ฤทธิ์ต้านเชื้อราและความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์ของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้ง

Antifungal Activity and Cytotoxicity to Human Gingival Fibroblast of Terminalia Bellirica Compounds in Dichloromethane Fraction

มยุรัชฎ์ พิพัฒภาสกร[1], ประภาพรรณ เต็มกิจถาวร[2], ชัญญานุช ธีนวงศ์[3], รัตจิต ตันฑเสน[3], อรรจาภัคร์ วงควิริยะ[3], อรวี ดำรงค์วานิช[3], กาญจ์หทัย ไชยล้อม[3], นาตยา ล้อพงศ์พาณิช[3], ปานฝัน ทองเป็นใหญ่[3], วาทิศ เดชพงษ์[3]

[1]ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

[2]ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

[3]คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

Mayurach Pipatphatsakorn[1], Prapapan Temkitthawon[2], Chanyanuch Teenawong[3], Ratjit Tanthasane[3], Anchapak Wongwiriya[3], Orawee Damrongwanich[3], Karnhathai Chailom[3], Nattaya Lohpongpanich[3], Parnfun Thongpenyai[3], Watis Detpong[3]

[1]Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Naresuan University

[2]Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University

[3]Faculty of Dentistry, Naresuan University

ชม. ทันตสาร 2561; 39(1) : 61-74
CM Dent J 2018; 39(1) : 61-74

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ของสารสกัดสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทน รวมทั้งหาความเป็นพิษต่อเซลล์และหาความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทนที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์

นำสารสกัดหยาบของสมอพิเภกแห้งในเอทานอลมาแยกสารด้วยเทคนิคการสกัดของเหลวด้วยของเหลว โดยสามารถแยกออกได้ 5 แฟรกชั่นตามความมีขั้วของสาร

Abstract

The aims of this study were to evaluate anticandidal effect of Terminalia bellirica compounds in dichloromethane fraction on *Candida albicans* and to determine the cytotoxic effect on human gingival fibroblasts.

Dried Terminalia bellerica crude ethanolic extract was extracted by liquid-liquid extract technique. Fractionated ethanolic was separated into 5 fractions orderly by its polarity; hexane fraction,

Corresponding Author:

มยุรัชฎ์ พิพัฒภาสกร
ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

Mayurach Pipatphatsakorn
Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Naresuan University, Phitsanulok, 65000, Thailand
E-mail: ***mayurach_dt17@hotmail.com***

ได้แก่ แฟรกชั่นเฮกเซน แฟรกชั่นไดคลอโรมีเทน แฟรกชั่นเอทิล อะซีเตต แฟรกชั่นบิวทานอล และแฟรกชั่นน้ำ นำสารสกัดสมอพิเภกแห้งแต่ละแฟรกชั่นมาทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (สายพันธุ์ ATCC 90028) พบว่ามีเฉพาะแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทนที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์เท่านั้น จึงนำความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทนที่สามารถยับยั้งเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ทดสอบด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชั่น และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ด้วยวิธีไมโครบรอท ไดลูชั่น พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ได้ร้อยละ 96.51 ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและฆ่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ได้มากกว่าร้อยละ 99.93 ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นำชิ้นเหงือกที่ได้จากการผ่าฟันคุดจากอาสาสมัคร 3 คน มาทำการเพาะเลี้ยง จากนั้นนำเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทน โดยเติมสารสกัดสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก แล้วเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีกลุ่มที่ใช้เพียงอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดปราศจากซีรัมเป็นกลุ่มควบคุม นำเซลล์กลุ่มต่าง ๆ เหล่านี้ไปทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลตรีดเดอร์ในช่วงความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร พบว่ากลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารสกัดเข้มข้น 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่มากที่สุดที่ไม่มีพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p \geq 0.01$) แต่ในขณะที่ความสามารถในการฆ่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ได้นั้นอยู่ที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 25,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดของผลสมอพิเภกแห้งเพิ่มเติม และระมัดระวังหากต้องการนำมาพัฒนาเป็นตำหรับยารักษาโรคเชื้อราในช่องปากต่อไป

คำสำคัญ: แคนดิดา อัลบิแคนส์ สมอพิเภก ความเป็นพิษ

dichloromethane fraction, ethyl acetate fraction, butanol fraction and aqueous fraction. Antifungal activity against *Candida albicans* (ATCC 90028) of all fractioms was determined using disc diffusion method. In this study, the only dichloromethane fraction showed the effect against *Candida albicans*. Then, the lowest concentration of Terminalia bellirica compounds in dichloromethane fraction that exhibited anticandidal activity on disc diffusion assay was used as initial concentration in microbroth dilution. The results showed the minimum concentrations of Terminalia bellerica compounds in dichloromethane fraction that inhibited 96.51% and 99.93% of *Candida albicans* growth were 20 mg/ml and 25 mg/ml, respectively.

Gingival tissue samples were collected from 3 subjects. The gingival tissues were harvested during a surgical procedure of impacted tooth removal. Human gingival fibroblast cultures were obtained from gingival explants. The fibroblasts were cultured in cell culture medium without serum and treated with various concentrations of Terminalia bellirica compounds in dichloromethane fraction for 24 hours. Dichloromethane fraction-free wells were used as a control condition. Cells viability was determined by using the MTT solution and the optical density (OD) was measured using microplate reader (wave length 570 nm). The Terminalia bellirica compounds in dichloromethane fraction at concentration of 625 µg/mL was the maximum concentration that had no cytotoxicity on human gingival fibroblasts ($p \geq 0.01$) whereas the maximum fungicidal concentration of Terminalia bellirica compounds in dichloromethane fraction was 25,000 µg/ml. Thus, the dichloromethane fraction of Terminalia bellirica compounds need more studies for further be used clinically in oral medicine.

Keywords: *Candida albicans*, terminalia bellirica, cytotoxic effect

บทนำ

ในช่องปากมักพบเชื้อประจำถิ่น (normal flora) อยู่หลายชนิด เมื่อเนื้อเยื่อภายในช่องปากมีภูมิต้านทานต่อเชื้อน้อยลงจะทำให้เกิดโรคราในช่องปากและคอหอยขึ้นได้ (oropharyngeal candidiasis)[1] ซึ่งมักเกิดจากเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*Candida albicans*) เชื้อราชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 15-37 องศาเซลเซียส[2] สามารถเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมจากกรดหรือด่างให้เป็นกลางได้ ทำให้ทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี[3-7] ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันได้มีการนำสมุนไพรมาสกัดเป็นยาบำบัดโรคต่าง ๆ ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งนอกจากการรักษาแผนปัจจุบัน อีกทั้งยังมีประโยชน์ในแง่การลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้ายาจากต่างประเทศ ปัจจุบันยาสมุนไพรเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้เพราะสมุนไพรหลายชนิดมีความปลอดภัย เกิดผลข้างเคียงต่ำ และมีราคาถูก[8] สารสกัดจากผลสมอพิเภกได้มีการนำมาใช้ในการรักษาความผิดปกติของระบบทางเดินหายใจ และใช้รักษาความผิดปกติของระบบทางเดินอาหารในสัตว์ทดลอง สมอพิเภกเป็นสมุนไพรที่พบได้ในภูมิอากาศแบบร้อนชื้นในเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการยับยั้งเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย ต้านไวรัส และยีสต์[9] นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยพบว่าเปลือกของผลสมอพิเภกแห้งมีสารสำคัญได้แก่ เทอร์มิลิกแนน (termilignan) แทนนิลิกแนน (thannilignan) 7-ไฮดรอกซี-3,4-เมทิลลีนไดออกซีฟลาวาน (7-hydroxy-3, 4-(methylenedioxy)-flavan) และอะโนลิกแนน บี (anolignan B) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุหลักในการเกิดโรคราแคนดิดาในช่องปาก[10,11] จากงานวิจัยที่ผ่านมามีการศึกษาสารสกัดหยาบจากสมอพิเภกของไทยในเอทานอลพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์[10,12] แต่ยังเป็นเพียงการสกัดหยาบเท่านั้น เหตุนี้จึงเป็นที่มาของการพัฒนาสกัดแยกสารออกฤทธิ์ออกมาให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์ของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้พัฒนาตำรับยาให้เป็นส่วนหนึ่งในการรักษาโรคราแคนดิดาในช่องปากต่อไป

การนำสมุนไพรมาใช้อย่างปลอดภัยและมีประสิทธิภาพต้องมีการคำนึงถึงขนาดและปริมาณของสมุนไพรที่เหมาะสม รวมถึงมีการคำนึงถึงความเป็นพิษของสมุนไพรเมื่อนำมาใช้ในการรักษา ทั้งนี้ยังไม่พบรายงานการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดลิกแนนส์จากสมอพิเภกต่อเซลล์ในช่องปาก ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีอีกหนึ่งวัตถุประสงค์เพื่อหาความเป็นพิษต่อเซลล์และหาความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดสมอพิเภกแห้งในในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทนที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์

วัสดุและวิธีการ

วิธีการดำเนินงานวิจัยแบ่งเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ 1 คือ การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้ง และส่วนที่ 2 ทดสอบหาความเป็นพิษต่อเซลล์และหาความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดสมอพิเภกแห้งในในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทนที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์

การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำเปลือกและเนื้อสมอพิเภกแห้งมาบดด้วยครกแล้วเข้าเครื่องปั่นละเอียด ได้ผงสมอพิเภกรวมกันทั้งส่วนเปลือกและเนื้อทั้งหมด 11,000 กรัม จากนั้นนำไปแช่ยุ่ยโดยแบ่งชั่งผงสมอพิเภกน้ำหนัก 1,000 กรัม ห่อด้วยผ้าขาวบาง แล้วใส่ในขวดแก้วปากกว้าง เติมเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วนโดยมวลต่อปริมาตรของผงต่อน้ำเป็นปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ทำซ้ำทั้งหมด 11 ครั้งจนกระทั่งผงหมด กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง จากนั้นนำไปผ่าน เครื่องโรตารีอีวาโพเรเตอร์เพื่อระเหยแห้ง

การทำโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบางเพื่อหาระบบตัวทำละลาย

นำสารสกัดหยาบที่ระเหยแห้งแล้วมาทดสอบหาตัวทำละลาย ในการทดลองนี้ได้สุ่มเลือกใช้ตัวทำละลาย 6 ชนิด ได้แก่ เอทานอลต่อเมทานอล อัตราส่วน 9 : 1 เอทานอลต่อเมทานอล อัตราส่วน 8 : 2 เอทานอลต่อเมทานอล อัตราส่วน 7 : 3 ไดคลอโรมีเทน ต่อเมทานอล อัตราส่วน 9 : 1 ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล อัตราส่วน 8 : 2 ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล อัตราส่วน 7 : 3 ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าตัวทำละลายที่สามารถแยกสารสกัดหยาบได้ เป็นแถบสั้น ๆ และ

มีขอบเขตชัดเจนที่สุด คือ ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล อัตราส่วน 9 : 1

การสกัดของเหลวด้วยของเหลว

ชั่งสารสกัดหยาบจากสมอพิเภก 15 กรัม ละลายในเมทานอล 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ใส่ลงในกรวยแยก เริ่มทำการแยกสาร โดยเริ่มจากสารที่ไม่มีขั้วก่อน ในที่นี้จะใช้ เฮกเซน (hexane) เป็นตัวทำละลาย ตวงเฮกเซน 50 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วเขย่าเป็นรูป “∞” รอให้ สารละลายตกตะกอนแยกชั้นกัน สารสกัดหยาบสมอพิเภกที่ละลายในเมทานอลจะอยู่ชั้นล่าง เนื่องจากมีความหนาแน่นมากกว่าเฮกเซน แล้วเก็บแฟรกชั่นของเมทานอลไว้ในบีกเกอร์จากนั้นไขกรวยเก็บแฟรกชั่นของ เฮกเซนออกมาเก็บในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) นำแฟรกชั่นของเมทานอลใส่กลับเข้าไปในกรวยแยกแล้วทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง ทั้งนี้เนื่องจากในแฟรกชั่นของเฮกเซนจะมีน้ำอยู่จึงเติมเกลือโซเดียม ซัลเฟต (sodium sulfate salt) ลงไปในขวดรูปชมพู่เพื่อจับน้ำออกจากสารละลาย

จากนั้นเปลี่ยนสารตัวทำละลายจากสารที่มีขั้วน้อยไปมาก ในการทดลองนี้เลือกใช้ ไดคลอโรมีเทน ก่อนอื่นเติมน้ำกลั่นให้แฟรกชั่นของเมทานอลมีความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตร หากได้แฟรกชั่นของเมทานอลจากขั้นตอนที่แล้วมาปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นเพิ่มอีก 200 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมไดคลอโรมีเทน 250 มิลลิลิตร เขย่าแล้วรอให้สารละลาย ตกตะกอนแยกชั้น เก็บแฟรกชั่นของเมทานอลและน้ำ เหลือแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนทิ้งไว้ในกรวยแยก เติมไดคลอโรมีเทนเพิ่ม และทำซ้ำให้ได้ทั้งหมด 3 ครั้ง ทำต่อไปโดยใช้ตัวทำละลายเป็นเอทิลอะซีเตต และ บิวทานอล 250 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดย ในแต่ละตัวทำละลายจะเขย่าและทำซ้ำ 3 ครั้ง ด้วยวิธีการแบบเดิม นำแฟรกชั่นที่ได้ของสารแต่ละชนิดไประเหยด้วยเครื่องโรตารี อีวาโพเรเตอร์ และระเหยแห้งโดยใส่ถ้วยระเหยสารวางบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

ส่วนที่ 1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้ง

การเตรียมเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์

เพาะเลี้ยงเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์โดยนำเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์รหัสสายพันธุ์ 90028 (American Type Culture Collection; ATCC 90028) บนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อซาบอรอดเดกโตรสอะการ์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมาเขี่ยเชื้อใส่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.9 เตรียมให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 2-2.5 x 106 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราของสารสกัดในแต่ละแฟรกชั่นจากผลสมอพิเภกแห้ง ด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชั่น

นำแต่ละแฟรกชั่นจากผลสมอพิเภกแห้งที่ได้มาหาส่วนที่ออกฤทธิ์ด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชั่น ที่ความเข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งกลุ่มควบคุมแบ่งเป็น 2 กลุ่มดังนี้ กลุ่มควบคุมบวกคือ สารประกอบนิสเตตินความเข้มข้น 100 ยูนิต กลุ่มควบคุมลบคือไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 100 และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดของเหลวด้วยของเหลว ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล อะซีเตต บิวทานอล และเมทานอล หลังจากนั้นหยดสารสกัดในแต่ละแฟรกชั่นจากผลสมอพิเภกแห้งลงบนเปเปอร์ดิสก์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรในปริมาตร 20 ไมโครลิตรให้พอดีกับเปเปอร์ดิสก์ แล้ววางเปเปอร์ดิสก์ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่เกลี่ยเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ลงไปแล้ว ทำการทดลองอีก 2 ชุด หลังจากนั้นทำซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของขอบเขตการยับยั้งซึ่งจะเห็นเป็นวงใสรอบดิสก์ โดยจะวัดได้จากขอบเขตของวงใสที่ชัดเจนมากที่สุดซึ่งดูได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งเมื่อทำการทดลองพบว่ามีเพียงสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนที่ออกฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ จึงจะใช้สารสกัดในส่วนนี้ในการทดสอบฤทธิ์ต่อไป

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชั่น

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชั่น แบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง กลุ่มทดลองคือ สารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งที่ละลายในไดเมทิล ซัลฟอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 100 โดยเตรียมความเข้มข้นสูงสุดเป็น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และลดความเข้มข้นทีละ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น

50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รวมเป็นจำนวน 8 หลอด กลุ่มควบคุมแบ่งเป็น 2 กลุ่มดังนี้ กลุ่มควบคุมบวกคือ สารประกอบนิสเตตินความเข้มข้น 100 ยูนิต และกลุ่มควบคุมลบคือไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 100 และไดคลอโรมีเทน หลังจากนั้นหยดสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงบนเปเปอร์ดิสก์ วางเปเปอร์ดิสก์ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่เกลี่ยเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ลงไปแล้ว แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของขอบเขตการยับยั้งซึ่งจะเห็นเป็นวงใสรอบดิสก์ โดยจะวัดได้จากขอบเขตของวงใสที่ชัดเจนมากที่สุดซึ่งดูได้ด้วยตาเปล่า

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งด้วยวิธีไมโครบรอท ไดลูชั่น

แบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองคือสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งในปริมาณที่มีความเข้มข้นซึ่งทดสอบโดยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชั่น ที่ทำให้เกิดขอบเขตการยับยั้งเห็นเป็นวงใสรอบดิสก์ที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดมาเจือจางให้ความเข้มข้นของสารสกัดลดลงครั้งละ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงในไมโครไตเตอร์เพลตตามลำดับ มีกลุ่มควบคุมบวกคือ ยาน้ำแขวนตะกอนนิสเตตินความเข้มข้น 97.66 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และกลุ่มควบคุมลบ 2 ตัว คือ ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ที่ถูกทำให้เจือจางเท่ากับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการละลายสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งและอาหารเลี้ยงเชื้อเปล่า

นำสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งที่ละลายในไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 100 มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดวงใสจากการทดลองด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชั่น โดยนำสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งในไดเมทิล ซัลฟอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 100 มาเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นสูงสุดเป็น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รวมเป็นจำนวน 7 หลุม นำสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ใส่ลงในหลุมจากความเข้มข้นมากที่สุดไปน้อยที่สุดตามลำดับ หลุมละ 100 ไมโครลิตร กลุ่มควบคุมลบคืออาหารเลี้ยงเชื้อเปล่าและสารละลายไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ที่ถูกทำให้เจือจางเท่ากับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการละลายสารสกัดสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งโดยมีความเข้มข้นร้อยละ 12.5 สำหรับกลุ่มควบคุมบวกใช้ยาน้ำแขวนตะกอนนิสเตติน ความเข้มข้น 97.66 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมเชื้อลงไป 10 ไมโครลิตรในทุก ๆ หลุม ขณะที่ใส่เชื้อทำการดูดขึ้นลงประมาณ 6-8 ครั้งในแต่ละหลุมเพื่อให้สารเข้ากัน จากนั้นนำไมโครไตเตอร์เพลตไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง แล้วนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยดูจากหลอดที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่เจริญ แต่พบว่าสารสกัดสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทนไม่สามารถสังเกตความขุ่นของสารละลายได้เนื่องจากมีสีเข้ม

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อได้สามารถใช้การทดลองในชุดเดียวกันโดยนำสารผสมในหลอดทุกหลอดมาเพาะเชื้อโดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารจากหลุมขึ้นมา 50 ไมโครลิตรแล้วนำไปเพาะบนจานเลี้ยงเชื้อแล้วเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง เพื่อดูว่าจานใดที่ไม่มีเชื้อขึ้น ปริมาณสารในจานที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ไม่มีเชื้อขึ้น คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อได้

ส่วนที่ 2 ทดสอบพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์ของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้ง

การเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์ของมนุษย์

เซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นเหงือกที่ได้จากการผ่าตัดฟันคุดโดยนิสิตทันตแพทย์ชั้นคลินิก โรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ไม่มีโรคทางระบบ และไม่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นฝาปิดแผ่นเหงือกอักเสบ (Periocoronitis) ซึ่งมีอายุระหว่าง 18-25 ปี จำนวน 3 คน และได้เซ็นใบยินยอมให้เก็บชิ้นเหงือก โดยผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์ เริ่มทำในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิลิตร โดยแยกจานเพาะเลี้ยงเซลล์ตามชิ้นเหงือกที่ได้จากอาสาสมัครแต่ละคนด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เอ็กซ์แพลนท์ (explants culture technique) โดยนำชิ้นเหงือกที่ได้จาก

อาสาสมัครขนาดประมาณ 3 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มาล้างด้วยฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาไลน์ (phosphate buffer saline; PBS) จากนั้นตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ที่มีขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM; Sigma-Aldirch, St. Louis, MO, USA) ซึ่งมีซีรัมจากลูกวัว ในครรภ์ (fetal bovine serum; FBS; HyClone®, Logan, UT, USA) ความเข้มข้นร้อยละ 10 และ ยาปฏิชีวนะ เพนนิซิลลิน จี โซเดียม (Penicillin G sodium) 10,000 หน่วยต่อมิลลิลิตร สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (Streptomycin sulfate) 100,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แอมโฟเทอริซิน บี (Amphotericin B; GIBCOTM, Grand Island, NY, USA) 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอล กลูตามีน (L-glutamine, HyClone®) ความเข้มข้นร้อยละ 1 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2 วัน จนกระทั่งเซลล์เคลื่อน ออกจากชิ้นเนื้อและเจริญจนเต็มจานเลี้ยงประมาณ 2 สัปดาห์ จากนั้นถ่ายเซลล์ลงจานเลี้ยงใหม่ และ เริ่มนับเซลล์เป็นรุ่นที่ 1 การศึกษานี้จะใช้เซลล์รุ่นที่ 3 ถึง 5

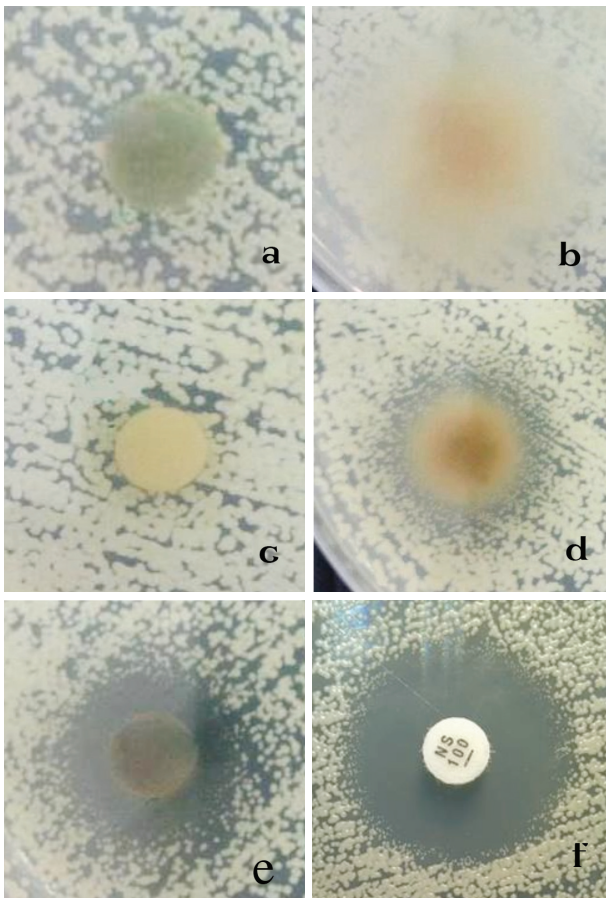
ทำการหว่านเซลล์ที่ทราบจำนวนลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกที่ศึกษาในครั้งนี้กำหนดจำนวนตัวอย่างเท่ากับ 3 ซึ่งได้จากอาสาสมัคร 3 คน เซลล์ของอาสาสมัครแต่ละคนจะถูกหว่าน 5 หลุม รวมเป็นทั้งหมด 15 หลุม มีจำนวนเซลล์ของแต่ละหลุม เป็น 2.5x103, 5.0x103, 1.0x104, 2.0×104 และ 4.0×104 เซลล์ต่อหลุม แล้วนำเข้าตู้อบเพาะเลี้ยง เซลล์เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นวัดจำนวนเซลล์ โดยใช้เทคนิคเอ็มทีที (MTT assay) นำผลมาหาความสัมพันธ์เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์และค่าดูดกลืนแสง เพื่อให้ได้เป็นกราฟมาตรฐาน

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกด้วยเทคนิคเอ็มทีที

การวัดผลโดยเทคนิคเอ็มทีที นำเซลล์เพาะเลี้ยงถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม โดยเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์ ทำงกลุ่มได้กำหนดจำนวนตัวอย่างเท่ากับ 3 ซึ่งได้จากอาสาสมัคร 3 คน เซลล์ของอาสาสมัครแต่ละคนจะถูกหว่าน 6 หลุม รวมเป็นทั้งหมด 18 หลุม ในแต่ละหลุมมีเซลล์จำนวน 5.0x104 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดดีเอ็มอีเอ็ม และเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 13-16 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมและนำเข้าตู้อบเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ต่อมาทดสอบโดยการหยดสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนที่ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติที่ปราศจากซีรัมหลุมละ 400 ไมโครลิตร ความเข้มข้นของสารสกัดแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนในแต่ละหลุมมีความเข้มข้นแตกต่างกัน 10 ระดับ โดยระดับความเข้มข้นที่เลือกใช้ ได้จากงานวิจัยที่ศึกษาสารประกอบในการต้านเชื้อราจากผลสมอพิเภกที่มี ได้ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ คือ 25,000 และ 30,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เตรียมความเข้มข้นของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทน 19, 39, 78, 156.25, 312.5 625, 1250, 2500, 5000 และ 10000 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร และมีอีกหนึ่งหลุมเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเดียวกับกลุ่มทดลองแต่ปราศจากสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทน โดยจะเริ่มทดสอบความเป็นพิษโดยใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนโดยวัดผลการทดสอบที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากหยดสาร จากนั้นใส่ 3-(4, 5- dimethylthiazol-2yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (USB Corp., Claveland, OH, USA) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด จากนั้นผลึกของฟอร์มาซานที่เซลล์สร้างขึ้นจากสารละลาย MTT ในแต่ละหลุมของจานเลี้ยง จะถูกละลายโดยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ (microplate reader; 2000 Alfred Nobel Drive, Hecules, CA 94547, Bio-Rad Laboratories,Inc., USA) ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเทียบเป็นค่าจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่กับเส้นกราฟมาตรฐาน ผลของการศึกษาแสดงเป็นร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การวิเคราะห์ข้อมูลในการทดลองนี้ใช้ Kolmogorov-Smirnov ในการทดสอบการแจกแจงปกติของข้อมูล แล้วจึงทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของร้อยละความมีชีวิต

ของเซลล์ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดสมอพิเภกในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนที่มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก โดยการเปรียบเทียบใช้ one-way analysis of variance; ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างแต่ละความเข้มข้นโดยการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย โดยใช้ Post hoc multiple comparison ชนิด Tukey's Honestly Significant Different (HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 โดยใช้โปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS v.17.0)



รูปที่ 1 *แสดงการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ของสารสกัดจากสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นต่าง ๆ ดังนี้ (a) แฟรกชั่นเฮกเซน (b) แฟรกชั่นเอทิล อะซิเตต (c) แฟรกชั่นน้ำ (d) แฟรกชั่นบิวทานอล (e) แฟรกชั่นไดคลอโรมีเทน (f) แผ่นดิสก์นิสเตตินเพื่อเป็นกลุ่มควบคุมบวก*

Figure 1 *Anticandidal activity of Terminalia bellirica compounds in hexane fraction (a), ethyl acetate fraction (b), aqueous fraction (c), butanol fraction (d), dichloromethane fraction (e) and Nystatin disc (f) against C. albicans by disc diffusion method*

ผลการศึกษา

ส่วนที่ 1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้ง

ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของสารสกัดในแต่ละแฟรกชั่นจากผลสมอพิเภกแห้งด้วยวิธีดิสก์ดิฟฟิวชั่น พบว่าไม่มีวงใสเกิดขึ้นรอบเปเปอร์ดิสก์ของสารสกัดในแฟรกชั่นเฮกเซน แฟรกชั่นเอทิล อะซีเตต และ แฟรกชั่นน้ำจากผลสมอพิเภกแห้ง พบวงที่มีความใสไม่สมบูรณ์ในแฟรกชั่นบิวทานอล และพบวงใสอย่างสมบูรณ์ของสารสกัดสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทน (รูปที่ 1) โดยกลุ่มควบคุมบวกคือแผ่นดิสก์นิสเตตินพบวงใสที่เกิดขึ้นมีความใสอย่างสมบูรณ์ สามารถวัดขนาดของวงใสได้ดังตารางที่ 1

ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชั่น ไม่พบวงใสที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 2 a และ b) พบวงที่มีความใสไม่สมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 2 b และ c) และพบวงใสอย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้นที่ 300, 350 และ 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 2 c และ d) วงใสที่เกิดขึ้นรอบแผ่นดิสก์นิสเตตินที่เป็นกลุ่มควบคุมบวกมีความใสเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ทำให้แยกบริเวณที่ปราศจากเชื้อออกจากบริเวณที่มีเชื้อได้อย่างชัดเจนจนสามารถวัดขนาดของวงใสได้ดังสำหรับเปเปอร์ดิสก์ที่หยดไดเมทิล ซัลฟอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 100 และไดคลอโรมีเทน (กลุ่มควบคุมลบ) ไม่ปรากฏวงใส (รูปที่ 2)

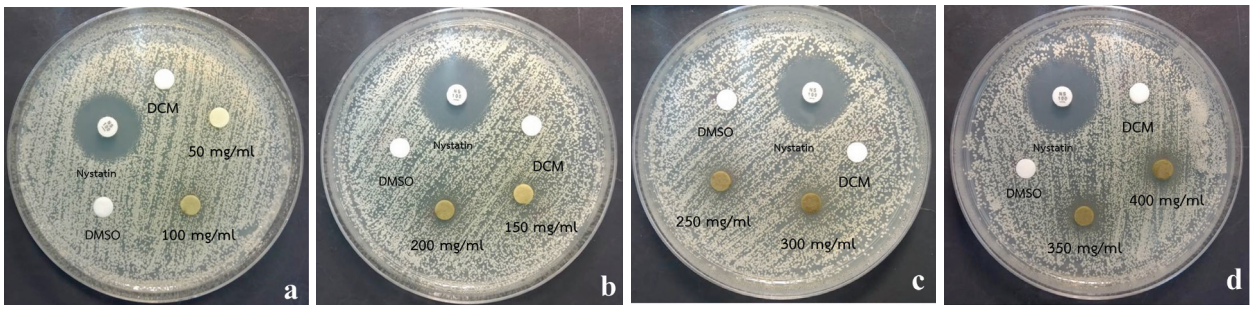
เนื่องจากผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกแห้งด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชั่นเริ่มเห็นวงใสอย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงใช้ค่าความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นความเข้มข้นเริ่มต้นในการทำไมโครบรอท ไดลูชั่น เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งและฆ่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ที่แน่นอน พบว่าไม่สามารถสังเกตความขุ่นของสารละลายได้ เนื่องจากสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกแห้งมีสีเข้ม ส่งผลให้ไม่สามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของ

ตารางที่ 1 *ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ของสารสกัดสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นต่าง ๆ ด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชั่น*

Table 1 *The mean of inhibition zones (mm) and standard deviation caused by antifungal activity of Terminalia bellirica compounds in different fractions on Candida albicans in the disc diffusion method*

แฟรกชั่น	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (มม.) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
เฮกเซน	0
ไดคลอโรมีเทน	7.30±0.24
เอทิล อะซีเตต	0
บิวทานอล	-
น้ำ	0
สารละลายไดเมทิล ซัลฟอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 100	0
สารประกอบยานิสเตตินเข้มข้น 100 ยูนิต	18.33±0.2 4

สัญลักษณ์ - คือ ไม่สามารถวัดขนาดของวงใสได้เนื่องจากลักษณะของวงใสมีความใสไม่สมบูรณ์
- This symbol is used to refer to the diameter of clear zone was not obtained since it was not complete clear.



รูปที่ 2 *การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ของสารสกัดจากสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทนความเข้มข้นต่าง ๆ กันด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชั่น พบว่าแผ่นเปเปอร์ดิสก์ของสารประกอบไดเมทิล ซัลฟอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 100 (DMSO) และสารละลายไดคลอโรมีเทน (DCM) ไม่ปรากฏวงใส แผ่นดิสก์นิสเตตินพบลักษณะของวงใสที่ปรากฏขึ้นอย่างสมบูรณ์ และแผ่นเปเปอร์ดิสก์ของสารละลายของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้ง ความเข้มข้น 50 100 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไม่ปรากฏวงใส (a และ b) ส่วนความเข้มข้น 200 และ 250 ปรากฏลักษณะของวงใสที่ไม่สมบูรณ์ (b และ c) และความเข้มข้น 300 350 และ 400 เกิดวงใสอย่างสมบูรณ์ (c และ d)*

Figure 2 *Anticandida activity assay of Terminalia bellirica compounds in dichloromethane fractions against C. albicans by disc diffusion method. The 100% dimethyl sulfoxide discs (DMSO) and dichloromethane solution discs (DCM) showing no inhibition zone. The nystatin discs showing complete clear inhibition zone. The dics of Terminalia bellirica compounds in dichloromethane fraction at 50, 100 and 150 mg/ml showing complete clear inhibition zone (a and b). The dics of Terminalia bellirica compounds in dichloromethane fraction at 200 and 250 mg/ml showing incomplete clear inhibition zone (b and c). The dics of Terminalia bellirica compounds in dichloromethane fraction at 300, 350 and 400 mg/ml showing complete clear inhibition zone (c and d).*

เชื้อราได้ ด้วยเหตุนี้จึงปรับวิธีการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยการนำสารผสมในหลุมทดลองทุกหลุมมาเพาะเชื้อแล้วนับจำนวนเชื้อที่หลุมที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อขึ้น เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้คือ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนหลุมที่มีความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีร้อยละการยับยั้งเชื้อที่ 99.93 ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีร้อยละการยับยั้งเชื้อที่ 96.51 ดังนั้นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ คือ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อได้คือ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนหลุมที่มีความเข้มข้น 5 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีเชื้อขึ้นมากจนไม่สามารถนับจำนวนโคโลนีได้ (ตารางที่ 2) กลุ่มควบคุมบวกคือยาน้ำแขวนตะกอนนิสเตตินที่ความเข้มข้น 99.76 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่มีเชื้อขึ้น และกลุ่มควบคุมลบมี 2 ตัว ได้แก่ ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 100 เท่ากับปริมาตรของสารสกัดสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทนในหลุมที่มีความเข้มข้นสูงสุดในชุดการทดลอง เมื่อนำไปบ่มเช่นเดียวกับกลุ่มทดลอง พบว่าสารละลายมีความขุ่นและเมื่อนำมาเพาะเชื้อพบว่ามีเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ขึ้นจนไม่สามารถนับจำนวนโคโลนีได้เช่นกัน แสดงให้เห็นว่าไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ร้อยละ 100 ไม่มีผลต่อการยับยั้งและฆ่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ และนอกจากนี้มีการนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาเพาะเชื้อแล้วบ่มเหมือนกับกลุ่มทดลอง แล้วนำมาเพาะเชื้อที่เกิดขึ้นเพื่อเป็นกลุ่มควบคุมลบ พบว่ามีเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ขึ้นจนไม่สามารถนับจำนวนโคโลนีได้ อีกทั้งยังมีการทดสอบการปนเปื้อนของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาบ่มในตู้บ่มเหมือนกับกลุ่มทดลอง จากนั้นดูความใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะใส แสดงว่าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีการปนเปื้อน

ส่วนที่ 2 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์

ในการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทนต่อ เซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์ของอาสาสมัคร โดยแสดงในรูปค่าเฉลี่ยของร้อยละความมีชีวิตของเซลล์จากอาสาสมัครทั้ง 3 คน พบว่า ค่าความเข้มข้นที่ทำให้ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) คือตั้งแต่ 1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป และค่าความเข้มข้นที่มากที่สุดที่ทำให้ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p\geq0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 *แสดงร้อยละการยับยั้งเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ของสารสกัดจากสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทนจากการทดสอบโดยวิธีไมโครบรอท ไดลูชั่น*

Table 2 *The percentage of anticandidal activity of Terminalia bellirica compounds in dichloromethane fraction determined by micro broth dilution method*

การทดลอง	จำนวนเชื้อเริ่มต้น (โคโลนี/มิลลิลิตร)	ร้อยละการยับยั้งเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ของสารสกัดจากสมอภิเภกแห้งในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้นต่างๆ						
		5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
ครั้งที่ 1	2.5×10^5	TNTC	TNTC	TNTC	96.66	99.94	100	100
ครั้งที่ 2	2.25×10^5	TNTC	TNTC	TNTC	97.17	99.92	100	100
ครั้งที่ 3	1.8×10^5	TNTC	TNTC	TNTC	95.71	99.94	100	100
ค่าเฉลี่ย	2.2×10^5	TNTC	TNTC	TNTC	96.51	99.93	100	100

หมายเหตุ TNTC (too numerous to count) คือ มีจำนวนโคโลนีมากจนนับไม่ได้

TNTC means too numerous to count

บทวิจารณ์

การทดลองนี้ได้ใช้ผลสมอพิเภกแห้งที่ซื้อจากร้านสมุนไพรในจังหวัดนนทบุรี ประเทศไทย ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดหยาบ จากนั้นนำไปสกัดด้วยวิธีสกัดของเหลวด้วยของเหลว พบว่าส่วนออกฤทธิ์อยู่ในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทน โดยความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์อยู่ที่ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความสามารถในการฆ่าเชื้ออยู่ที่ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การการศึกษาที่ผ่านมาของปิยวรรณและคณะ ในปีพ.ศ. 2558 ใช้สารสกัดหยาบจากเปลือกและเนื้อของผลสมอพิเภกแห้งจากจังหวัดระนองมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อราได้ที่ความเข้มข้นที่สูงกว่าการศึกษานี้ 75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถฆ่าเชื้อราได้ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร[12] ส่วนการศึกษาของ Elizabeth ในปี ค.ศ. 2005 ที่ทำการศึกษาถึงผลของสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกแห้งโดยใช้เนื้อและเปลือกที่ปลูกในประเทศอินเดียและใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายแล้วนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ พบว่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้มีค่าต่ำกว่ามาก คือ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร[13] จะเห็นได้ว่าซึ่งฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกแห้งของทั้งสามการศึกษามีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแตกต่างกันนี้ อาจเนื่องจากลักษณะภูมิประเทศที่แตกต่างกันของแหล่งปลูกสมอพิเภก วิธีการสกัดสาร และตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและละลายสารสกัดต่างกัน จึงได้สารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแตกต่างกัน

ตารางที่ 3 *ค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเทคนิคเอ็มทีที*

Table 3 *The percentage of viable fibroblast cells number from cytotoxicity of Terminalia bellirica compounds in dichloromethane fraction determined by MTT assay.*

ความเข้มข้นของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์			ค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	อาสาสมัครคนที่ 1	อาสาสมัครคนที่ 2	อาสาสมัครคนที่ 3	
0	100.00	100.00	100.00	100.00 ± 0.00
19	105.12	80.69	67.36	84.39 ± 19.15
39	80.66	83.86	110.42	91.64 ± 16.33
78	155.16	108.47	109.72	124.45 ± 26.59
156.25	132.45	89.68	96.53	106.22 ± 22.98
312.5	104.32	89.95	95.83	96.70 ± 7.22
625	62.19	72.35	95.24	76.59 ± 16.93
1,250	48.42	56.54	34.13	46.36 ± 11.34
2,500	34.66	27.16	43.65	35.15 ± 8.25
5,000	41.63	31.85	47.62	40.36 ± 7.95
10,000	54.73	61.23	64.29	60.08 ± 4.87

การศึกษานี้ใช้ตัวทำละลายที่สามารถละลายสารสกัดจากผลสมอพิเภกแห้งได้ดีคือ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่สามารถละลายสารได้หลายชนิด เนื่องจากเป็นสารละลายแบบโพลาร์ อะโพรติก ที่สามารถละลายได้ทั้งสารประกอบมีขั้วและไม่มีขั้ว จึงสามารถละลายเทอร์มิลิกแนนส์ แทนนิลิกแนนส์ 7-ไฮดรอกซี-3,4-เมทิลลีน ไดออกซีฟลาวาน และอะโนลิกแนนส์ บี ซึ่งเป็นสารที่มีขั้วต่ำและเป็นสารสำคัญในสมอพิเภก อีกทั้งยังสามารถเข้ากับน้ำที่ใช้เป็นตัวทำละลายร่วมได้และไม่ระเหยง่ายจึงทำให้สารละลายมีความเข้มข้นคงที่ ดังนั้นจึงนิยมใช้ละลายสารประกอบที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ จากการทดลองนี้พบว่าไดเมทิล ซัลฟอกไซด์สามารถละลายได้ทั้งสมอพิเภกแห้งที่ความเข้มข้น 1,200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทนจากสมอพิเภกแห้งที่ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรได้ และยังไม่พบวงใสที่ปรากฏรอบแผ่นเปเปอร์ดิสก์ที่หยดไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ในการทดสอบด้วยวิธีดิสก์ดิฟฟิวชั่น แสดงให้เห็นว่าไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ นอกจากนี้ในการทดสอบไมโครบรอท ไดลูชั่น พบว่าสารผสมในหลุมของไดเมทิล ซัลฟอกไซด์มีลักษณะขุ่น และเมื่อนำมาเพาะเชื้อ พบว่ามีเชื้อขึ้นมากจนนับไม่ได้ แสดงให้เห็นว่าไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ ไม่มีผลต่อการยับยั้งและฆ่าเชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์

จากงานวิจัยของ Valsaraj และคณะในปีค.ศ. 1997[10] พบว่าสารที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ ได้แก่ เทอร์มิลิกแนนส์ แทนนิลิกแนนส์ 7-ไฮดรอกซี-3,4-เมทิลลีน ไดออกซีฟลาวาน และอะโนลิกแนนส์ บี มีโครงสร้างที่มีความเป็นขั้วต่ำ ในการสกัดของเหลวด้วยของเหลวตัวทำละลายควรละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี มีจุดเดือดไม่สูงนักเพื่อที่จะกำจัดออกไปจากสารที่ต้องการได้ง่ายหลังการสกัด ซึ่งการใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันจะทำให้แบ่งสารออกตามความมีขั้ว โดยทางคณะวิจัยได้ใช้ตัวทำละลายที่เรียงลำดับการมีขั้วจากต่ำไปสูงดังนี้[14] เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล อะซีเตต และบิวทานอล ดังนั้นทางกลุ่มวิจัยจึงคาดว่าสารที่ออกฤทธิ์จะละลายอยู่ในแฟรกชั่นของเฮกเซนหรือไดคลอโรมีเทน และหลังจากการนำแต่ละแฟรกชั่นไปทดสอบ พบว่าสารที่ออกฤทธิ์ละลายอยู่ในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนเท่านั้น งานวิจัยของ Valsaraj และคณะในปี 1997 กล่าวว่า สารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์ คือกลุ่ม ลิกแนนส์[10] ในขณะที่ผลการทดลองของทางกลุ่มที่ได้บอกได้แต่เพียงว่าสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนที่มีผลฆ่าเชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์ นั้นเป็นสารประกอบที่มีดัชนีขั้ว

ด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชั่น สารสกัดสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทนจากสมอพิเภกแห้งเกิดวงใสที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธีไมโครบรอท ไดลูชั่นพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถฆ่าเชื้อได้ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หากสังเกตว่าเมื่อทำดิสก์ ดิฟฟิวชั่นพบวงใสของการยับยั้งที่ความเข้มข้นสูงกว่าการทำไมโครบรอท ไดลูชั่นมาก ซึ่งคาดว่าอาจเกิดจากการที่สารสกัดสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทนมีความหนืดสูงทำให้ส่วนที่ออกฤทธิ์แพร่ออกไปรอบเปเปอร์ ดิสก์ได้น้อย

ในการนำสมุนไพรมาใช้อย่างปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ ต้องมีการคำนึงถึงขนาดและปริมาณของสมุนไพรที่เหมาะสม รวมถึงมีการคำนึงถึงความเป็นพิษของสมุนไพรหากนำมาใช้ในปริมาณที่มากเกินไป มีการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมอพิเภกในหนูทดลองพบว่าปริมาณสารสกัดหยาบสมอพิเภกที่หนูได้รับแล้วทำให้หนูตายคือ ปริมาณตั้งแต่ 10 กรัม ต่อน้ำหนักตัวของหนู 1 กิโลกรัม[15] ขณะเดียวกันก็มีรายงานเรื่องความเป็นพิษจากสารสกัดกลุ่มลิกแนนจากพืชที่นำมารับประทานได้ ต่อเซลล์สร้างเส้นใยบริเวณผิวหนังอวัยวะเพศของมนุษย์ (human genital skin fibroblast) และเซลล์เนื้อเยื่อต่อมลูกหมาก (prostate tissue)[16] และจากผลการทดลองของเราแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งมีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์ โดยความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกของมนุษย์นั้นต่ำกว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ สันนิษฐานว่า สาเหตุที่ทำให้เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกตายได้นั้น เป็นเพราะสารสกัดที่ได้ยังมีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอ สืบเนื่องจากสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนนั้นประกอบไปด้วยสารประกอบหลายประเภท สารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนซึ่งแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบางด้วยวัฏภาค

เคลื่อนที่ จะเห็นได้ว่าในสารสกัดของแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทน เมื่อมองภายใต้แสงธรรมชาติและภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร แล้วสเปรย์ด้วยแอนนิซอลดิไฮด์แล้วผ่านความร้อน (anisaldehyde spray reagent) และสเปรย์ด้วยโพแทสเซียม เฮกซาไซยาโนเฟอร์เรตทรี ทีเอส (potassium hexacyano ferrate (III) TS) ตามด้วยไอรอนทรีคลอไรด์ ทีเอส (iron chloride (III) TS) บนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบบาง สามารถแบ่งย่อยโดยคร่าวได้เป็น 9 แถบ และ 18 แถบ ตามลำดับ จากการทำทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่า ในสารสกัดแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบไปด้วยสารขั้นต่ำอย่างน้อย 11 ชนิดย่อย ซึ่งในงานวิจัยไม่สามารถที่จะควบคุมความเข้มข้นของสารแต่ละตัวได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ที่ได้อาจมีค่าต่ำกว่าความเป็นจริงจากสารหนึ่ง ๆ ในนั้น ซึ่งอาจไม่ใช่ตัวที่มีฤทธิ์ยับยั้ง หรือฆ่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ที่ปะปนอยู่ในสารสกัด

การศึกษาต่อไปอาจมุ่งการสกัดให้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นจนถึงระดับที่ความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์ โดยที่ความเข้มข้นดังกล่าวต้องไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์ด้วยเช่นกัน หากกรณีที่ทำให้สารสกัดจากสมอพิเภกได้เป็นสารบริสุทธิ์แล้ว แต่ยังพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์อยู่ อาจเปลี่ยนการนำไปใช้ของสารสกัดดังกล่าวไปใช้ในรูปแบบอื่นแทนการใช้ในช่องปากโดยตรง เช่น เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อราชนิดแช่ฟันปลอม

นอกจากนี้ อาจจะมีความเป็นพิษของสารที่ใช้ในการสกัดเหลือตกค้างอยู่ ในที่นี้ คือ สารไดคลอโรมีเทน ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้ในการสกัดสารต่าง ๆ โดยสารไดคลอโรมีเทนอาจมีผลต่อค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ได้ จากการศึกษาเรื่องความเป็นพิษของไดคลอโรมีเทนต่อเซลล์สัตว์และเซลล์มนุษย์ โดยองค์กรไอพีซีเอส (International Programme on Chemical Safety; IPCS) รายงานว่าไดคลอโรมีเทนมีผลทำลายดีเอ็นเอสายเดี่ยว ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่ยังไม่มีรายงานแน่ชัดว่า ส่งผลให้เกิดกลายพันธุ์ของยีน[17] ฉะนั้นในการทดลองต่อไป จึงควรตรวจสอบการตกค้างของสารไดคลอโรมีเทน และควรทดสอบความเป็นพิษของสารไดคลอโรมีแทนต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์ของมนุษย์ร่วมด้วย

ทั้งนี้อาจมีความผิดพลาดที่เกิดจากการทดสอบมีความอ่อนไหวทาง MTT assay เช่น ในขั้นตอนการนำเซลล์ลงหลุมจานเพาะเลี้ยงดูดได้จำนวนเซลล์ไม่เท่ากัน เนื่องจากเซลล์กระจายตัวไม่ดี และการดูดสารออกจากหลุมที่ใส่สาร MTT แล้วอาจมีการดูดผลึกฟอร์มาซานที่ทำปฏิกิริยาแล้วออกไป ซึ่งอาจจะมีผลทำให้ค่าดูดกลืนแสงมีความคลาดเคลื่อนได้[18,19]

ยังมีอีกหลายปัจจัยที่อาจส่งผลให้ค่าการทดสอบออกมาคลาดเคลื่อนได้ เพื่อขจัดปัจจัยเหล่านั้น ในการทดลองครั้งต่อไปจึงควรทำให้สารสกัดมีความบริสุทธิ์มากขึ้น และใช้สารในการสกัดที่มีความปลอดภัย และส่งผลต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตให้น้อยที่สุด แต่การสกัดสารให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นย่อมใช้กระบวนการที่ซับซ้อน เวลาและค่าใช้จ่ายที่เพิ่มมากขึ้น และไม่สามารถยืนยันว่าความบริสุทธิ์ของสารสกัดที่มากขึ้นจะให้ประสิทธิภาพในการยับบั้งเชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์ดีขึ้น เพราะผลในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อนั้นอาจมีสารอื่นๆในสารสกัดหยาบส่งเสริมฤทธิ์ในการยังยั้งหรือฆ่าเชื้อได้ดีกว่าก็เป็นได้

บทสรุป

สารสกัดสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ โดยความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งที่สามารถยับยั้งเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ได้ร้อยละ 96.51 คือ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมอพิเภกแห้งในแฟรกชั่นไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งที่สามารถฆ่าเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ร้อยละ 99.93 คือ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนั้นแล้วสารสกัดในแฟรกชั่นของไดคลอโรมีเทนจากผลสมอพิเภกแห้งมีพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์ โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกมนุษย์ คือ 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยนเรศวร คณะผู้ทำวิจัยขอขอบคุณคณะทันตแพทยศาสตร์ และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรที่ให้ความ

อนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ ขอขอบคุณ คุณกุสุมา แจ่มดี นักวิทยาศาสตร์ประจำคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และคุณวิภาดา บุญส่งแท้ นักวิทยาศาสตร์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่แนะนำด้านเทคนิควิธีการปฏิบัติการวิจัย และ อ.ทญ.พรสุดา หน่อไชย ที่ให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูลด้านสถิติ

เอกสารอ้างอิง

1. Neville BW, Damm DD, Allen CM. *Oral & maxillofacial pathology*. 4th ed. St. Louis, Saunders Elsevier; 2015.
2. Rajendran R, Sivapathasundharam B. *Shafer's textbook of Oral Pathology*. 6thed. India: Elsevier Pub; 2010: 363-364.
3. Vylkova S, Carman JA, Danhof AH, et al. The Fungal Pathogen *Candida albicans* Autoinduces Hyphal Morphogenesis by Raising Extracellular pH. *MBio* 2011; 2(3): 1-12.
4. McManus BA, Coleman CC. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans. Infect Genet Evol* 2014; 21: 166–178.
5. Rao PK. Oral Candidiasis – A Review. *Scholarly J Med* 2012; 2(2): 26-30.
6. Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC. Antimicrobial susceptibility testing protocols: United States of America on acid-free paper. Florida: CRC Press 2007.
7. Ahmed SH, Amin MA, Saafan AE, El-Gendy AO, Islam M. Measuring susceptibility of *Candida albicans* biofilms towards antifungal agents, *Pharm Lett* 2013; 5 (1): 376-383.
8. Kittiya C, Nantawan K. *Essential extract extraction method and formulation of Antifungal cram from Cassia alata (L.) Roxb*. Phitsanulok: Naresuan University; 2011, 5. (In Thai)
9. Nantawan B, Oranuch C. Traditional herbs 4. Bangkok: Department of Pharmacy Mahidol University, BIOTEC; 2000: 175-176. (In Thai)
10. Valsaraj R, Pushpangadan P, Smitt UW, et al. New Anti-HIV-1, Antimalarial, and Antifungal Compounds from *Terminalia bellerica. J Nat Prod* 1997; 60(7): 739-742.
11. Begum SA, Ray AB, Sahai M. Non-conventional Lignans: Coumarinolignans, Flavonolignans, and Stilbenolignans. *Fortschr Chem Org Naturst* 2010; 93: 1-70.
12. Jitjam P, Senaphan C, Aiumdee P, Keawjurat O, Pipatphatsakorn M. Antifungal activity of *Terminalia bellerica* fruit crude extract on *Candida albicans. Naresuan Phayao J*. 2015; 8(3): 159-162. (In Thai)
13. Elizabeth KM. Antimicrobial activity of *Terminalia bellerica. Indian J ClinBiochem* 2005; 20(2): 150-153.
14. Paul S. Solvent Miscibility and Viscosity Chart. *The HPLC Solvent Guide.* Wiley-Interscience; 2002.
15. Gilani AH, Khan AU, Ali T, Ajmal S. Mechanisms underlying the antispasmodic and bronchodilatory properties of Terminalia bellerica fruit. *J Ethnopharmacol* 2008; 116(3): 528-538.
16. Evans BA., Griffiths K, Morton MS. Inhibition of 5α-reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *J. Endocrinol* 1995; 147: 295-302.
17. International Programme on Chemical Safety (1999) *International Agency for Research on Cancer (IARC)* 1999, 71: 251.
18. EURL ECVAM DataBase Service [URL of database on the Internet]. MTT assay. EURL ECVAM DataBase Service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM) [cited 2017 March 12] Available from: https://ec.europa.eu/jrc/en/scientific-tool/database-alternative-methods-animal-experimentation.

19. Sieuwerts AM, Klijn, JG. M., Peters HA, Foekens JA. The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures in vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC50-Values and Cell Survival. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 813-823.