**การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ที่ก่อให้เกิดฟันผุ**

**วันที่รับตัวอย่าง** : 29 มิถุนายน 2567

**วันที่ทดสอบ** : 9-12 มิถุนายน 2567

**ผู้ทำการทดลอง** : ศิริวรรณ แซ่หลี

**สารทดสอบ**

 ผลิตภัณฑ์ยาสีฟันซีเมนต์ ฟลูออไรด์ 1500 ppm

**เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ**

*Streptococcus mutans* เป็นแบคทีเรียในสภาวะกึ่งออกซิเจน แกรมบวก รูปกลม พบโดยทั่วไปในช่องปาก และเป็นสาเหตุของฟันผุ

**วัตถุประสงค์ของการทดลอง**

 เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ของผลิตภัณฑ์ผลิตภัณฑ์ยาสีฟันซีเมนต์ ฟลูออไรด์ 1500 ppm

**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 × 108 เซลล์/มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

**1.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ของสารทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion**

นำไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ที่มีความขุ่นเท่ากับ Mc Farland No. 0.5 หรือ 1.5 × 108 เซลล์/มิลลิลิตร กดและบิดให้แห้งพอหมาดๆ กับข้างหลอดทดลอง จากนั้น
เกลี่ยเชื้อ (Swab) ให้ทั่วบนผิวจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที
ให้ส่วนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งสนิท จากนั้นเตรียมสารทดสอบยาสีฟันซีเมนต์ ฟลูออไรด์ 1500 ppm
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 โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
ซึ่งวัดเป็นหน่วยมิลลิเมตร ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสไม่มีโคโลนีเชื้อรอบๆ แผ่นกระดาษกรอง ความสามารถใน
การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแปรผันตรงกับขนาดของ inhibition zone ในการทดสอบครั้งนี้ใช้น้ำหรือตัวทำละลาย
สารทดสอบเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (Negative control) และยาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ

1. **การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย**

 **(Minimal inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี Broth dilution technique**

นำสารทดสอบยาสีฟันซีเมนต์ ฟลูออไรด์ 1500 ppm 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 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ให้มีปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่มีความขุ่นเท่ากับ Mc Farland No. 0.5 หรือจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ 1.5 × 108 เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
ลงในแต่ละหลุม 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 อ่านค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารทดสอบที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย
หรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีความขุ่นของเชื้อเป็นค่า MIC

1. **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 โดยพิจารณาความเข้มข้น
ที่น้อยที่สุดของสารทดสอบไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจะต้องมีลักษณะคือไม่มีโคโลนี
ของการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

**ผลการทดลอง**

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

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* พบว่า ผลิตภัณฑ์ยาสีฟันซีเมนต์ ฟลูออไรด์ 1500 ppm ที่ความเข้มเข้น 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ โดยมีขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้งมีค่าเท่ากับ 8.67 ± 0.58 และ 17.00 ± 2.65 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มเข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ Ampicillin ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียมีค่าขนาดเท่ากับ 24.33 ± 0.58 (ดังแสดงในตารางที่ 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** |
| ยาสีฟันซีเมนต์ ฟลูออไรด์ 1500 ppm | 1 mg/mL | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| 10 mg/mL | 8.00 | 9.00 | 9.00 | 8.67 ± 0.58 |
| 100 mg/mL | 15.00 | 16.00 | 20.00 | 17.00 ± 2.65 |
| Negative control | Undilute | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| Positive control | 1 mg/mL  | 24.00 | 24.00 | 25.00 | 24.33 ± 0.58 |

 **หมายเหตุ** : Negative control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic soy broth (TSB)

 Positive control คือ ยาปฏิชีวนะ Ampicillin ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

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

ยาสีฟันซีเมนต์ ฟลูออไรด์ 1500 ppm ที่ความเข้มเข้น 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ เมื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ได้ มีค่าเท่ากับ 3.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังแสดงในตารางที่ 2)

1. **ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถฆ่าเชื้อเชื้อแบคทีเรีย (Minimum**

 **bactericidal concentration, MBC) ด้วยวิธี Agar dilution technique**

จากผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบยาสีฟันซีเมนต์ ฟลูออไรด์ 1500 ppmสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อและเมื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้
โดยวิธีการ drop plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ได้ มีค่าเท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังแสดงในตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2** ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) และฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

(MBC) ของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans*

|  |  |
| --- | --- |
| สารทดสอบ | *S. mutans* |
| **MIC (mg/mL)** | **MBC (mg/mL)** |
| ยาสีฟันซีเมนต์ ฟลูออไรด์ 1500 ppm |  3.13 |  12.5 |

**สรุปผลการทดลอง**

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ที่ก่อให้เกิดฟันผุของผลิตภัณฑ์
ยาสีฟันซีเมนต์ ฟลูออไรด์ 1500 ppm พบว่า ยาสีฟันซีเมนต์ ฟลูออไรด์ 1500 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 3.13 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

**Approved by**

Kiattawee Choowongkomon, Ph.D.

Department of Biochemistry, Faculty of Science

Kasetsart University, Bangkok, Thailand 10900
fsciktc@ku.ac.th

13th July 2024