ผลของสารสกัดว่านหางจระเข้ต่อเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

ณัฐพล โรจน์เพ็ญเพียร*, บรรเจิด ยะพงศ์* สุวรรณา จิตภักดีบดินทร์*,****

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาผลของสารสกัดว่านหางจระเข้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและยับยั้งการเจริญ การทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส การยับยั้งการสร้างกรด และการยึดเกาะของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ATCC 25175

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ: สารสกัดว่านหางจระเข้แบบผงผสมน้ำนำมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (MBC) ของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ATCC 25175 ด้วยวิธีการไมโครบรอธไดลูชั่น หลังจากนั้นนำสารสกัดว่านหางจระเข้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ และระดับต่ำกว่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (1/2, 1/4 และ 1/8 ของสารสกัดว่านหางจระเข้) นำมาทดสอบการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสโดยคำนวณปริมาณกลูแคนที่เกิดขึ้น การทดสอบการยับยั้งการสร้างกรดโดยวิธีการวัดค่าพีเอชในช่วงเวลา 0-150 นาที และการทดสอบการยึดเกาะของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ATCC 25175 โดยการย้อมคริสตัลไวโอเลต

ผลการทดลอง ความเข้มข้นขั้นต่ำสุดในการยับยั้งของสารสกัดว่านหางจระเข้คือ 125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งแสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตที่ 6-10 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้หลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง และไม่สามารถระบุความเข้มข้นสูงสุดของการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ ที่ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งของสารสกัดว่านหางจระเข้ไม่แสดงผลการยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส นอกจากนี้ ความเข้มข้นขั้นต่ำสุดในการยับยั้งที่ 1/2, 1/4 และ 1/8 ของสารสกัดว่านหางจระเข้ไม่แสดงผลการยับยั้งการผลิตกรดของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ATCC 25175 อย่างไรก็ตาม สารสกัดว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งและระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าความเข้มข้นขั้นต่ำสุดในการยับยั้ง สามารถยับยั้งการยึดเกาะเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ATCC 25175

สรุป: สารสกัดว่านหางจระเข้ที่สกัดด้วยน้ำสามารถยับยั้งการยึดเกาะเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ATCC 25175

คำสำคัญ: ว่านหางจระเข้ การยึดเกาะของแบคทีเรีย โรคฟันผุ เชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

**สาขาวิชาชีววิทยาช่องปากและระบบการบดเคี้ยว, **หน่วยวิจัยเซลล์วิทยาและชีววัสดุ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เลขที่ 15 ถ.กาญจนวณิชย์ ต.คอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110*

The Effects of Aloe Vera Extract on *Streptococcus Mutans*

Nattapon Rotpenpian*, Bunjird Yapong* Suwanna Jitpukdeebodintra*,****

Abstract

Objective: To study the effect of aloe vera extract on bactericidal activity, growth inhibition, glucosyltransferase enzyme activity, inhibition of acid production and adhesion of *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Materials and Methods: Aqueous aloe vera extract was determined minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) to *Streptococcus mutans* ATCC 25175 by a broth microdilution method. Then, at MIC and sub-MIC levels (1/2, 1/4 and 1/8) of aloe vera extract, activity of glucosyltransferase enzyme was determined by the production of glucan level. The inhibition of acid production was determined by pH measurement at 0-150 min, and the inhibition of adhesion of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 was performed by crytal violet staining.

Results: The MIC of aloe vera extract was 125 mg/ml, which showed growth inhibition effect at 6-10 hours. However, it cannot inhibit growth of bacteria after 24 hours and MBC could not be determined. At minimum inhibitory concentration of aloe vera extract did not show an inhibitory effect on glucosyltransferase enzyme activity; moreover, the 1/2, 1/4 and 1/8 of MIC of aloe vera extract did not show an inhibitory effect on acid production of *Streptococcus mutans* ATCC 25175. However, at MIC and sub-MIC levels, aloe vera extract showed an inhibitory effect on adhesion of *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Conclusion: Aqueous aloe vera extract can inhibit adhesion of *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Keywords: Aloe vera, Bacterial adhesion, Dental caries, *Streptococcus mutans*

**Department of Oral Biology and Occlusion, **Cell Biology and Biomaterial Research Unit, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University,15 Kanjanavanit Rd., Korhong, Hatyai, Songkhla, 90110 Thailand.*

บทนำ (Introduction)

โรคฟันผุ (dental caries, tooth decay) เกิดจากแบคทีเรียที่ก่อโรคในคราบจุลินทรีย์บนผิวฟันเปลี่ยนน้ำตาลจากอาหารหรือเครื่องดื่มให้กลายเป็นกรดซึ่งทำลายผิวฟันตลอดเวลา (1,2) เชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) เป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ (3) คุณสมบัติของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ สามารถสร้างกรดอินทรีย์โดยเกิดจากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตจากอาหารที่ตกค้างในช่องปากผ่านกระบวนการไกลโคไลติก (glycolytic pathway) กรดอินทรีย์ที่ได้จากสารอาหารแต่ละประเภทแตกต่างกันไป ยกตัวอย่างเช่น กรดกลูโคโรนิก (glucuronic acid) จากสารอาหารประเภทน้ำตาลและคาร์โบไฮเดรทแบบไม่หมัก (non-fermentable carbohydrate) หรือ กรดแลคติก (lactic acid) จากสารอาหารประเภทน้ำตาลและคาร์โบไฮเดรทแบบหมัก (fermentable carbohydrate) (2-4) กรดอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการดังกล่าวจะเพิ่มความเป็นกรดในแผ่นคราบจุลินทรีย์จนกระทั่งค่า pH ต่ำกว่า 5.5 ซึ่งเป็นค่า critical pH ทำให้ผิวเคลือบฟันเกิดการสูญเสียแร่ธาตุเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดฟันผุ (4) นอกจากคุณสมบัติการสร้างกรดของเชื้อแบคทีเรียแล้ว ตัวเชื้อสามารถอยู่ได้ในสภาวะที่เป็นกรดได้ถึง pH เท่ากับ 3 โดยสามารถยึดเกาะบนผิวฟันได้ผ่านการสังเคราะห์สารยึดติดเป็นเอกซ์ตราเซลลูลาร์พอลิเมอร์ (extracellular polymer) (5) สารยึดติดกับฟันที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้นก่อให้เกิดการยึดเกาะของแบคทีเรียกับผิวเคลือบฟัน รวมถึงการยึดแบคทีเรียให้เป็นกลุ่มก้อน และประกอบกันเป็นแผ่นคราบจุลินทรีย์ (biofilm) ดังนั้น ลักษณะที่เชื้อมีความสามารถในการยึดเกาะ คือความสามารถในการสร้างแผ่นคราบจุลินทรีย์ โดยจะมีผลทำให้เกิดโรคฟันผุได้

นอกจากนี้เอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferase: GTF) ทำหน้าที่เปลี่ยนซูโครสเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส และสร้างกลูแคนชนิดไม่ละลายน้ำจากกลูโคส ซึ่งกลูแคนชนิดนี้สามารถเคลือบอยู่บนผิวฟัน กระบวนการดังกล่าวข้างต้นส่งผลให้เชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ สามารถยึดเกาะอยู่บนผิวฟันและการเกิดคราบจุลินทรีย์ น้ำตาลจึงสามารถแพร่เข้าไปอยู่ในคราบจุลินทรีย์ได้เพิ่มขึ้นและแบคทีเรียสามารถสร้างกรดอินทรีย์ได้เพิ่มขึ้นเช่นกัน จากกระบวนดังกล่าวส่งผลให้เกิดการทำลายผิวเคลือบฟัน เนื้อฟัน และส่งผลต่อการเกิดโรคฟันผุอย่างต่อเนื่อง (6,7)

วิธีในการกำจัดแผ่นคราบจุลินทรีย์ที่มีการสะสมอยู่บนตัวฟันที่สำคัญคือ การกำจัดโดยกายภาพ การกำจัดโดยใช้สารเคมี และการกำจัดโดยใช้ยาต้านจุลชีพในปัจจุบันการใช้สมุนไพรเพื่อการรักษากลับมาเป็นที่นิยมและมีบทบาทอีกครั้ง เนื่องจากเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติหาได้ง่าย เป็นที่ยอมรับทั่วไป มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียและมีผลข้างเคียงต่ำ (8,9) โดยสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญคือสารประกอบฟีนอลลิก (phenolics compound) (10) สารประกอบฟีนอลลิกพบในพืชสมุนไพร เช่น ว่านหางจระเข้ (aloe vera) เป็นต้น

ว่านหางจระเข้จัดอยู่ในวงศ์ *Asphodelaceae* มีสรรพคุณใช้ในการรักษาแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก ผิวที่เกิดอาการระคายเคือง สามารถใช้รักษาอาการภายในได้ด้วย (11) เช่น รักษาอาการท้องผูก ไอ แผลในกระเพาะอาหาร โรคเบาหวาน อาการปวดหัว โรคข้ออักเสบ ระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง และอาการคลื่นไส้ (12) จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบสารกลุ่มฟีนอลลิก เช่น (tannins) และไกลโคไซด์ (glycoside) (13) สารในกลุ่มสเตอร์รอยด์ (steroid) และเอนไซม์ (enzyme) (14) นอกจากนี้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการนำใบว่านหางจระเข้มาใช้ในการยับยั้งเชื้อต่าง ๆ ในช่องปาก เช่น ยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mitis* ที่เป็นส่วนหนึ่งทำให้เกิดโรคฟันผุได้ (15) ยับยั้งเชื้อ *Enterococcus faecalis* ซึ่งเป็นเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในการรักษาคลองรากฟันได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (16)

ว่านหางจระเข้ นั้นเป็นพืชที่ปลูกกันอย่างแพร่หลายเพื่อเป็นไม้ประดับ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในทุกฤดูกาล มีจำหน่ายทั่วไปตามท้องตลาด และจากคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิดของว่านหางจระเข้ในทางการแพทย์และทันตกรรม ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัด

ว่านหางจระเข้ เพื่อหาปริมาณที่มีผลในการฆ่าและยับยั้งเชื้อการยับยั้งการสร้างกรด การลดการทำงานของเอนไซม์ GTF และผลการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)

1. การเตรียมเลี้ยงเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

เลี้ยงเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (tryptic soy agar with 1% glucose) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ปรับให้ได้ความขุ่นของเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ให้ได้ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml

2. การเตรียมสารสกัดว่านหางจระเข้

สารสกัดว่านหางจระเข้ *Aloe Barbadensis* Leaf (ACTIVERA® 1-200, Chemipan Co., Ltd., กรุงเทพฯ) ซึ่งได้มาจากการสกัดด้วยน้ำเป็นตัวทำละลาย มีองค์ประกอบหลักคือ สารกลุ่มฟีโนลิก เช่น แทนนิน และไกลโคไซด์

3. วิธีการทดลอง

การหาความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC: minimum inhibitory concentration) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC: minimum bactericidal concentration)

เตรียมเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ให้มีความเข้มข้น 10^5 CFU/ml ในถาดหลุม (96-well plate) เพื่อทดสอบกับสารสกัดว่านหางจระเข้ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 750, 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีน้ำกลั่นเป็นกลุ่มควบคุมลบ และใช้สารละลายคลอเฮกซีดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร (0.05% v/v chlorhexidine) เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่า MIC คือค่าความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุดที่มีความขุ่นของเชื้อน้อยกว่า 0.05 จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ส่วนค่า MBC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ร้อยละ 99.9 มีเชื้อได้แต่ต้องไม่เกินร้อยละ 0.1 ซึ่งทดสอบจากการนำหลุมที่ไม่ขุ่นมาหาค่า MBC โดยการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (trypticase soy agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสังเกตด้วยตาเปล่า โดยที่ทดลองซ้ำทั้งหมดจำนวน 3 ครั้ง และทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ในแต่ละการทดลอง (17)

การทดสอบผลของสารสกัดต่อการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

เตรียมเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ให้ได้ปริมาณเชื้อความเข้มข้น 10^6 CFU/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB โดยนำเชื้อมา 600 ไมโครลิตร ผสมกับสารสกัดว่านหางจระเข้ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2, 1, 1/2, 1/4 และ 1/8 เท่าของ MIC และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (กลุ่มควบคุม) 600 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันแล้วนำมานับเชื้อเริ่มต้น โดยเจือจางในสารละลาย PBS (phosphate buffer saline) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่า pH 7.4 หลังจากนั้นนำเชื้อในหลอดทดลองโดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดเชื้อมาเจือจางและเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมานับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตอยู่และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ในแต่ละการทดลอง เพื่อศึกษาผลของสารสกัดต่อการเจริญของเชื้อ (17)

การทดสอบผลของสารสกัดต่อการทำงานของเอนไซม์ GTF

เอนไซม์ GTF สกัดจากเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ไว้เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง โดยนำเชื้อที่เลี้ยงไปหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดการตกตะกอนของเซลล์และนำของเหลวใสที่ได้ไปตกตะกอนเอนไซม์โดยการเติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) ความเข้มข้นร้อยละ 45 จากนั้นวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนที่ได้ในสารละลาย PBS แล้วนำไปผ่านกระบวนการกรอง และทำให้แห้งด้วยวิธีไลโอฟีไลซ์ (lyophilization) หลังจากนั้นนำผงที่ได้ไปละลายกับสารละลาย PBS ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่า pH 7.4 ให้ได้ความเข้มข้นของเอนไซม์ GTF เท่ากับ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบกับสารสกัดต่อไป (19)

การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ GTF กลุ่มควบคุมใช้น้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร ผสมกับอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ pH 5.5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและเอนไซม์ GTF ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ส่วนกลุ่มสารสกัดว่านห่างจระเข้ใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 1, 1/2, 1/4 และ 1/8 ของ MIC ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ pH 5.5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและเอนไซม์ GTF ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยที่ทำการทดสอบกลุ่มละ 3 ซ้ำ ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นยับยั้งปฏิกิริยาโดยการต้มที่ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที ดูดสารส่วนใส (supernatant) ทิ้ง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเช่นเดิม ล้างแบบนี้ 2 ครั้ง แล้วดูดสารส่วนใสทิ้ง และหาปริมาณกลูแคนจากการทำงานของเอนไซม์ GTF ด้วยวิธีฟีนอลซัลฟิวริก (phenol-sulfuric method) โดยเติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 150 ไมโครลิตรและสารละลายซัลฟิวริก ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วางให้เย็น หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร โดยคำนวณปริมาณกลูแคนซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงกิจกรรมของเอนไซม์ GTF และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมให้กลุ่มควบคุมมีค่าร้อยละการทำงานของเอนไซม์ GTF (% relative activity of GTF) เท่ากับ 100 และคำนวณเป็นค่าร้อยละความสัมพันธ์ของแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดว่านหางจระเข้ เป็นร้อยละการทำงานของเอนไซม์ GTF โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำในแต่ละการทดลอง (19)

การทดสอบผลของสารสกัดต่อการยับยั้งการสร้างกรดของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ เลี้ยงเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

นำเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ผสมกลูโคส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าที่ 1,300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาหมุนเหวี่ยงเอาเซลล์ตะกอนของเชื้อที่ 7,000 รอบต่อนาที 30 นาที 4 องศาเซลเซียส

หลังจากนั้นล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 135 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง แล้วนำตะกอนเซลล์ทั้งหมดมาแขวนลอยในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ และเตรียมสารสกัดว่านหางจระเข้ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1/2, 1/4 และ 1/8 เท่าของ MIC กลุ่มควบคุมเชิงบวกใช้สารละลายคลอเฮกซีดีน ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กลุ่มควบคุมเชิงลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำมาปรับค่า pH เริ่มต้นให้ได้ pH 7.0 ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ แล้วเติมสารละลายกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำเชื้อดังกล่าวไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบ่งเชื้อที่เลี้ยงมาวัดค่า pH ที่เวลา 0, 30, 60, 90, 120, 150 นาที โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำในแต่ละการทดลอง ค่า pH ที่น้อยกว่า 7 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีการสร้างกรด หากค่า pH ที่อ่านได้มากกว่า 7 แสดงว่า สารสกัดสามารถยับยั้งการสร้างกรดจากเชื้อได้ (20)

การทดสอบผลของสารสกัดต่อการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

เลี้ยงเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ผสมซูโครสร้อยละ 1 ใน polystyrene microplate 48 หลุม โดยปรับให้แต่ละหลุมมีเชื้อ 10^7 CFU/ml ใช้สารสกัดว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1, 1/2, 1/4 และ 1/8 เท่าของ MIC โดยในส่วนควบคุม (blank) ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ผสมซูโครส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร กลุ่มควบคุมลบประกอบด้วย เชื้อ 10^7 CFU/ml ปริมาตร

200 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 200 ไมโครลิตร กลุ่มควบคุมบวกประกอบด้วยเชื้อ 10^7 CFU/ml ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ ร้อยละ 0.1 โซเดียมฟลูออไรด์ (sodium fluoride) 200 ไมโครลิตร กลุ่มทดสอบประกอบด้วยเชื้อ 10^7 CFU/ml ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และสารสกัดว่านหางจระเข้แต่ละความเข้มข้น 200 ไมโครลิตร (ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ) นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ล้างเบา ๆ) ครั้งละ 300 ไมโครลิตรแล้วหยดร้อยละ 0.1 คริสตัลไวโอเลต (crystal violet) ลงในหลุม หลุมละ 250 ไมโครลิตร ตั้งไว้ 15 นาที ซับสารออก ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 300 ไมโครลิตร แล้วหยดร้อยละ 99 เอทานอล ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำในแต่ละการทดลอง โดยประเมินผลการยึดเกาะจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรและคำนวณร้อยละการยึดเกาะเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ (18,20)

4. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

สถิติที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลในการศึกษานี้เลือกใช้สถิตินอนพาราเมตริก Kruskal-Wallis H test ร่วมกับการเปรียบเทียบพหุคูณ (multiple Comparison) โดยใช้วิธีทดสอบแบบ Dunnett T3 ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

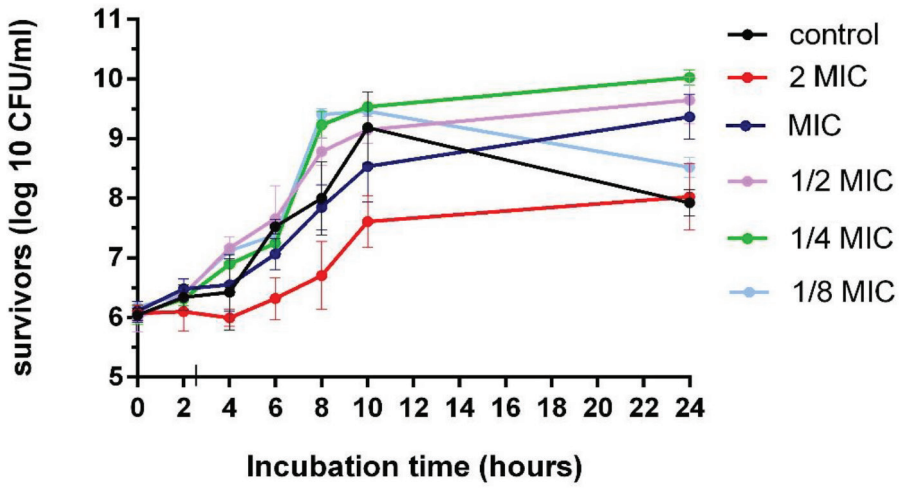
ผลการทดลอง (Results)

การทดสอบหาค่า MIC และค่า MBC ของสารสกัดว่านหางจระเข้ต่อเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

ผลการศึกษาหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดว่านหางจระเข้ พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MBC มากกว่า 750 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดว่านหางจระเข้ต่อการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

จากการศึกษาผลของสารสกัดว่านหางจระเข้ที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันตั้งแต่ ความเข้มข้น 2, 1, 1/2, 1/4 และ 1/8 เท่าของ MIC เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของ log CFU/ml ที่เวลา 2-24 ชั่วโมง สารสกัดว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้น 2 และ 1 เท่า ของ MIC พบว่า ผลทำให้การเจริญของเชื้อมีแนวโน้มลดลงในช่วง 6-10 ชั่วโมงแรก แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงพบว่าสารสกัดว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้น 2 และ 1 เท่าของ MIC การเจริญของเชื้อไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ในทุกช่วงเวลา สารสกัดว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้น 1/2, 1/4 และ 1/8 เท่าของ MIC การเจริญของเชื้อไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วยเช่นกัน (รูปที่ 1)

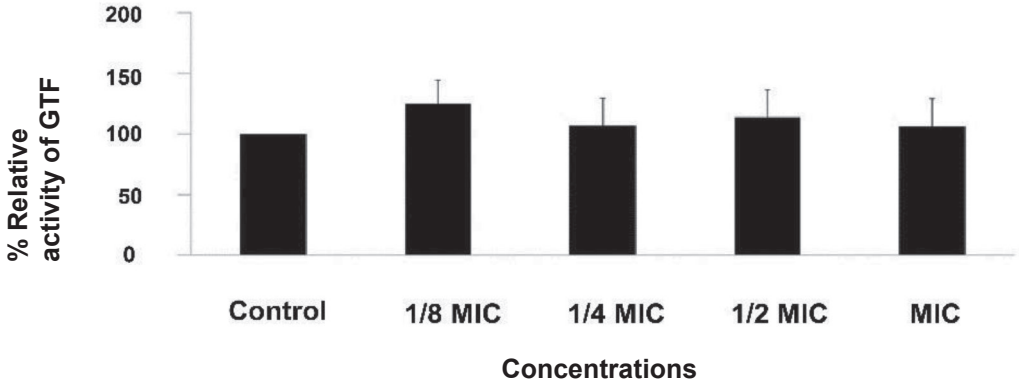


รูปที่ 1 ผลของสารสกัดว่านหางจระเข้ต่อการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ในหน่วย log CFU/ml (mean ± SD)

Fig 1. The effect of Aleo vera extract on the growth of *Streptococcus mutans* in unit log CFU/ml (mean ± SD)

ประสิทธิภาพของสารสกัดว่านหางจระเข้ต่อกิจกรรมเอนไซม์ GTF ของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์

จากการศึกษาผลของสารสกัดว่านหางจระเข้ที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันตั้งแต่ ความเข้มข้น 1, 1/2 1/4 และ 1/8 เท่าของ MIC ต่อเอนไซม์ GTF ของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์พบว่าสารสกัดว่านหางจระเข้ทุกความเข้มข้นยับยั้งเอนไซม์ GTF ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยพบว่าสารสกัดว่านหางจระเข้ทุกความเข้มข้นไม่มีผลยับยั้งเอมไซม์ GTF ได้ (รูปที่ 2)

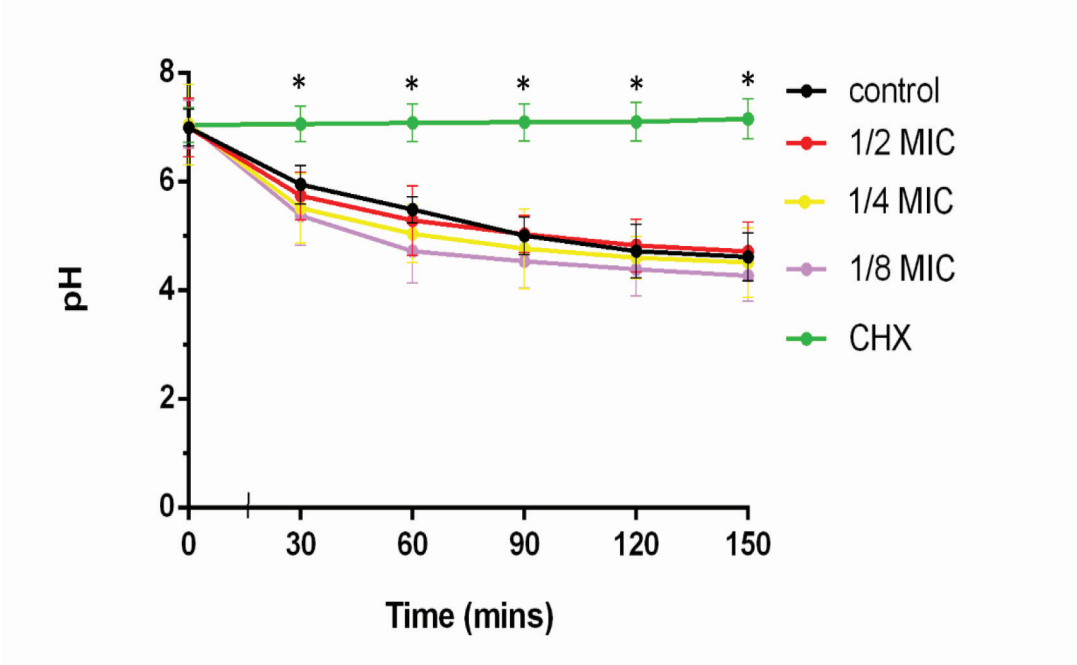


รูปที่ 2 ผลของสารสกัดว่านหางจระเข้ต่อเอนไซม์ GTF ของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ (mean ± SD)

Fig 2. The effect of Aleo vera extract on the GTF of *Streptococcus mutans* (mean ± SD)

ประสิทธิภาพของสารสกัดว่านหางจระเข้ต่อการสร้างกรดเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

ในการทดสอบความสามารถของสารสกัดว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่แตกต่างกันต่อการสร้างกรดของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ พบว่าสารสกัดว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้น 1/2, 1/4 และ 1/8 เท่าของ MIC มีความสามารถในการยับยั้งการสร้างกรดของเชื้อแตกต่างได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวกที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที โดยพบว่าสารสกัดว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้น 1/2, 1/4 และ 1/8 เท่าของ MIC ไม่สามารถยับยั้งการสร้างกรดของเชื้อได้ในทุกช่วงเวลา (รูปที่ 3)

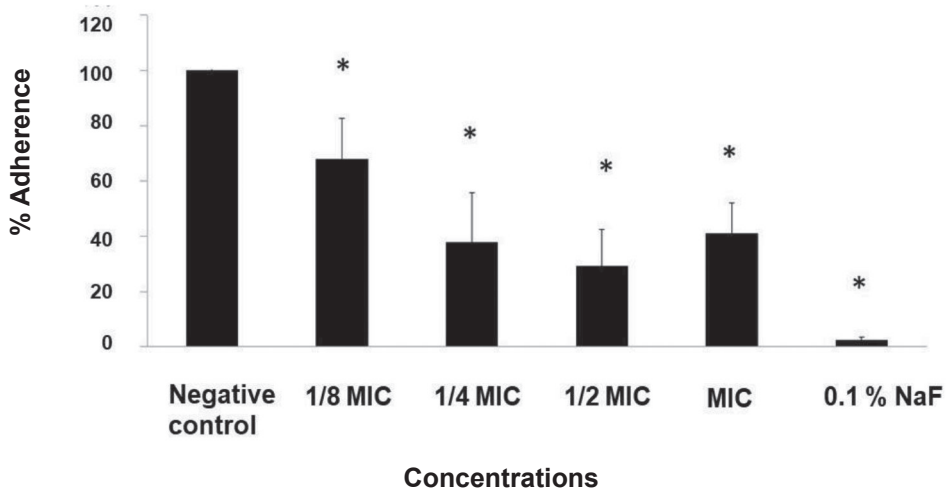


รูปที่ 3 ผลของสารสกัดว่านหางจระเข้ต่อการสร้างกรดของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ (mean ± SD)
***แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ**

Fig 3. The effect of Aleo vera extract on the acid production of *Streptococcus mutans*
***Statistically significant difference compared with positive control ($p < 0.05$)**

ประสิทธิภาพของสารสกัดว่านหางจระเข้ต่อการยึดเกาะของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

จากการศึกษาความสามารถของสารสกัดว่านหางจระเข้ ที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันตั้งแต่ความเข้มข้น 1, 1/2, 1/4 และ 1/8 ของ MIC พบว่า สารสกัดว่านหางจระเข้ทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบโดยพบว่าสารสกัดว่านหางจระเข้ทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ได้ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ผลของสารสกัดว่านหางจระเข้ต่อการยึดเกาะของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ (mean ± SD)
***แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ**
Fig 4. The effect of Aleo vera extract on the adhesion of *Streptococcus mutans* (mean ± SD)
***Statistically significant difference compared with negative control (p < 0.05)**

บทวิจารณ์ (Discussion)

วุ้นในใบว่านหางจระเข้ มีสารเคมีอยู่หลายชนิด เช่น แทนนิน อะโลซิมิดิน (aloe-cmidin) อะโลซิน (aloesin) อะโลอิน (aloin) สารประเภทไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ยางที่อยู่ในว่านหางจระเข้มีสารแอนทราควิโนน (anthraquinone) ที่มีสรรพคุณรักษาแผลต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแล้วยังช่วยสมานแผลได้ด้วย จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mitis* ที่เป็นส่วนหนึ่งทำให้เกิดโรคฟันผุได้ นอกจากนี้มีการศึกษาโดยนำว่านหางจระเข้ชนิดเจลมาใช้กับผู้ป่วย พบว่ามีผลลดเชื้อที่ทำให้เกิดโรคฟันผุได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมากกว่าเชื้อที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์ (21) ซึ่งจากการศึกษาวิจัยนี้ ใช้สารสกัดว่านหางจระเข้ที่เป็นการสกัดด้วยน้ำ โดยมีองค์ประกอบหลัก คือสารกลุ่มฟีโนลิก เช่น แทนนิน และไกลโคไซด์ ซึ่งมีองค์ประกอบคล้ายกับวุ้นในใบว่านหางจระเข้

สารสกัดว่านหางจระเข้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโดยที่มีค่า MIC เท่ากับ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คือความเข้มข้นที่มีความขุ่นของเชื้อต่ำกว่า 0.05 แต่การศึกษาครั้งนี้ ไม่สามารถหาค่า MBC ของสารสกัดได้ เนื่องจากที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้ สารสกัดจะมีลักษณะเหนียวข้นจนไม่สามารถนำมากรองผ่าน 0.45 ไมโครเมตรได้ จึงไม่สามารถนำมาทำการทดลองได้ นอกจากนี้พบว่า ถ้าทำการเพาะเชื้อในอาหารแข็งทุกความเข้มข้นของสารสกัด ยังคงพบการเจริญของเชื้อ อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยก่อนหน้ารายงานว่า สารสกัดว่างหางจระเข้ มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อทดสอบกับเชื้อ *Staphylococcus aureus* และมีค่า MIC เท่ากับ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อทดสอบกับเชื้อ *Bacillus subtilis* (22) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จากเยื่อเมือกภายในของพืช

ในกลุ่มตระกูลว่านหางจระเข้ *(Aloe ortholopha)* มีค่า MIC เท่ากับ 133 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 267 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวกเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Corynebacterium diphtheriae* ตามลำดับ (23) นอกจากนี้งานวิจัยรายงานเกี่ยวกับเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ที่ทดสอบจากคนไข้โดยตรง พบว่า สารสกัดว่านหางจระเข้ความเข้มข้นร้อยละ 12.5 โดยปริมาตร สามารถลดปริมาณของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จากงานวิจัยไม่ได้ระบุสายพันธุ์ของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ (24) จากงานวิจัยเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ มีหลายสายพันธุ์ ขึ้นกับพันธุกรรมและเชื้อชาติของผู้รับการทดสอบ (25) อย่างไรก็ตาม เชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ เอทีซีซี 25175 เป็นสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการอย่างแพร่หลายและได้รับการนำมาทดสอบสำหรับสมุนไพรตัวอื่น ๆ เพื่อศึกษาผลต่อการลดการเกิดโรคฟันผุ (26,27)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากว่านหางจระเข้มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 1.56–267 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาในครั้งนี้ เนื่องมาจากพืชที่ใช้ทำการทดสอบมาจากแหล่งที่มาที่แตกต่างกันมีวิธีการเตรียมสารสกัด รวมไปถึงการใช้ตัวทำละลายในการสกัดสารที่แตกต่างกันและเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบก็ยังต่างสายพันธุ์อีกด้วย

สารสกัดจากว่านหางจระเข้นั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ในช่วงระยะเวลา 0-24 ชั่วโมงในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ แต่อย่างไรก็ตาม จากผลการทดสอบการเจริญว่าสารสกัดว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้น MIC ที่ 6-10 ชั่วโมง มีผลทำให้การเจริญของเชื้อลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจาก 24 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าเชื้อเจริญได้มากขึ้น แสดงให้เห็นว่า สารสกัดว่านหางจระเข้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ในช่วงแรก นอกจากนี้ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า หลังจาก 12 ชั่วโมงผลของสารสกัดว่านหางจระเข้ ในกลุ่มความเข้มข้นต่ำ (15.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และกลุ่มควบคุม มีแนวโน้มการเจริญเติบโตของเชื้อลักษณะคล้ายกัน แต่แตกต่างจากผลของสารสกัดว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้นสูงกว่า เนื่องมาจาก ความเข้มข้นของสารสกัดว่านห่างจระเข้ที่น้อยสุดคือความเข้มข้นที่ 1/8 เท่าของ MIC ซึ่งส่วนประกอบสำคัญของสารมีน้อยมาก จนไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Ferro และคณะ ในปี 2003 พบว่าสารสกัดเอทานอล และอะซีโตน จากใบของว่านหางจระเข้มีฤทธิ์ในการยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *Streptococcus pyogenes* (28) ซึ่งให้ผลแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ อาจเป็นเพราะแหล่งที่มาของพืชที่แตกต่างกัน วิธีการเตรียมและขั้นตอนการสกัดรวมไปถึงตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบก็แตกต่างกัน

จากการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นได้ว่าสารสกัดว่านหางจระเข้มีการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด ผลยับยั้งการยึดเกาะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นสารสกัดว่านหางจระเข้เพิ่มขึ้น จนกระทั่งความเข้มข้นของสารสกัดว่านหางจระเข้ในระดับ MIC ให้ผลยับยั้งไม่เป็นไปตามแนวโน้มอาจเนื่องจากสารสกัดหนืดข้นจึงเกิดจับตัวตกตะกอน โดยจากผลการทดลองพบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น MIC จะยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อได้น้อยกว่าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ MIC (1/2 MIC, 1/4 MIC และ 1/8 MIC) ทั้งนี้อาจเกิดจากสารสกัดมีลักษณะเหนียวข้นจึงทำให้เกิดการตกตะกอนหรือเกิดการเกาะบนอุปกรณ์ที่เลี้ยงเชื้อ (48 well polystyrene plate) จึงอาจส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการยึดเกาะกับสารสกัดที่เหนียวข้นที่ยึดติดอยู่บนอุปกรณ์ที่เลี้ยงเชื้อได้

ดังนั้นสารสกัดว่านหางจระเข้ไม่เพียงแต่ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อที่อยู่ในสภาวะล่องลอย (planktonic) แต่ยังสามารถยับยั้งการสร้างแผ่นคราบจุลินทรีย์ของเชื้อชนิดนี้ได้อีกด้วย การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในระยะแรกนั้นเป็นขั้นตอนสำคัญที่ช่วยป้องกันการพัฒนาของไบโอฟิล์ม ขั้นตอนดังกล่าวข้างต้นนำไปสู่โรคฟันผุต่อไปได้ (29,30) จากการศึกษาของ Naidoo และคณะ ในปี 2012 พบว่าสารสกัดในส่วนเมทานอล จากพืชตำเสาหนู *(Dodonaea viscosa var. angustifolia)* ซึ่งมีสารแทนนินเหมือนสารสกัดว่าน

หางจระเข้ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ได้ (31) โดยองค์ประกอบหลักของสารสกัดว่านหางจระเข้คือ แทนนิน มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งมีส่วนประกอบของไซโลไพแรนโนไซด์ (4-O-b-D-xylopyranoside) มีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกโดยเข้าจับกับกรดไลโปโทคลอลิก (lipoteichoic acid) บนผิวเซลล์ของเชื้อ (31) ที่อาจมีส่วนในการช่วยลดการยึดเกาะของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ได้และยังทำให้โปรตีนแอดฮีซินบนผิวเซลล์แบคทีเรียเสียสภาพ (30,32)

นอกจากนี้แล้วเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ยังมีปัจจัยความรุนแรงที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งก็คือ ความสามารถในการสร้างกลูแคนที่ไม่ละลายน้ำ จากการย่อยสลายสารอาหารที่เรารับประทานเข้าไปโดยอาศัยเอนไซม์ GTF (33) ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้ สารสกัดว่านหางจระเข้ในทุกความเข้มข้นไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GTF อาจเนื่องมาจาก แทนนินที่เป็นองค์ประกอบหลักของว่านหางจระเข้เข้าไปจับกับกรดไลโปโทคลอลิกของผนังเซลล์ของเชื้อ ทำให้เชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ เกิดการทำงานผิดปกติ แต่ไม่มีผลต่อเอนไซม์ GTF โดยตรง เนื่องจากเอนไซม์ GTF ที่เพิ่มเข้าไปในปฏิกิริยายังสามารถทำงานและเปลี่ยนไปโอฟิล์มที่หลงเหลืออยู่เกิดเป็นสารละลายกลูแคนได้ แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัดน้ำและแอลกอฮอล์จากพืชในกลุ่ม *Juglandaceae regia* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการยึดเกาะและการสร้างกลูแคนที่ไม่ละลายน้ำจากเชื้อสเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์ได้ โดยสารแทนนินอาจไปเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) บนผิวเซลล์ของเชื้อ และสามารถยับยั้งเอนไซม์ที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิตออกมา โดยการเข้าไปจับบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ที่ไม่ละลายน้ำ แล้วเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์นั้น ทำให้เอนไซม์เสียสภาพส่งผลให้เกิดการป้องกันการดูดซับเอนไซม์ GTF บนผิวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียได้ (34) อีกหนึ่งปัจจัยทีส่งผลต่อการเกิดโรคฟันผุ คือเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ สามารถปล่อยกรดออกมาได้หลายชนิด เช่น กรดแลคติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก ที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต เมื่อในช่องปากอยู่สภาวะที่มีน้ำตาลปริมาณน้อย แบคทีเรียจะสลายน้ำตาลได้เป็นกรดอะซิติกและกรดฟอร์มิก ซึ่งทำให้ค่า pH ในช่องปากลดลงเพียงเล็กน้อย ไม่ก่อให้เกิดการทำลายโครงสร้างของฟัน แต่เมื่อในช่องปากมีน้ำตาลปริมาณมาก แบคทีเรียจะสร้างกรดพวกแลคติกออกมา โดยกรดแลคติกถูกสร้างจากกระบวนการไกลโคไลติก ส่งผลทำให้ค่า pH ภายในคราบจุลินทรีย์ลดลง จนไปสู่การละลายแร่ธาตุบนผิวฟัน (35) ดังนั้นจากผลการทดลองที่ความเข้มข้นต่ำกว่า MIC ของสารสกัดว่านหางจระเข้ ไม่มีผลต่อยับยั้งการสร้างกรดที่เกิดขึ้นจากเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ เอทีซีซี 25175 แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดว่านหางจระเข้ที่ใช้ในการทดสอบ เป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่า MIC เหตุผลที่ทางทีมวิจัยไม่ใช้ความเข้มข้นที่ระดับ MIC มาทดสอบการสร้างกรด เนื่องจากระดับความเข้มข้น MIC ทำให้เชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ มีปริมาณน้อยและเกิดการสร้างกรดด้วยตัวเชื้อเองน้อยลง ส่งผลให้การทดสอบกับกรดที่สร้างขึ้นไม่สามารถทดสอบได้ สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่านำสารทดสอบที่ระดับต่ำกว่าค่า MIC มาใช้ทดสอบสำหรับศึกษาการสร้างกรดที่เกิดขึ้นจากเชื้อแบคทีเรีย (36)

ดังนั้นจากผลการทดลองสรุปได้ว่า สารสกัดว่านหางจระเข้สามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ได้ ซึ่งอาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งในการลดการทำงานของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดว่านหางจระเข้ไม่ได้มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GTF และการสร้างกรดที่เกิดขึ้นซึ่งควรได้รับการศึกษาต่อไปในอนาคต

สารสกัดว่านหางจระเข้สามารถยับยั้งการยึดเกาะเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ แต่ยังไม่สามารถระบุได้ถึงกลไกที่เกี่ยวข้องอย่างชัดเจน จึงควรมีการศึกษาแยกสารประกอบบริสุทธิ์จากพืชเพื่อนำมาศึกษากลไกต่อเชื้อต่อไปในอนาคต นอกจากนี้การศึกษาในครั้งนี้เป็นการทดสอบภายนอกร่างกายมนุษย์ซึ่งอาจแตกต่างจากสภาวะจริงในช่องปาก เช่น ความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก การไหลของน้ำลาย ลักษณะพื้นผิวของฟัน เป็นต้น

บทสรุป (Conclusion)

ความเข้มข้นขั้นต่ำสุดในการยับยั้งของสารสกัดว่านหางจระเข้คือ 125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดว่านหางจระเข้ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างกรดและการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดว่านหางจระเข้สามารถยับยั้งการยึดเกาะเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ได้

เอกสารอ้างอิง (References)

1. Mathur VP, Dhillon JK. Dental caries: a disease which needs attention. Indian J Pediatr. 2018;85(3):202-6.

2. Gao X, Jiang S, Koh D, Hsu CY. Salivary biomarkers for dental caries. Periodontol. 2016; 70(1):128-41.

3. Marsh PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. Dent Clin North Am. 2010;54(3):441-54.

4. Conrads G, About I. Pathophysiology of dental caries. Monogr Oral Sci. 2018;27(1):1-10.

5. Klein MI, Hwang G, Santos PH, Campanella OH, Koo H. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. Front Cell Infect Microbiol. 2015;13(1): 5-10.

6. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. Caries Res. 2011;45(1):69-86.

7. Ham Y, Kim TJ. Inhibitory effect of phenolic acids in *rubus* coreanus on glucosyltransferase of *Streptococcus mutans.* Curr Microbiol. 2020;11(1):3695-703.

8. Karygianni L, Al-Ahmad A, Argyropoulou A, Hellwig E, Anderson AC, Skaltsounis AL. Natural antimicrobials and oral Microorganisms: a systematic review on herbal interventions for the eradication of multispecies oral biofilms. Front Microbiol. 2016;14(1):1-17.

9. Rath S, Bal SCB, Dubey D. Oral biofilm: development mechanism, multidrug resistance, and their effective management with novel techniques. Rambam Maimonides Med J. 2021; 12(1):1-8.

10. Cheng L, Li J, He L, Zhou X. Natural products and caries prevention. Caries Res. 2015; 49(1):38-45.

11. Bozzi A, Perrin C, Austin S, Arce Vera F. Quality and authenticity of commercial aloe vera gel powders. Food Chem. 2007;103(1):22-30.

12. Rai S, Sharma DK, Arora S, Sharma M, Chopra A. Concentration of the heavy metals in *Aloe vera* L. (*Aloe barbadensis* Miller) leaves collected from different geographical locations of India. Ann Biol Res. 2011;2(6):575-9.

13. Lanjhiyana S, Garabadu D, Ahirwar D, Bigoniya P, Rana AC, Patra KC, et al. Antihyperglycemic potential of *Aloe vera* gel in experimental animal model. Ann Biol Res. 2011;2(1):17-31.

14. Guo X, Mei N. *Aloe vera*: A review of toxicity and adverse clinical effects. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. 2016;34(2):77-96.

15. George D, Bhat SS, Antony B. Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of aloe vera tooth gel and two popular commercial toothpastes: an *in vitro* study. Gen Dent. 2009;57(3):238-41.

16. Ehsani M, Marashi MA, Zabihi E, Issazadeh M, Khafri S. A Comparison between antibacterial activity of propolis and Aloe vera on *Enterococcus faecalis* (an in *vitro* study). Int J Mol Cell Med. 2013;2(1):110-6.

17. Xiao J, Liu Y, Zuo YL, Li JY, Ye L, Zhou XD. Effects of *Nidus Vespae* extract and chemical fractions on the growth and acidogenicity of oral microorganisms. Arch Oral Biol. 2006;51: 804-13.

18. Tong Z, Dong L, Zhou L, Tao R, Ni L. Nisin inhibits dental caries-associated microorganism *in vitro*. Peptides. 2010;31(11):2003-8.

19. Yu HH, Lee JS, Lee KH, Kim KY, You YO. *Saussurea lappa* inhibits the growth, acid production, adhesion, and water-insoluble glucan synthesis of *Streptococcus mutans*. J Ethnopharmacol. 2007;111(2):413-17.

20. Yamanaka A, Kimizuka R, Kato T, Okuda K. Inhibitory effects of cranberry juice on attachment of oral streptococci and biofilm formation. Oral Microbiol Immunol. 2004;19(3):150-4.

21. Fani M, Kohanteb J. Inhibitory activity of Aloe vera gel on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. J Oral Sci. 2012;54(1):15-21.

22. Ndhlala A, Amoo S, Stafford G, Finnie J, Van Staden J. Antimicrobial, anti-inflammatory and mutagenic investigation of the South African tree aloe *(Aloe barberae).* J Ethnopharmacol. 2009;124(3):404-8.

23. Zimudzi C, Mandebvu RS, Kunonga N, Jere J, Kativu S. *In vitro Antibacterial* activity and *Phytochemical* screening of the Zimbabwean endemic *Aloe ortholopha* Christian & Milne-Readhead *(Aloaceae).* Int J Sci Technol. 2012; 2(11):778-82.

24. Jain S, Rathod N, Nagi R, Sur J, Laheji A, Gupta N, et al. Antibacterial effect of aloe vera gel against plaque and caries bacteria: an *in-vitro* study. J Clin Diagn Res. 2016;10(1):41-44.

25. Zhou Y, Millhouse E, Shaw T, Lappin DF, Rajendran R, Bagg J, et al. Evaluating *Streptococcus mutans* strain dependent characteristics in a polymicrobial biofilm community. Front Microbiol. 2018;23:9(1):579-84.

26. Vargas-Segura AI, Silva-Belmares SY, Segura-Ceniceros EP, Ascacio-Valdés JA, Méndez-González L, Ilyina A. Screening and characterization of medicinal plants extracts with bactericidal activity against *Streptococcus mutans.* Nat Prod Res. 2020;34(18):2672-6.

27. Enciso S, Medina J, Mauricio F, Mauricio-Vilchez C, Alvitez-Temoche D, Vilchez L, et al. Antibacterial effectiveness of four concentrations of the hydroalcoholic extract of *Solanum tuberosum* (Tocosh) against *Streptococcus mutans* ATCC 25175TM: a comparative *in vitro* study. Int J Dent. 2020;26(1):1-5.

28. Ferro VA, Bradbury F, Cameron P, Shakir E, Rahman SR, Stimson WH. *In vitro* susceptibilities of *Shigella flexneri* and *Streptococcus pyogenes* to inner gel of *Aloe barbadensis* Miller. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(3):1137-9.

29. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. Future Med Chem. 2015;7(4):493-512.

30.Ngabaza T, Moeno S, Patel M. Anti-acidogenic and anti-biofilm activity of 5,6,8-trihydroxy-7-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-4H-chromen-4-one. Microb Pathog. 2018;123(1):149-52.

31. Naidoo R, Patel M, Gulube Z, Fenyvesi I. Inhibitory activity of *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* extract against *Streptococcus mutans* and its biofilm. J Ethnopharmacol. 2012; 144(1):171-4.

32. Hassan B, Chatha SAS, Hussain AI, Zia KM, Akhtar N. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. Int J Biol Macromol. 2018;109(1):1095-107.

33. Xu RR, Yang WD, Niu KX, Wang B, Wang WM. An update on the evolution of glucosyltransferase (Gtf) genes in *Streptococcus.* Front Microbiol. 2018;9:2979. doi: 10.3389/fmicb. 2018.02979.

34. Jagtap AG, Karkera SG. Extract of Juglandaceae regia inhibits growth, *in-vitro* adherence, acid production and aggregation of *Streptococcus mutans.* J Pharm Pharmacol. 2000;52(2):235-42.

35. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation-new insight. J Dent Res. 2006;85(10):878-87.

36. Shafiei Z, Rahim ZHA, Philip K, Thurairajah N, Yaacob H. Potential effects of psidium sp., mangifera sp., mentha sp. and its mixture (PEM) in reducing bacterial populations in biofilms, adherence and acid production of s. sanguinis and s. mutans. Arch Oral Biol. 2020; 109(1):1-15.

ติดต่อบทความ:
อ.ดร.ทพ.ณัฐพล โรจน์เพ็ญเพียร
สาขาวิชาชีววิทยาช่องปากและระบบการบดเคี้ยว
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
เลขที่ 15 ถ.กาญจนวณิชย์ ต.คอหงส์ อ.หาดใหญ่
จ.สงขลา 90110
โทรศัพท์: 074 28 7611
อีเมล์: nattapon.r@psu.ac.th

Corresponding author:
Dr.Nattapon Rotpenpian
Department of Oral Biology and Occlusion,
Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University,
15 Kanjanavanit Rd., Korhong, Hatyai, Songkhla,
90110 Thailand.
Tel: +66 74 28 7611
E-mail: nattapon.r@psu.ac.th

Received Date: Feb 05, 2021
Revised Date: Mar 02, 2021
Accepted Date: Feb 18, 2022