บทวิทยาการ
Original Article

ฤทธิ์ต้านจุลชีพในช่องปากของสารสกัดรากหญ้าแฝก
Anti-Oral Microbial Activity of Root Extracts of *Vetiveria zizanoides* (L.) Nash ex Small

เกษร นันทจิต[1], สาครรัตน์ คงขุนเทียน[2]
[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[2]ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Khesorn Nantachit[1], Sakornrat Khongkhunthian[2]
[1]Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University
[2]Department of Restorative Dentistry and Periodontology, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University

ชม.ทันตสาร 2555; 33(1) : 39-49
CM Dent J 2012; 33(1) : 39-49

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพก่อโรคในช่องปากและหาสูตรโครงสร้างของสารสำคัญในรากหญ้าแฝก ทำการตรวจฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นของสารสกัดรากหญ้าแฝก 4 ชนิด คือ ปางบง อินเดียใต้ ศรีลังกา และแม่เตี๊ยะ ด้วยวิธี agar diffusion จากนั้นนำสารสกัดจากรากหญ้าแฝกมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคฟันผุ โรคติดเชื้อในคลองรากฟัน โรคปริทันต์ และเชื้อรา รวม 10 สายพันธุ์ และหาค่าเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรียและเชื้อราโดยวิธี broth dilution จากนั้นคัดเลือกสารสกัดรากหญ้าแฝกมาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโต-กราฟีและรงคเลขผิวบางแบบหนา พิสูจน์สูตรโครงสร้างโดยใช้สเปคโตโฟโตมีเตอร์ชนิดอุลตราไวโอเลต อินฟราเรด และนิวเคลียร์แมกเนติค เรโซแนนซ์ สเปคโตรโฟโตมีเตอร์ รวมทั้งแมสสเปคโตรมีเตอร์ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดรากปางบงออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ

Abstract

The aims of this study were to determine the anti-microbial activities of *Vetiveria zizanoides* (L.) Nash ex Small root extracts against oral pathogens and to elucidate the molecular structure of a pure fraction of the extract. A primary screening for the anti-microbial activities of four types from *V. zizanoides*, including, Pangbong, South India, Srilangkhaa, and Maetia, was performed by an agar diffusion method. The extracts were further tested against ten oral pathogens, including cariogenic, endodontic, and periodontal bacteria as well as oral fungi. The evaluations of minimal bactericidal concen-tration (MBC) and minimal fungicidal con-centration (MFC) using a broth dilution method were performed. Then the

Corresponding Author:

สาครรัตน์ คงขุนเทียน
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

Sakornrat Khongkhunthian
Assistant Professor Dr., Department of Restorative Dentistry and Periodontology, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.
E-Mail: sakornratk@hotmail.com

เบื้องต้นได้ดีที่สุด เมื่อทดสอบกับจุลชีพก่อโรคในช่องปากพบว่าสารสกัดรากปางบงออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด รองลงมาคือศรีลังกา เมื่อศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลชีพ พบว่าสารสกัดรากศรีลังกาให้ผลดีกว่าสารสกัดชนิดอื่น จึงนำสายพันธุ์ศรีลังกามาศึกษาโครงสร้างต่อ พบว่าสารสำคัญในรากศรีลังกาเป็นแอลคาลอยด์ vetiverin การศึกษานี้สรุปได้ว่าสารสกัดของรากหญ้าแฝกมีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพในช่องปาก และอาจนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิกได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาต่อไปโดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างจุลชีพจากช่องปากของผู้ป่วยให้มากขึ้น

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านจุลชีพในช่องปาก หญ้าแฝก เชื้อก่อโรคในช่องปาก

appropriate root extract was selected, and purified by column chromatography and preparative thin layer chromatography. The alkaloid was isolated and elucidated by UV, IR, NMR and GC-MS spectra. The results revealed that the Pangbong root extract exerted the best anti-microbial activity in the primary screening test. For anti-oral micro-bial activities, the root extracts of Pangbong showed the highest potency, and followed by Srilangkhaa. For MBC and MFC analyses, the root extracts of Srilangkhaa yielded a better outcome than other extracts. The root extracts of Srilangkhaa was then selected and further analyzed. The structure of alkaloid "vetiverin" was found. It was concluded that *V. zizanoides* root extract has an anti-microbial activity and may be used as an agent for dental applications in the clinical settings. However, more clinical isolates from patients should be tested in the future study.

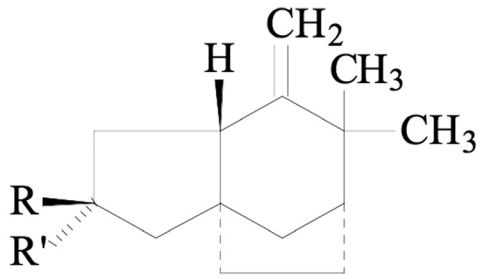
Keywords: Anti-oral microbial activity, *Vetiveria zizanoides*, oral pathogens

บทนำ

หญ้าแฝก (*Vetiveria zizanoides* (L.) Nash ex Small) เป็นพืชอายุหลายปีหรือหลายฤดู มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยค่อนข้างสูง มีเอกลักษณ์ภายนอกเป็นต้นแตกกอหรือแตกหน่อแน่น ความสูงประมาณ 1-2 เมตร โคนต้นแผ่แบน โคนใบเรียงซ้อนอัดแน่น ปลายใบแหลม ขอบใบคม ใบยาว 45-100 เซ็นติเมตร กว้าง 0.6-1.2 เซ็นติเมตร หลังใบโค้ง ใบสีเขียวเข้ม เนื้อใบค่อนข้างเนียนมีไขเคลือบมากทำให้ดูเป็นมัน ท้องใบสีขาวซีดกว่าด้านหลังใบ ดอกสีเหลืองปนเทาหรือสีม่วง ดอกตัวผู้มีก้านดอก ดอกสมบูรณ์เพศไม่มีก้านดอก เมล็ดลีบ ราก เป็นระบบรากฝอย เจริญหยั่งลึกลงในดินประมาณ 3 เมตร[1] เอกลักษณ์ภายในของรากหญ้าแฝกพบเม็ดแป้ง (starch grains) ชนิดเดี่ยวและกลุ่มจำนวนมากมายภายในและภายนอกเซลล์พาเรงคิมา (parenchyma cell) และเม็ดน้ำมัน (oil granules) รวมทั้งผลึกแคลเซียมออกซาเลทกระจัดกระจายภายในและภายนอกเซลล์ พบเวสเซลขนาดใหญ่ เซลล์เส้นใย เซลล์สโตนเซลล์เกลอรีด (sclereid cell) และพบขนเซลล์เดี่ยวซึ่งมีเอกลักษณ์แตกต่างกันเล็กน้อยในแต่ละสายพันธุ์[1]

มีการศึกษาพบว่าหญ้าแฝกสามารถเก็บกักน้ำไว้ได้ดีเช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น เช่น *Dichantium annulatum*, *Panicum maximum* และ *Cymbopogon martini*[2] ซึ่งเป็นคุณสมบัติเด่นของหญ้าแฝกในการอนุรักษ์ดินและน้ำให้มีความอุดมสมบูรณ์และรักษาหน้าดินไม่ให้พังทลายง่ายจากการชะล้างของน้ำ นอกจากนั้นหญ้าแฝกยังสามารถ

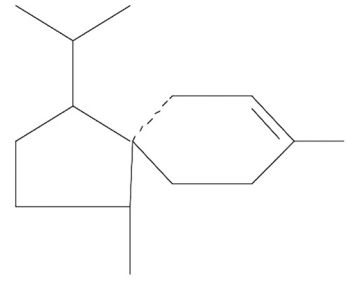
เก็บความชื้นในดินและเก็บกักไนโตรเจน กำจัดสิ่งเป็นพิษและสารเคมีไม่ให้ไหลลงแม่น้ำลำคลอง[3,4] ปลูกขยายพันธุ์ง่าย จึงมีการใช้หญ้าแฝกอนุรักษ์ดินในประเทศแถบเอเชียหลายประเทศ ที่สำคัญยังมีการศึกษาพบว่าสารสกัดของหญ้าแฝกยังมีฤทธิ์ทางการแพทย์ด้วย โดยพบว่า Zizanal และ Epizizanal (รูปที่ 1) เป็นสารที่สกัดได้จากรากของหญ้าแฝก สารทั้ง 2 ตัวนี้เป็นสารประกอบอัลดีไฮด์และมีฤทธิ์ไล่แมลง[5] โดย Nuchuchua และคณะ (2009) รายงานว่าส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยของหญ้าแฝกและพืชอื่นๆ สามารถไล่ยุงได้ยาวนานกว่า 4 ชั่วโมง[6]



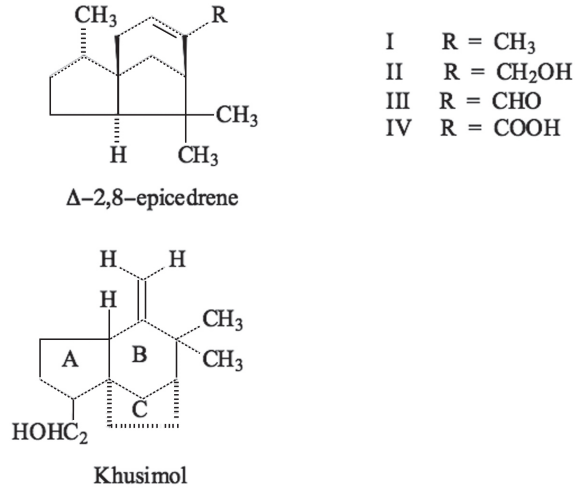
รูปที่ 1 *สูตรโครงสร้างของ Zizanal และ epizizanal*[6]
Figure 1 *Structure of Zizanal and epizizanal*[6]

นอกจากนั้นยังพบ Acoradiene (รูปที่ 2) และ Hexylene glycol, (-)-α-Funebrene, Δ-2, 8-epicedrene compound[7] รวมทั้ง khusimol (รูปที่ 3) ซึ่งเป็นสารประกอบเทอปีนอยด์ (Terpenoid compound) ในน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากหญ้าแฝก โดยมีการศึกษาพบว่า khusimol มีฤทธิ์กระตุ้นให้หลอดเลือดและกล้ามเนื้อหดตัว[8] รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidant property)[9,10] นอกจากนั้นยังมีการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ มินต์ และหญ้าแฝกมีฤทธิ์ต้านไวรัส โดยตะไคร้มีฤทธิ์ดีที่สุดและน้ำมันมินต์มีฤทธิ์อ่อนที่สุด[8] ส่วนฤทธิ์ต้านจุลชีพนั้น Kindra และ Satayanaraya พบว่า citrus oil, janiperus oil, sarsafias oil, cymbopogon oil, curcuma oil รวมทั้งน้ำมันจากหญ้าแฝกมีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้[11] สำหรับสายพันธุ์หญ้าแฝกในประเทศไทย เกษร นันทจิต และคณะพบว่ารากหญ้าแฝกสุราษฎร์ธานีมีสาร vetiverin (รูปที่ 4) ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Trichophyton mentagrophyte* ในห้องปฏิบัติการได้[12]

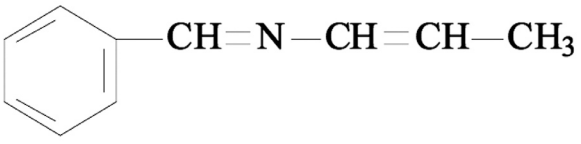
จากการศึกษาที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากหญ้าแฝกมีคุณสมบัติต่างๆ ทางการแพทย์ที่หลากหลาย โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านจุลชีพ แต่การศึกษาส่วนใหญ่เป็นการศึกษาเชื้อภายในห้องปฏิบัติการเท่านั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของรากหญ้าแฝกหลายชนิดที่พบในประเทศไทย โดยนำมาทดสอบกับจุลชีพที่แยกได้จากช่องปากของผู้ป่วยในคลินิกทันตกรรม ทั้งเชื้อก่อโรคฟันผุ โรคติดเชื้อในคลองรากฟัน โรคปริทันต์ เชื้อรา และเชื้ออื่นๆ รวมทั้งมีการหาสูตรโครงสร้างของสารสกัดบริสุทธิ์ของรากหญ้าแฝกด้วย ซึ่งผลการวิจัยที่ได้นี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำสารสกัดจากรากหญ้าแฝกไปประยุกต์ใช้ในทางทันตกรรมต่อไป



รูปที่ 2 *สูตรโครงสร้างของ Acoradiene*[5]
Figure 2 *Structure of Acoradiene*[5]



รูปที่ 3 *สูตรโครงสร้างของ Δ-2,8-epicedrene compound และ khusimol*[8]
Figure 3 *Structure of Δ-2,8-epicedrene compound and khusimol*[8]



รูปที่ 4 *สูตรโครงสร้างของ vetiverin*[12]
Figure 4 *Structure of vetiverin*[12]

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมพืชและสารสกัดหยาบ[12]

รวบรวมรากหญ้าแฝกที่พบในประเทศไทยจำนวน 4 ชนิด คือ ปางบง อินเดียใต้ ศรีลังกา และแม่เตี๊ยะ จากสำนักงานพัฒนาที่ดินที่สูง จังหวัดเชียงใหม่ มาทำการตรวจเอกลักษณ์ของรากและเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จากนั้นนำรากหญ้าแฝกทุกชนิดมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบดและผ่านเครื่องแร่งเบอร์ 60 เพื่อให้เป็นผง

จากนั้นนำผงหญ้าแฝก 90 กรัมมาหมักกับเมธานอล 7 ลิตรเป็นเวลา 1 วัน กรองและหมักต่ออีก 2 ครั้ง แต่ละครั้งใช้เมธานอล 2.5 ลิตร แล้วจึงระเหยน้ำยาที่กรองได้ภายใต้สูญญากาศ นำสารสกัดหยาบเมธานอลของหญ้าแฝกแต่ละสายพันธุ์มาสกัดต่อด้วยนอร์มัลเฮกเซน ครั้งละ 300 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง นำไประเหยให้แห้งภายใต้สูญญากาศ นำกากสารสกัดหยาบที่เหลือไปสกัดต่อด้วยคลอโรฟอร์มครั้งละ 300 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายคลอโรฟอร์มที่สกัดได้ไประเหยภายใต้สูญญากาศ นำกากที่เหลือมาสกัดต่อด้วยเมธานอลโดยทำเช่นเดียวกับนอร์มัลเฮกเซนและคลอโรฟอร์ม

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นของสารสกัดหยาบรากหญ้าแฝก[13,14]

นำสารสกัดหยาบเมธานอลของรากหญ้าแฝกทั้ง 4 ชนิด มาหาฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นเพื่อศึกษาว่าสารสกัดจากรากหญ้าแฝกสามารถยับยั้งเชื้อได้หรือไม่ ทำการทดสอบในแบคทีเรียทั่วไป 4 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Sarcina lutea* และ *Escherichia coli* รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราอีก 4 สายพันธุ์ คือ *Penicillium marneffei, Aspergillus fumigatus, Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* สายพันธุ์ละ 1 ตัวอย่างโดยใช้วิธี disc diffusion

ใช้ตัวอย่างสารสกัดหยาบเมธานอลละลายใน DMSO ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดร้อยละ 10 (W/V) หยดสารสกัด 20 ไมโครลิตรลงบนแผ่นกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรแล้ววางบนถาดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อความเข้มข้นเท่ากับ McFarland 0.5 กระจายอยู่ ใช้แผ่นกระดาษกรองที่มี DMSO เป็นตัวควบคุมผล ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง สำหรับการทดสอบกับแบคทีเรียให้นำถาดอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนการทดสอบกับเชื้อราให้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมงในสภาวะที่เหมาะสมกับเชื้อนั้นๆ จากนั้นนำถาดอาหารเลี้ยงเชื้อมาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งเชื้อด้วยเวอร์เนีย คาลิปเปอร์ (vernier calipers) มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพก่อโรคในช่องปากของสารสกัดหยาบรากหญ้าแฝก[13,14]

นำสารสกัดหยาบรากหญ้าแฝกทั้ง 4 ชนิดมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่แยกได้จากช่องปากของผู้ป่วยทางทันตกรรม แบคทีเรียที่นำมาศึกษาคือเชื้อก่อโรคฟันผุ ได้แก่ *Streptococcus mutans* และ *Lactobacillus acidophilus* เชื้อก่อโรคติดเชื้อในคลองรากฟัน ได้แก่ *Enterococcus faecalis* เชื้อก่อโรคปริทันต์ ได้แก่ *Actinomyces naeslundii, Porphyromonas gingi-valis, Prevotella intermedia* และ *Fusobacterium nucleatum* ส่วนเชื้อรา ได้แก่ *Candida albicans, Penicillium marneffei* และ *Aspergillus fumigatus* รวมมีเชื้อที่นำมาทดสอบทั้งสิ้น 10 สายพันธุ์ 23 ตัวอย่าง จากผู้ป่วย 23 คน (ตารางที่ 1) ทำการทดสอบด้วยวิธีการ disc diffusion เช่นเดียวกับข้อ 2 ทั้งนี้ตัวอย่างเชื้อที่แยกจากช่องปากผู้ป่วยกระทำภายใต้คำรับรองโครงการศึกษาและวิจัยในมนุษย์โดยคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิสวัสดิภาพและป้องกันภยันตรายของผู้ถูกวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ตารางที่ 1 *จุลชีพก่อโรคในช่องปากที่นำมาศึกษา*

Table 1 *Tested oral pathogens*

Oral pathogens	Number of isolates (N)
Streptococcus mutans	3
Lactobacillus acidophilus	2
Enterococcus faecalis	2
Actinomyces naeslundii	2
Porphyromonas gingivalis	2
Prevotella intermedia	2
Fusobacterium nucleatum	2
Candida albicans	4
Penicillium marneffei	2
Aspergillus fumigatus	2

4. การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดหยาบรากหญ้าแฝก[13,14]

นำสารสกัดหยาบรากหญ้าแฝกทั้ง 4 ชนิดมาหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรียหรือ MBC (Mini- mum bactericidal concentration) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อราหรือ MFC (Minimum fungicidal concentration) ด้วยวิธี broth dilution ทำการทดสอบในเชื้อทั่วไป ได้แก่ *S.lutea, S.aureus, E.coli* และ *C.albicans* สายพันธุ์ละ 1 ตัวอย่างและเชื้อที่แยกได้จากช่องปากของผู้ป่วยทางทันตกรรม 10 สายพันธุ์ (23 ตัวอย่าง) ดังตารางที่ 1

ความเข้มข้นแรกของสารสกัดหญ้าแฝกที่ใช้ศึกษาคือร้อยละ 20 (W/V) โดยละลายใน DMSO ซึ่งเทียบเท่ากับ 12,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารสกัดลงครั้งละ 2 เท่า (two-fold serial dilution technique) โดยใช้อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อชนิดที่จำเพาะต่อเชื้อนั้นๆ เป็นตัวทำละลายที่ใช้เจือจางในแต่ละหลอดทดลอง นำตัวอย่างแต่ละการเจือจางในหลอดทดลองมาเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งแล้วนำถาดอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มไว้ในอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมกับชนิดของเชื้อตามข้อ 2 โดยค่า MBC และ MFC จะเป็นค่าความเข้มข้นของหลอดทดลองที่ไม่มีเชื้อเจริญบนถาดอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว หากเชื้อสายพันธุ์ใดมีมากกว่า 1 ตัวอย่างจะนำค่าความเข้มข้นในการฆ่าเชื้อที่น้อยที่สุดของสายพันธุ์นั้นมาเป็นค่า MBC หรือ MFC

5. การทำสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มของรากหญ้าแฝกให้บริสุทธิ์[12]

จากผลการศึกษาข้อ 4 ทำการคัดเลือกรากหญ้าแฝกเพียงหนึ่งชนิดที่ให้ผลดีมาศึกษาโครงสร้างของสารสกัดเพื่อทดสอบหาแอลคาลอยด์ ซึ่งก็คือรากหญ้าแฝกศรีลังกา โดยนำสารสกัดมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยโครมาโตกราฟฟีคอลัมน์ ใช้ซิลิกาเจล 60 (Silica gel 60, 35-70 mesh) เป็นตัวดูดซับและแยกโดยใช้ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) ความเข้มข้นร้อยละ 2 ในเอธิลอะซีเตท เก็บน้ำยาที่แยกได้จำนวน 12 ครั้ง ครั้งละ 20 มิลลิลิตรมาดูที่รงคเลขผิวบางที่มีเพียงจุดเดียวเหมือนกันทั้ง 12 ส่วน นำน้ำยาแยกทั้ง 12 ส่วนไประเหยแห้งภายใต้สูญญากาศ แล้วนำกากที่ได้จากน้ำยาแยกรวม 12 ส่วนมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยรงคเลขผิวบางแบบหนา (preparative thin layer chro-matography; PTLC) โดยใช้ซิลิกาเจล 60 GF 254 เป็นตัวดูดซับ ให้แผ่นรงคเลขมีความหนาของตัวดูดซับ 1 มิลลิเมตร แยกโดยใช้น้ำยาไดคลอโรมีเทนความเข้มข้นร้อยละ 2 ในเอธิลอะซีเตท จากนั้นนำสารที่แยกได้จากแผ่นรงคเลขครั้งแรกไปแยกเป็นครั้งที่ 2 โดยใช้ตัวดูดซับเดิมและแยกโดยใช้ไดคลอโรมีเทนความเข้มข้นร้อยละ 2 ในเอธิลอะซีเตท นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทดสอบหาแอลคาลอยด์ด้วยสารละลายดราเกนดอร์ฟ (Dragen-dorff) และหาค่า Rf เพื่อนำไปหาสูตรโครงสร้างต่อไป

6. การหาสูตรโครงสร้างของสารสำคัญ[12,15-17]

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการศึกษาข้อ 5 มาหาสูตรโครงสร้างโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV spectrum (JASCO Co., UK) และ IR spectrum (FT/IR 5000, JASCO Co., UK) และวัด Nuclear magnetic resonance หรือ NMR spectrum (FT NMR 500 MHz., Bruker Co., USA) เพื่อศึกษาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ในหญ้าแฝกศรีลังกาโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของโปรตอนที่เกิดขึ้น และวัด Gas chromato-graphy-mass spectrophotometer หรือ GC-MS spectrum (Shimadzu Co., Japan) เพื่อหาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากหญ้าแฝกพันธุ์ศรีลังกา โดยเทียบ Spectra กับ Vetiverin ที่แยกได้จากรากสุราษฎร์ธานี

ผลการศึกษา

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเมธานอลของรากหญ้าแฝก 4 ชนิดที่ปลูกภายในประเทศต่อเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราอย่างละ 4 สายพันธุ์นั้น พบว่าสารสกัดหยาบเมธานอลจากรากปางบงมีฤทธิ์ต้านเชื้อทดสอบได้ดีที่สุด โดยยับยั้งแบคทีเรียได้มากที่สุดหรือมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งเชื้อมากกว่าหญ้าแฝกชนิดอื่น 2 ใน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *S.lutea* และ *E.coli* (ตัวเข้มในตารางที่ 2) เช่นเดียวกันกับการยับยั้งเชื้อรา สารสกัดรากปางบงมีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ดีที่สุด โดยยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด 3 ใน 4 ของสายพันธุ์ (ตัวเข้มในตารางที่ 3) นอกจากนี้ยังพบว่าไม่มีสารสกัดใดเลยที่สามารถยับยั้งเชื้อ *P.aeruginosa* และ *C.neoformans* ได้ (ตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ)

จากการทดสอบกับเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยทางทันตกรรมที่เป็นแบคทีเรียและเชื้อรารวม 10 สายพันธุ์ 23 ตัวอย่างจากผู้ป่วย 23 คนนั้น พบว่าสารสกัดรากปางบงสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปากได้ดีที่สุด โดยเป็นเชื้อก่อโรคฟันผุ *(L.acidophilus)* (ตัวเข้มในตารางที่ 4) เชื้อก่อโรคปริทันต์ *(A.naeslundii* และ *P.gingivalis)* (ตัวเข้มในตารางที่ 5) และเชื้อรา *(C.albicans* และ *P.marneffei)* (ตัวเข้มในตารางที่ 6) รวม 5 ใน 10 สายพันธุ์ รองลงมาคือรากศรีลังกาสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อในคลองรากฟัน *(E.faecalis)* และเชื้อก่อโรคปริทันต์ *(P.intermedia* และ *F.nucleatum)* ได้ดีที่สุด (ตัวเข้มในตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ) รวม 3 ใน 10 สายพันธุ์ ทั้งนี้ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งเชื้อที่มากที่สุดมีความแตกต่างจากค่าเฉลี่ยที่น้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ ในเชื้อทุกสายพันธุ์ยกเว้น *E.faecalis* ที่มีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งเชื้อใกล้เคียงกัน

ในการหาค่า MBC และ MFC ของสารสกัดหยาบรากหญ้าแฝกทั้ง 4 ชนิดต่อเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงและเชื้อที่เก็บตัวอย่างจากผู้ป่วย พบว่าสารสกัดรากหญ้าแฝกศรีลังกามีค่า MBC ต่ำที่สุดในการฆ่าเชื้อมากถึง 12 ใน 14 สายพันธุ์ที่ทดสอบ รองลงมาคือแม่เต๊ียะ (11 ใน 14 สายพันธุ์

ตารางที่ 2 *ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเมทานอลของรากหญ้าแฝก*

Table 2 Average inhibition zone in primary screening test against bacteria of methanol crude extract of V.zizanoides roots

Extract	Average inhibition zone mm (SD)*			
	P.aeruginosa	*S.aureus*	*S.lutea*	*E. coli*
Pangbong	NZ	7.00 (0.50)	**10.00 (0.50)**	**9.00 (0.50)**
South India	NZ	**8.00 (0.50)**	8.33 (1.04)	8.50 (0.50)
Srilangkhaa	NZ	6.42 (0.14)	8.17 (0.76)	6.33 (0.29)
Maetia	NZ	7.42 (0.14)	8.00 (0.50)	7.67 (0.29)

NZ = no inhibition zone
* = have some effects from DMSO

ตารางที่ 3 *ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งเชื้อราเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเมทานอลของรากหญ้าแฝก*

Table 3 *Average inhibition zone in primary screening test against fungi of methanol crude extract of V.zizanoides roots*

Extract	Average inhibition zone mm (SD)*			
	P.marneffei	*A. fumigatus*	*C. albicans*	*C. neoformans*
Pangbong	**14.33 (0.29)**	**11.67 (0.29)**	**11.00 (0.50)**	NZ
South India	12.00 (0.50)	NZ	8.83 (0.76)	NZ
Srilangkhaa	9.50 (0.50)	**11.67 (0.29)**	9.33 (1.53)	NZ
Maetia	NZ	7.42 (0.14)	8.00 (0.50)	NZ

NZ = no inhibition zone
* = have some effects from DMSO

ตารางที่ 4 *ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคฟันผุและโรคติดเชื้อในคลองรากฟันของสารสกัดหยาบเมทานอลของรากหญ้าแฝก*

Table 4 *Average inhibition zone against cariogenic and endodontic pathogens of methanol crude extract of V.zizanoides roots*

Extract	Average inhibition zone mm (SD)**		
	Cariogenic pathogens		Endodontic pathogen
	S.mutans	*L.acidophilus*	*E.faecalis*
Pangbong	8.97 (0.62)	**8.96 (0.51)***	8.00 (0.71)
South India	8.86 (0.52)	8.33 (0.75)	7.76 (0.68)
Srilangkhaa	7.69 (0.61)	7.76 (0.61)	**8.25 (0.69)**
Maetia	**9.33 (0.87)***	7.91 (0.58)	7.83 (0.52)

* P < 0.05
** = have some effects from DMSO

ตารางที่ 5 *ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ของสารสกัดหยาบเมทานอลของรากหญ้าแฝก*

Table 5 *Average inhibition zone against periodontal pathogens of methanol crude extract of V.zizanoides roots*

Extract	Average inhibition zone mm (SD)**			
	A.naeslundii	*P.gingivalis*	*P.intermedia*	*F.nucleatum*
Pangbong	**10.38 (0.77)***	**13.13 (1.51)***	9.50 (0.71)	11.54 (0.56)
South India	7.75 (0.52)	11.92 (1.20)	8.33 (0.61)	11.29 (0.78)
Srilangkhaa	8.58 (0.58)	11.25 (0.69)	**9.79 (0.98)***	**12.21 (0.46)***
Maetia	8.67 (0.61)	11.75 (0.76)	9.00 (0.45)	11.79 (0.68)

* P < 0.05
** = have some effects from DMSO

ตารางที่ 6 *ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งเชื้อราในช่องปากของสารสกัดหยาบเมทานอลของรากหญ้าแฝก*

Table 6 *Average inhibition zone against oral fungi of methanol crude extract of V.zizanoides roots*

Extract	Average inhibition zone mm (SD)**		
	C. albicans	*P. marneffei*	*A. fumigatus*
Pangbong	**12.25 (1.92)***	**13.75 (0.94)***	10.63 (.67)
South India	11.60 (1.77)	12.21 (1.14)	**11.79 (0.56)***
Srilangkhaa	10.58 (1.65)	10.50 (0.95)	9.88 (1.02)
Maetia	10.75 (1.86)	11.42 (1.91)	10.46 (0.06)

* P < 0.05
** = have some effects from DMSO

ตารางที่ 7 *ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดหยาบเมทานอลของรากหญ้าแฝก*

Table 7 MBC and MFC of crude extract of V.zizanoides roots

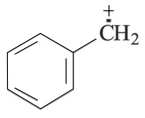
Extract	MBC or MFC (microgram/ml)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Pangbong	781.25	781.25	6,250	12,500	**1,562.50**	3,125	1,562.50	1,562.50	3,125	6,250	6,250	6,250	12,500	12,500
South India	**390.63**	**390.63**	**3,125**	**6,250**	**1,562.50**	3,125	**781.25**	**781.25**	1,562.50	3,125	3,125	3,125	6,250	**6,250**
Srilangkhaa	**390.63**	**390.63**	**3,125**	**6,250**	**1,562.50**	**1,562.50**	**781.25**	**781.25**	**781.25**	1,562.50	**1,562.50**	**1,562.50**	6,250	**6,250**
Mactia	**390.63**	**390.63**	**3,125**	12,500	**1,562.50**	3,125	**781.25**	**781.25**	**781.25**	**781.25**	**1,562.50**	**1,562.50**	**3,125**	12,500

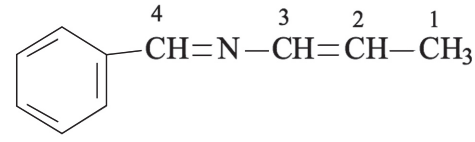
1=*S.lutea* 2=*S.aureus* 3=*E.coli* 4=*C.albicans*
5=*S.mutans* 6=*A.acidophilus* 7=*E.faecalis* 8=*A.naeslundii*
9=*P.gingivalis* 10=*Plintermedia* 11=*F.nucleatum* 12=P.*marmeffei*
13=*A.fumigatus* 14=*C.albicans*
** = have some effects from DMSO

ที่ทดสอบ) และอินเดียใต้ (8 ใน 14 สายพันธุ์ที่ทดสอบ) (ตัวเข้มในตารางที่ 7) จึงคัดเลือกรากหญ้าแฝกศรีลังกาที่มีค่า MBC และ MFC น้อยที่สุดและยับยั้งเชื้อได้พอควรมาศึกษาเพื่อหาโครงสร้างของสารสำคัญต่อไป

จากการศึกษาเพื่อหาโครงสร้างของสารสำคัญที่แยกได้จากสารสกัดรากหญ้าแฝกศรีลังกา พบว่าเป็นแอลคาลอยด์ ซึ่งใกล้เคียงกับ vetiverin ที่แยกได้จากหญ้าแฝกสุราษฎร์ธานีในการศึกษาที่ผ่านมา[12] และเมื่อศึกษาคุณสมบัติทางสเปคโตรโฟโตเมตรี พบว่าสำหรับ UV spectrum นั้น แอลคาลอยด์ในเมธานอลจะมี UV Peak 2 แห่ง คือที่ 235 และ 280 นาโนเมตร เนื่องจากสารที่แยกได้มีปริมาณน้อยจึงไม่สามารถหาค่า absorptivity ต่อได้

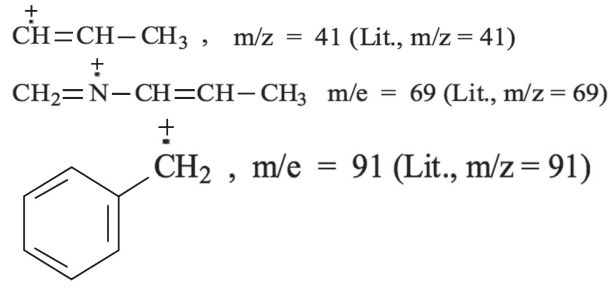
ส่วนการหาค่า IR spectrum พบว่ามี NH-stretching of imine ที่ ν = 3450 cm^{-1} (Lit, ν = 3450 cm^{-1}) CH-stretching of alkyl group ที่ ν = 2950 cm^{-1} (Lit, ν 2950 cm^{-1}) และ C=C stretching of $R_1CH=CHR_2$ ที่ ν = 1650 cm^{-1} (Lit, ν = 1650 cm^{-1})

ในขณะที่การหา ^{1}H NMR spectra มีค่า aromatic proton, δ = 7.1 ppm (Lit, δ = 7.3 ppm) ซึ่งยืนยันกับ fragment ion  ที่ได้จาก Mc Lafferty rearrangement, 1H ของ imino group coupled กับ aromatic protons และ proton ใน allylic group, δ = 3.80 ppm, m, J = 14.74 Hz. (Lit, δ = 3.85 ppm) 3H ของ methyl group coupled กับ 1H ของ olefinic



รูปที่ 5 *สูตรโครงสร้างของแอลคาลอยด์เหมือน vetiverin ที่แยกได้จากรากสุราษฎร์ธานี*

Figure 5 *Structure of isolated vetiverin-liked alkaloid from Surat Thani root*



รูปที่ 6 *Fragment ion สามชนิดของแอลคาลอยด์เหมือน vetiverin ที่แยกได้จากรากสุราษฎร์ธานี*

Figure 5 *Three fragment ions of isolated vetiverin-liked alkaloid from Surat Thani root*

group ซึ่งเป็นส่วนผสมของ Trans และ Cis-isomer, position 1 และ 2, δ = 1.1 ppm, d, J = 6.29 Hz (Lit δ = 1.25 ppm), δ = 4.4 ppm, qd, J = 16.48 Hz (Lit, δ = 4.6 ppm) position 2 และ 3, δ = 4.4 ppm, qd, J = 16.48 Hz, δ = 4.6 ppm, m, J = 14 Hz (Lit, δ = 4.6 ppm `และ δ = 4.8 ppm)

ส่วนหาค่า 13C NMR พบว่า carbon ของ methyl

group (position 1) อยู่ที่ δ = 29.0 ppm (Lit, δ = 29.2 ppm) carbon ของ imino group (position 4) อยู่ที่ δ = 156 ppm (Lit, δ = 158 ppm) carbon ของ phenyl ring อยู่ที่ δ = 104 ppm (Lit, δ = 106 ppm) carbon ของ olefinic 2 ตัวอยู่ที่ δ = 122 และ 124 ppm (Lit, δ = 124 และ 126 ppm) (รูปที่ 5) และการหาค่า GC-MS spectra พบว่าแอลคาลอยด์ที่ได้มี fragment ion สามชนิดดังรูปที่ 6

วิจารณ์ผล

จากการศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านแบคทีเรียและเชื้อราทั่วไปของสารสกัดรากหญ้าแฝกทั้ง 4 ชนิดพบว่ารากปางบงให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อเบื้องต้น คือมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและราสูงที่สุด 5 ใน 8 สายพันธุ์ที่ศึกษา ซึ่งสอดคล้องไปกับการทดสอบในเชื้อก่อโรคในช่องปากที่แยกได้จากผู้ป่วยทางทันตกรรมที่รากปางบงสามารถยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด 5 ใน 10 สายพันธุ์ รองลงมาคือรากศรีลังกาที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด 3 ใน 10 สายพันธุ์ ในขณะที่รากอินเดียใต้และแม่เตี๊ยะสามารถยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดเพียงอย่างละ 1 สายพันธุ์เท่านั้น โดยเชื้อที่คัดแยกจากผู้ป่วยมาศึกษานั้นเป็นเชื้อที่มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคชนิดต่างๆ ในช่องปาก เช่น เชื้อ *S.mutans* และ *L.acidophilus* มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคฟันผุ[18,19] ส่วนเชื้อ *E.faecalis* เป็นเชื้อที่พบได้บ่อยในการติดเชื้อของคลองรากฟัน[20] ในขณะที่เชื้อ *A.naeslundii, P.gingivalis, P.intermedia* และ *F.nucleatum* เป็นเชื้อที่พบได้บ่อยเมื่อมีการติดเชื้อของอวัยวะปริทันต์[21] และเชื้อ *C.albicans* เป็นเชื้อราที่พบได้บ่อยในช่องปากของมนุษย์[22] รวมทั้งเชื้อรา *P.marneffei*[23,24] และ *A.fumigatus*[25,26] ที่สามารถแยกได้จากช่องปากของผู้ป่วย AIDS เช่นกัน

แต่เมื่อหาค่า MBC และ MFC กลับพบว่าสารสกัดหยาบรากหญ้าแฝกศรีลังกาให้ผลดีที่สุด (ฆ่าเชื้อได้ 12 ใน 14 สายพันธุ์ในความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด) โดยมีค่า MBC ตั้งแต่ 390.63 ถึง 6,250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MFC ตั้งแต่ 781.25 ถึง 6,250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งดีกว่ารากปางบงที่แม้จะให้ผลดีกว่าในการทดสอบเบื้องต้นแต่มีค่า MBC และ MFC ต่ำสุดในการฆ่าเชื้อเพียง 1 ใน 14 สายพันธุ์ จึงทำการคัดเลือกรากศรีลังกามาทดสอบเพื่อหาโครงสร้างของสารสำคัญต่อไป ทั้งนี้ผลการศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งเชื้อที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าสารสกัดจากรากหญ้าแฝกสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราได้[12] โดยเกษร นันทจิต และคณะ พบว่ารากหญ้าแฝกสุราษฎร์ธานี อินโดนีเซียและปางบงมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophyte* รวมทั้งแบคทีเรียบางชนิด เช่น *S.aureus* และ *E.coli* ในห้องปฏิบัติการ[12] ทั้งนี้เชื้อที่นำมาทดสอบในการศึกษาต่างๆ ที่ผ่านมามีความแตกต่างกับการศึกษานี้ เพราะในการศึกษานี้มุ่งเน้นไปยังเชื้อก่อโรคในช่องปาก

เมื่อทำการศึกษาโครงสร้างของสารสำคัญที่แยกออกมา พบว่าสอดคล้องไปกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่ารากหญ้าแฝกศรีลังกามีโครงสร้างของแอลคาลอยด์ที่แยกได้เป็น vetiverin เหมือนกับที่แยกจากรากหญ้าแฝกสุราษฎร์ธานี[12] โดยเปรียบเทียบข้อมูลที่วัดได้จาก spectra ต่างๆ กับ spectra ของการศึกษาของเกษร นันทจิต และคณะ (2010) พบว่ามีลักษณะของ fragment ion สามชนิดเช่นเดียวกัน รายละเอียดเป็นไปตามผลการศึกษาที่ผ่านมา[12]

สรุป

สารสกัดรากหญ้าแฝกสามารถยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคในช่องปากได้ โดยรากปางบงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด รองลงมาคือรากศรีลังกา แต่เมื่อดูค่า MBC และ MFC ซึ่งมีผลจากตัวทำละลาย DMSO ที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียและราได้บ้าง สารสกัดหยาบจากรากศรีลังกาเป็นทางเลือกที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาประยุกต์ใช้ในคลินิก เนื่องจากการใช้สารสกัดที่มีระดับความเข้มข้นในการฆ่าเชื้อที่ต่ำกว่าย่อมส่งผลดีต่อตัวผู้ป่วยรวมทั้งต้นทุนของผลิตภัณฑ์ นอกจากนั้นการศึกษานี้ยังพบว่าสารสำคัญในรากศรีลังกาเป็น vetiverin ดังนั้นจึงอาจนำสารสกัดรากหญ้าแฝกไปพัฒนาเป็นเภสัชภัณฑ์สำหรับประยุกต์ใช้ยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปากในคลินิกต่อไปได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาต่อไปโดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างจุลชีพจากช่องปากของผู้ป่วยให้มากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการศึกษา สำนักงานพัฒนาที่ดินที่สูง จังหวัดเชียงใหม่ที่ให้การสนับสนุนด้านวัตถุดิบ และอาสาสมัครทุกท่านในการเก็บตัวอย่างเชื้อในช่องปาก รวมทั้งอาจารย์ ดร.ศิริวุฒิ สุขขี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการปฏิบัติงานด้านจุลชีววิทยา

เอกสารอ้างอิง

1. Putiyanan S, Nantachit K, Kittipongpatana N. *Chrysopogon zizanoides* (L.) Roberty (Graminneae) Part I: Pharmacognostic identification of roots. *CMU J* 2006; 5: 179-198.
2. Mishra VK, Ranade DH, Gupta RK, Solanta CM. Hydrological behavior and rooting patterns of some grass species in vertisol. *J Indian Soc Sci* 1995; 43: 545-549.
3. Das P, Datta R, Makris KC, Sarkar D. Vetiver grass is capable of removing TNT from soil in the presence of urea. *Environ Pollut* 2010; 158: 1980-1983.
4. Lomonte C, Doronila A, Gregory D, Baker AJ, Kolev SD. Chelate-assisted phytoextraction of mercury in biosolids. *Sci Total Environ* 2011; 409: 2685-2692.
5. Zalkow LH, Clover MG Jr. The absolute configuration of a vetiver acoradiene. The conversion of carotol to acoradiene. *Tetrahedron Lett* 1975; 16:17-26.
6. Nuchuchua O, Sakulku U, Uawongyart N, Puttipipatkhachorn S, Soottitantawat A, Ruktanonchai U. In vitro characterization and mosquito *(Aedes aegypti)* repellent activity of essential-oils-loaded nanoemulsions. *AAPS Pharm Sci Tech* 2009; 10: 1234-1242.
7. Paknikra SK, Bhatwadekan SV, Chakravarti KK. Biogenetically significant components of vetiver oil: Occurrence of (-)-α-funebrene and related compounds. *Tetrahedron Lett* 1975; 16: 2973-2976.
8. Rao RC, Serradeil-Le Gal C, Granger I, Gleye J, Augereau JM, Bessibes C. Khusimol, a non-peptide ligand for vasopressin V1a receptors. *J Nat Prod* 1994; 57:1329-1335.
9. Kim HJ, Chen F, Wang X, Chung HY, Jin Z. Evaluation of antioxidant activity of vetiver (Vetiveria zizanioides L.) oil and identification of its antioxidant constituents. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 7691-7695.
10. Luqman S, Kumar R, Kaushik S, Srivastava S, Darokar MP, Khanuja SP. Antioxidant potential of the root of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash. *Indian J Biochem Biophys* 2009; 46: 122-125.
11. Kindra KJ, Satayanaraya T. Inhibitory activity of essential oil of some plants against pathogenic bacteria. *Indian Drugs* 1978; 16:15-17.
12. Nantachit K, Bunchoo M, Khantava B, Khamvan C. Antimicrobial activity of alkaloid from roots of *Vetiveria zizanoides* (L.) Nash ex Small. *Thai Pharm Health Science J* 2010; 99-102.
13. Washington JA. *Laboratory procedure in clinical microbiology*. New York. Springer-Verlag; 1985, p.286, 457.
14. Lenette EH. *Manual of clinical microbiology*. 3rd ed. Washington D.C. American Society for Microbiology; 1988, p.649-651.
15. Reutrakul V, Kusumran K, Viriyachitra P, Nimgirawat S, Suksumran A. *Application of spectroscopic techniques in organic chemistry*. Bangkok. Num Uksorn Publishing; 1983; p.154-277.
16. Gunda IG, Joydeep K, Ping H, Ana ML, Lyn L. 2-Aza-1,3-dienes as novel precursors for the synthesis of N-unsubstituted β-Lactam. A

three step synthesis of 4-acetoxy-3-phenoxy-2-azetidinone. *Tetrahedron Lett* 1988; 29: 2409-2412.

17. Wender PA and Schaus JM. Imine Prototropy: Synthetic consequences in the generation of Metalloenamines. *J Org Chem* 1978; 43: 782-784.
18. Smith SI, Aweh AJ, Coker AO, Savage KO, Abosede DA, Oyedeji KS. Lactobacilli in human dental caries and saliva. *Microbios* 2001; 105: 77-85.
19. Bowen WH, Koo H. Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res* 2011; 45: 69-86.
20. Pirani C, Bertacci A, Cavrini F, Foschi F, Acquaviva GL, Prati C, Sambri V. Recovery of Enterococcus faecalis in root canal lumen of patients with primary and secondary endodontic lesions. *New Microbiol* 2008; 31: 235-240.
21. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 722-732.
22. Kim J, Sudbery P. Candida albicans, a major human fungal pathogen. *J Microbiol* 2011; 49: 171-177.
23. Nittayananta W. Penicilliosis marneffei: another AIDS defining illness in Southeast Asia. *Oral Dis* 1999; 5: 286-293.
24. Chakrabarti A. Microbiology of systemic fungal infections. *J Postgrad Med* 2005; 51 Suppl 1: S16-S20.
25. Kamma JJ, Nakou M, Baehni PC. Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. *J Periodontal Res* 1999; 34: 25-33.
26. Darwazeh AM, Al-Dosari A, Al-bagieh NH. Oral Candida and nasal Aspergillus flora in a group of Saudi healthy dentate subjects. *Int Dent J* 2002; 52: 273-277.