึกษา ควรจะนำมาจากหลายแหล่งสถานที่ เพื่อให้เกิดความหลากหลายพันธุ์ของใบปีบ ซึ่งอาจทำให้ผลการทดลองมีความแตกต่างกัน ถึงแม้จะเป็นการทดสอบใบปีบชนิดเดียวกันก็ตาม และควรศึกษาการสกัดสารจากใบปีบโดยใช้ตัวทำละลายอื่น เช่น เมทานอล คลอโรฟอร์ม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ทันตแพทย์หญิง ศิริเพ็ญ อรุณประพันธ์ คุณรัตนศิริ จิวนานท์ คุณพงศธร หลิมศิริวงษ์ และเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่ให้ความช่วยเหลือในการทำการทดลองวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Petersen PE, Kwan S. Equity, social determinants and public health programmes – the case of oral health. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2011;39(6):481–7.
2. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ*. 2005;83(9):661–9.
3. Rautemaa R, Lauhio A, Cullinan MP, Seymour GJ. Oral infections and systemic disease-an emerging problem in medicine. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(11):1041–7.
4. Srisilapanan P, Nirunsittirat A, Roseman J. Trends over time in dental caries status in urban and rural Thai children. *J Clin Exp Dent*. 2017;19(10): e1201–6.
5. จิราพร ชิดดี, บรรณาธิการ. รายงานผลการสำรวจสภาวะสุขภาพช่องปากแห่งชาติ ครั้งที่ 8 ประเทศไทย พ.ศ. 2560. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร. สามเจริญพาณิชย์; 2561.
6. Lapidattanakul J. Serotypes of *Streptococcus mutans*. *J Dent Assoc Thai*. 2009;59(4):222–32.
7. Tichy J, Novak J. Extraction, assay, and analysis of antimicrobials from plants with activity against dental pathogens (*Streptococcus* sp.). *J Altern Complement Med*. 1998;4:39–45.



8. Badria FA, Zidan OA. Natural products for dental caries prevention. J Med Food. 2004;7:381-4.
9. Chung JY, Choo JH, Lee MH, Hwang JK. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. Phytomedicine. 2006;13:261-6.
10. McCullough MJ, Farah CS. The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes. Aust Dent J. 2008;53:302-5.
11. Kumari A, Sharma R.A. A Review on *Millingtonia hortensis* Linn. Int J Pharm Sci Rev Res. 2013; 17:85-92.
12. Jetty A, Iyengar DS. Antimicrobial activity of *Millingtonia hortensis* leaf extract. Pharm Biol. 2000;38(2):157-60.
13. Banavar RS, Nirupad S, Chippagiri P, Pandurangappa R. Antibacterial effects of natural herbal extracts on *Streptococcus mutans*: can they be potential additives in dentifrices? Int J Dent. 2017;2017:492164.
14. Chiewpattanakul P, Thongsong N, Suk-arj P, Kitisriworapan W. The Study of the efficiency of 5 herbal crude plant extracts and 0.12% chlorhexidine effecting to antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*. SWU Dent J. 2014;7(2):76-89.
15. ปัทมวดี เสตะกัญณะ, จารีย์ บันสิทธิ์, ธิดารัตน์ บุญรอด. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสมุนไพรไทย. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2545;44(2):110-124.
16. Kraivaphan P, Amomchat C, Tiratana T, Tandhachoon K, Soo-ampon S. The testing of *Acacia catechu* sequential extracts on *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. J Dent Assoc Thai. 1993;43(4):227-33.
17. Sutter VL, Citron DM, Finegold SM. Agar diffusion (disc) test: Susceptibility testing of anaerobes In: Hoffman S, editor. Wadsworth anaerobic bacteriology manual. 3rd ed. Belmont: Star Publishing Company; 1980. pp.76.
18. National Committee for Clinical and Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standards. 9th ed. NCCLS document M2-A9. Wayne, PA: National Committee for Clinical and Laboratory Standards; 2006:1-33.
19. Balakrishna T, Vidyadhara S, Sasidhar R, Ruchitha B, Prathyusha E. A review on extraction techniques. IAJPS. 2016;3(8):880-91.
20. Sutter VL, Citron DM, Edelstein MAC, Finegold SM. Agar dilution test : Susceptibility testing of anaerobes In: Hoffman S, editor. Wadsworth anaerobic bacteriology manual. 4th ed. Belmont: Star Publishing Company; 1985. pp.85-90.
21. Islam MA, Alam MM, Choudhury ME, Kobayashi N, Ahmed MU. Determination of minimum inhibitory concentration (mic) of cloxacillin for selected isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (mrsa) with their antibiogram. Bangl J Vet Med. 2008;6(1):121-6.



22. Agah S, Fereshtehnejad S-M, Yousefnejad A, Siavashi F. Antimicrobial activity of ketoconazole and fluconazole against metronidazole resistance strains of *Helicobacter pylori*. IJPT. 2008;7(1):57-60.
23. Khan AU, Sultan A, Tyagi A, Zahoor S, Akram M, Kaur S, et al. Amplification of mecA gene in multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* strains from hospital personnel. J Infect Dev Ctries. 2007;1(3):289-95.
24. Janaki A, Kaleena PK, Elumalai D, Hemalatha P, Babu M, Velu K, et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of *Millingtonia hortensis* (L). Int J Curr Pharm Res. 2017;9(5):162-7.
25. Saraya S, Kanta J, Sarisuta N, Temsiririrkkul R, Suvathi Y, Samranrit K, et al. Development of guava extract chewable tablets for anticariogenic activity against *Streptococcus mutans*. Pharm Sci Asia. 2008;35(1):18-23.
26. Wongkham S, Laupattarakasaem P, Pienthaweechai K, Areejitranusorn P, Wongkham C, Techanitiswad T. Antimicrobial activity of *Streblus asper* leaf extract. Phytother Res. 2001;15:119-21.
27. Saladyanant T, Hongprasong N, Pongsamart S, Apinhasmit W, Thunyakitpisal P. Polysaccharide gel from durian fruit-hull extracts: antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. CU Dent J. 2007;30:235-44.
28. Torrungruang K, Vichienroj P, Chutimaworapan S. Antibacterial activity of mangosteen pericarp extract against cariogenic *Streptococcus mutans*. CU Dent J. 2007;30:1-10.
29. National Committee for Clinical and Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing : approved standards. 27th ed. NCCLS document M100. Wayne, PA: National Committee for Clinical and Laboratory Standards; 2017:85.