การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ที่ก่อให้เกิดฟันผุ

วันที่รับตัวอย่าง : 23 พฤษภาคม 2567

วันที่ทดสอบ : 11 มิถุนายน 2567

ผู้ทำการทดลอง : ศิริวรรณ แซ่หลี

สารทดสอบ

ผลิตภัณฑ์ยาสีฟันแบมบู โพรโพลิส (Bamboo Propolis Toothpaste)

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

Streptococcus mutans เป็นแบคทีเรียในสภาวะกึ่งออกซิเจน แกรมบวก รูปกลม พบโดยทั่วไปในช่องปาก และเป็นสาเหตุของฟันผุ

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ยาสีฟันแบมบู โพรโพลิสต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans*

วิธีการทดลอง

1. **การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans***

1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic soy broth (TSB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเพาะเชื้อ 1% ต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB เขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ให้เชื้อมีความขุ่นเท่ากับ Mc Farland No. 0.5 หรือ 1.5×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

1.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ของสารทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion

นำไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ที่มีความขุ่นเท่ากับ Mc Farland No. 0.5 หรือ 1.5×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร กดและบิดให้แห้งพอหมาดๆ กับข้างหลอดทดลอง จากนั้น เกลี่ยเชื้อ (Swab) ให้ทั่วบนผิวจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ให้ส่วนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งสนิท จากนั้นเตรียมสารทดสอบยาสีฟันแบมบู โพรโพลิส ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นหยดสารละลายแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10

ไมโครลิตร ลงบนแผ่นกระดาษกรองปราศจากเชื้อขนาด 6 มิลลิเมตร (Whatman®) วางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่ทำการป้ายเชื้อไว้เรียบร้อยแล้ว รอให้แห้งประมาณ 15 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลด้วยการวัดค่าขอบเขตการยับยั้งเชื้อของสารทดสอบ โดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งวัดเป็นหน่วยมิลลิเมตร ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสไม่มีโคโลนีเชื้อรอบๆ แผ่นกระดาษกรอง ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแปรผันตรงกับขนาดของ inhibition zone ในการทดสอบครั้งนี้ใช้น้ำหรือตัวทำละลายสารทดสอบเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (Negative control) และยาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ

2. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี Broth dilution technique

นำสารทดสอบยาสีฟันแบมบู โพรโพลิส (Bamboo Propolis Toothpaste) ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงเป็น 2 เท่า (two-fold serial dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39 และ 0 mg/mL 195 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ใน 96-well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม ในการทดสอบนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (Negative control) และอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพียงอย่างเดียวเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารทดสอบที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีความขุ่นของเชื้อเป็นค่า MIC

3. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration, MBC) ด้วยวิธี Agar dilution technique

นำตัวอย่างในหลุมที่ไม่มีความขุ่นจากการทดสอบหาค่า MIC ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาหาค่า MBC ด้วยวิธี drop plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA รอจนแห้ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการทดลองค่า MBC โดยพิจารณาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารทดสอบไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจะต้องมีลักษณะคือไม่มีโคโลนีของการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลการทดลอง

1. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของสารทดสอบต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* โดยเทคนิค Agar disc diffusion

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อแบคทีเรียของสารทดสอบต่อเชื้อ *S. mutans* พบว่า ผลิตภัณฑ์ยาสีฟันแบมบู โพรโพลิส (Bamboo Propolis Toothpaste) ที่ความเข้มเข้น 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ โดยมีขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้งเท่ากับ 7.33 ± 0.58 และ 8.00 ± 0.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากออไรจีส แบมบู เมาท์วอช (Orygis Bamboo Mouthwash) ไม่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (ดังตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของสารทดสอบต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* (Inhibition zone) โดยเทคนิค Agar disc diffusion

สารทดสอบ	ความเข้มข้นหรือการเจือจาง	Zone of Inhibition (mm.)			Mean ± S.D. (mm.)
		1	2	3	
ยาสีฟันแบมบู โพรโพลิส	1 mg/mL	0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00
	10 mg/mL	7.00	8.00	7.00	7.33 ± 0.58
	100 mg/mL	8.00	8.00	8.00	8.00 ± 0.00
Negative control	Undilute	0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00
Positive control	1 mg/mL	21.00	22.00	22.00	21.67 ± 0.58

หมายเหตุ : Negative control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic soy broth (TSB)
Positive control คือ ยาปฏิชีวนะ Ampicillin ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี Broth dilution technique

ผลิตภัณฑ์ยาสีฟันแบมบู โพรโพลิส (Bamboo Propolis Toothpaste) ที่ความเข้มเข้น 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ เมื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่

สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ได้ มีค่าเท่ากับ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังตารางที่ 2)

3. ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถฆ่าเชื้อเชื้อแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration, MBC) ด้วยวิธี Agar dilution technique

จากผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของผลิตภัณฑ์ยาสีฟันแบมบู โพรโพลิส (Bamboo Propolis Toothpaste) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อและเมื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ โดยวิธีการ drop plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ได้ มีค่าเท่ากับ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) และฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans*

สารทดสอบ	*S. mutans*	
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
ผลิตภัณฑ์ยาสีฟันแบมบู โพรโพลิส (Bamboo Propolis Toothpaste)	1.56	6.25

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ที่ก่อให้เกิดฟันผุของผลิตภัณฑ์ยาสีฟันแบมบู โพรโพลิสนั้น พบว่า ยาสีฟันแบมบู โพรโพลิสสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 1.56 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ