บทวิทยาการ
Original Article

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากชะเอมเทศต่อเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์และผลด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์

Antibacterial Activity of Licorice Extract on *Streptococcus mutans* and Cytotoxic Effect on Human Gingival Fibroblast Cells

กษมาภรณ์ รักอยู่[1], จงรัก นาคสีสุก[1], อิศราภรณ์ ภมรสุพรวิชิต[1], สุทธิมาส หยวกยง[2], อนุพันธ์ สิทธิโชคชัยวุฒิ[3], รุ่งอรุณ เกรียงไกร[4]
[1]นิสิตทันตแพทย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร [2]หน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
[3]ภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร [4]ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
Kasamaporn Rakyoo[1], Jongrak Naksisuk[1], Aitsaraporn Pamornsupornwichit[1], Suttimak Yuakyong[2], Anuphan Sittichokechaiwut[3], Rungarun Kriangkrai[4]
[1]Dental Student, Faculty of Dentistry, Naresuan University
[2]Dental Science Center, Faculty of Dentistry, Naresuan University
[3]Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Naresuan University
[4]Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, Naresuan University

ชม.ทันตสาร 2556; 34(2) : 107-116
CM Dent J 2013; 34(2) : 107-116

บทคัดย่อ

เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดชะเอมเทศต่อเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ซึ่งก่อโรคฟันผุ และศึกษาผลด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์ ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านต่อเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ของสารสกัดชะเอมเทศ พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมีค่าเท่ากับ 781 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อมีค่าเท่ากับ 3,125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดชะเอมเทศออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้อย่างรวดเร็วภายใน 30 นาที และฆ่าเชื้อได้เกือบทั้งหมด

Abstract

The purpose of this study were to examine the antibacterial activity of licorice extract against *Streptococcus mutans*, bacteria associated dental caries development, and examine the cytotoxic effect of licorice extract on human gingival fibroblast cells. The results of licorice extract against *Streptococcus mutans* showed the MIC and MBC of licorice extract were 781 and 3,125 µg/ml, respectively. The licorice extract strongly decreased a viable count of bacteria in

Corresponding Author:

รุ่งอรุณ เกรียงไกร
อาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร., ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

Rungarun Kriangkrai
D.D.S., Ph.D., Department of Oral Biology,
Faculty of Dentistry, Naresuan University,
Phisanulok 65000, Thailand.
E-mail: puirung2001@yahoo.com

ภายในเวลา 90 นาที สารสกัดชะเอมเทศแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเข้มข้น 3,125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 781 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดชะเอมเทศไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ การศึกษาแสดงให้เห็นว่าระดับความเข้มข้นของสารสกัดชะเอมเทศที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ และมีความปลอดภัยต่อเนื้อเยื่อในช่องปาก ได้แก่ ระดับความเข้มข้น 781 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ผลด้านความเป็นพิษเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์ สารสกัดชะเอมเทศ เชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์

30 minutes and further decreased to an almost undetectable level in 90 minutes. The cytotoxic effect of licorice extract on human gingival fibroblast cells was significantly found when cells treated by 3,125 µg/ml, while no significant cytotoxicity of licorice extract was found when cells were treated by 781 µg/ml. The results suggested the concentration of licorice extract against *Streptococcus mutans* and would be safe for oral tissue is 781 µg/ml.

Keywords: Antibacterial effect, Cytotoxic effect, Human gingival fibroblast cells, Licorice extract, *Streptococcus mutans*

บทนำ

ชะเอมเทศ (Licorice หรือ Liquorice) จัดเป็นพืชในวงศ์ (family) Fabaceae สกุล (genus) Glycyrrhiza มีสายพันธุ์ (species) ที่รู้จักประมาณ 14 สายพันธุ์ เช่น สายพันธุ์ Glabra, Glandulifera, Echinata, Lepidota, Uralensis (Fischer), Pallidiflora, Eurycarpa และ Inflata[1] โดยสายพันธุ์ที่นิยมนำมาใช้เป็นยา หรือ สารให้ความหวานได้แก่ สายพันธุ์ *Glycyrrhiza uralensis* พบได้ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศจีนและประเทศรัสเซีย[2] จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่าสารสำคัญส่วนใหญ่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและนำมาใช้ในการรักษาโรคในช่องปากนั้นได้มาจากรากของชะเอมเทศ[3] เช่น ฤทธิ์ในการรักษาโรคปริทันต์ (periodontitis) ได้แก่ กลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoids) เช่น ลิโคไรซีดิน (Licoricidin) และ ลิโคไอโซฟลาแวน เอ (Licorisoflavan A)[4] ฤทธิ์ต้านต่อการเกิดโรคฟันผุ ได้แก่ กลุ่มเทอโรคาพีน (Pterocarpenes) เช่น ไกลเซอไรซอล เอ (Glycyrrhizol A)[5] กลุ่มซาโปนิน (Saponins) เช่น ไกลเซอไรซิน (Glycyrrhizin)[6,7] และกลุ่มสติลบีน (Stilbenes) เช่น แกนเคานิน จี (Gancaonin G)[8] ผลการศึกษาสารสกัดชะเอมเทศในการออกฤทธิ์ต้านต่อการเจริญของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) ที่ก่อโรคฟันผุ[9] พบว่าสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 15.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและสารบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ถึง 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากรากชะเอมเทศสายพันธุ์ *Glycyrrhiza uralensis* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ที่[5,8] ในอีกทางหนึ่ง มีรายงานการศึกษาผลของสารสกัดหยาบชะเอมเทศสายพันธุ์ *Glycyrrhiza uralensis* ในด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ของเนื้อเยื่อร่วมด้วย เช่น การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากชะเอมเทศในการต้านต่อเชื้อเอนเทอร์โรไวรัส 71 (Enterovirus 71) ซึ่งเป็นสาเหตุการเกิดโรคเยื่อหุ้มสมอง-สมองอักเสบ (meningo-encephalitis) พบว่าสารสกัดชะเอมเทศสามารถยับยั้งการติดเชื้อเอนเทอร์โรไวรัส 71 และแสดงผลด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ระดับความเข้มข้น 300 ถึง 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร[10] และการศึกษาของ Jayaprakasam และคณะในปี ค.ศ. 2009[11] พบว่าสารสกัดบริสุทธิ์จากชะเอมเทศสายพันธุ์ *Glycyrrhiza uralensis* ได้แก่ เจ็ดสี่ไพรม์ไดไฮดรอกซี่ฟลาโวน (7,4′-dihydroxyflavone) และไอโซลิควิริทิเจนิน (Isoliquiritigenin) สามารถยับยั้งการผลิตอีโอทาซินวัน (Eotaxin-1) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งในการรักษาโรคหอบหืด (asthma) แต่สารสำคัญดังกล่าวแสดง

ผลด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยเช่นกันที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากรากชะเอมเทศสายพันธุ์ *Glycyrrhiza uralensis* ที่ต้านต่อการเจริญของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ อย่างไรก็ตามผลด้านความเป็นพิษของสารสกัดชะเอมเทศโดยเฉพาะสารสกัดชะเอมเทศที่มีแหล่งผลิตในประเทศไทยต่อเซลล์ของเนื้อเยื่อในช่องปากนั้นยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน กลุ่มวิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากรากชะเอมเทศสายพันธุ์ *Glycyrrhiza uralensis* จากแหล่งผลิตในประเทศไทยในการต้านต่อการเจริญของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส-มิวแทนส์ และศึกษาผลด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือกของมนุษย์ร่วมด้วย เพื่อทราบถึงการออกฤทธิ์ของสารสกัดชะเอมเทศต่อการเจริญของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ และเพื่อการนำประโยชน์การออกฤทธิ์ของสารสกัดชะเอมเทศมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้านต่อการเกิดโรคฟันผุได้อย่างปลอดภัยต่อเนื้อเยื่อในช่องปากต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดชะเอมเทศต่อเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดชะเอมเทศในการยับยั้งการเจริญ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ A32-2 ทำการศึกษาโดยวิธี broth dilution คือ สารสกัดหยาบจากรากชะเอมเทศจากบริษัท Thai-China Flavour & Fragrances Industry Co., CAS No. 94349-91-4 และลดระดับความเข้มข้นในการทดลองลงครั้งละ 2 เท่าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Brain heart infusion broth, Becton®, Dickinson, France) ที่มีความหนาแน่นของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์เริ่มต้น 5 x 10^6 ถึง 7 x 10^6 โคโรนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) ทำการเพาะเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมบวก คือ คลอร์เฮกซิดีน กลูโคเนต (chlorhexidine gluconate) และกลุ่มควบคุมการเจริญแสดงการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากสารทดสอบ ทุกกลุ่มศึกษาจะถูกทดสอบด้วยสภาวะเดียวกัน ค่า MIC ได้จากระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อที่สำรวจด้วยตาเปล่าและมีค่าการดูดกลืนแสงน้อยกว่า 0.05 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (nm)

ทำการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) โดยแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจากหลอดทดลองในระดับ MIC มาทำการ spread ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Brain heart infusion agar, Becton®, Dickinson, France) และทำการเพาะเชื้อต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่า MBC ของการศึกษา คือ ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดชะเอมเทศที่ลดจำนวนเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ได้ร้อยละ 99.9 ผลการศึกษาระดับ MIC และ MBC ได้มาจากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง

การศึกษาระยะเวลาในการฆ่าเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ของสารสกัดชะเอมเทศโดยเทคนิค Time-kill assay

ศึกษาการฆ่าเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ของสารสกัดชะเอมเทศที่ระดับความเข้มข้น 1 เท่า 2 เท่า และ 4 เท่า ของค่า MBC เป็นเวลา 30 60 90 นาที ความหนาแน่นของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์เริ่มต้นที่ 10^5 โคโรนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Brain heart infusion broth, Becton®, Dickinson, France) จากนั้นแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวมาทำการสเปรดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ทำการนับจำนวนเชื้อที่เจริญหลังทำการเพาะเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมแสดงการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากสารสกัดชะเอมเทศ ผลการศึกษาแสดง Time-kill curve ของความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อที่เจริญได้เป็นโคโรนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) และระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ ผลการศึกษาได้มาจากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์

การศึกษานี้ได้ผ่านการรับรองจาก คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร รหัส

โครงการ 55 02 01 0003 ทำการเก็บเนื้อเยื่อเหงือกจากผู้ป่วยสุขภาพดีอายุ 18-25 ปี และเข้ารับการผ่าตัดฟันคุดโดยทันตแพทย์ที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จากนั้นนำเนื้อเยื่อเหงือกมาล้างด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่ปราศจากเชื้อและนำมาตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร วางในจานเลี้ยงเซลล์และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM , Gibco® BRL, New York, USA) ประกอบด้วยซีรัมร้อยละ 10 (10% Fetal calf serum, Gibco® BRL) เพนิซิลลิน/สเตรปโตมัยซินซิลเฟต และแอมโฟเทอริซินบีร้อยละ 1 (1% Penicillin/Streptomycin sulfate and Amphotericin B; Gibco® BRL) และถูกเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เซลล์จะเคลื่อนออกจากชิ้นเนื้อและเจริญจนเต็มจานเลี้ยงเซลล์ประมาณ 2 สัปดาห์ จากนั้นถ่ายเซลล์ลงจานเลี้ยงเซลล์ใหม่และเริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 การศึกษานี้ใช้เซลล์รุ่นที่ 3 ถึง 8

การสร้างกราฟมาตรฐานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์

ทำการหว่านเซลล์ที่ทราบจำนวนลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมเป็น จำนวน 5000, 10,000, 20,000, 40,000, 60,000, 80,000 และ 100,000 เซลล์ต่อหลุม แล้วนำเข้าตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวัดจำนวนเซลล์โดยใช้เทคนิค MTT assay นำผลมาหาความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์กับค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R2) เข้าใกล้ 1

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดชะเอมเทศต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์ โดยเทคนิค MTT assay

การวัดผลโดยเทคนิค MTT assay[12] นำเซลล์เพาะเลี้ยงถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม จำนวน 50,000 เซลล์ต่อหลุมในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติที่ไม่มีฟีนอลเรด (Phenol red) และเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติที่ไม่มีซีรัมและนำเข้าตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ต่อมาเซลล์ถูกทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากรากชะเอมเทศจากบริษัท Thai-China Flavour & Fragrances Industry Co., CAS No. 94349-91-4 โดยละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติที่ไม่มีซีรัมระดับความเข้มข้น 390, 781, 1,562, 3,125 และ 6,250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมเป็นการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเดียวกับกลุ่มทดลองแต่ปราศจากสารสกัดชะเอมเทศ จากนั้นใส่ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) (MTT) (USB®, Claveland, OH, USA) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรบ่มในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีสุดท้ายของการทดสอบ ผลึกของฟอร์มาซาน (Formazan) ที่เซลล์สร้างขึ้นจากสารละลาย MTT จะถูกละลายในแต่ละหลุมของจานเลี้ยง โดยใช้ Dimethyl sulfoxide (DMSO, Labscan Asian®, Samutsakorn, Thailand) แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีเดอร์ (xMark™ Microplate reader, BIO-RAD®, Hercules, USA) ที่ความยาวคลื่นแสง 570 ร่วมกับ 630 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเทียบค่าจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่กับเส้นกราฟมาตรฐาน ผลการศึกษาแสดงเป็นร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่าเท่ากับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ในแต่ละกลุ่มทดลองต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ในกลุ่มควบคุมคูณด้วย 100 ผลการศึกษานี้ได้จากการทดลองซ้ำกัน 3 ครั้ง จากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผู้ป่วยจำนวน 2 ราย

การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษา Time-kill assay แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตราฐาน (means± standard errors) ของจำนวนเชื้อในระยะเวลาต่างๆ วิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อของกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยอาศัยสถิติความแปรปรวนแบบปัจจัยเดียว (One-way ANOVA) และ Post Hoc Tests (Tukey HSD)

ผลด้านความเป็นพิษต่อเซลล์แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตราฐาน (means±standard errors) ของร้อยละของความมีชีวิตของเซลล์ วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละของความมีชีวิตของเซลล์ในแต่ละกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยอาศัยสถิติความแปรปรวนแบบปัจจัยเดียว (One-way ANOVA) และ Post Hoc Tests (Tukey HSD) การวิเคราะห์ใช้โปรแกรม SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) นัยสำคัญทางสถิติของการวิเคราะห์แสดงผลที่ $P< 0.05$

ผลการศึกษา

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดชะเอมเทศต่อเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์

สารสกัดชะเอมเทศมีฤทธิ์ต้านต่อเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ โดยความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ (MBC) มีค่าเท่ากับ 781 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3,125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การออกฤทธิ์ของสารสกัดชะเอมเทศมีค่าต่ำกว่าผลของกลุ่มควบคุมบวกคลอร์เฮกซิดีนที่มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.078 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 1)

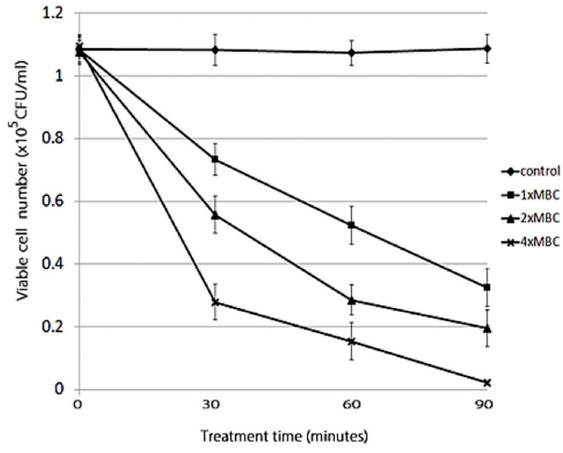
การศึกษาระยะเวลาในการฆ่าเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ของสารสกัดชะเอมเทศ โดยเทคนิค Time-kill assay

ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดชะเอมเทศสามารถฆ่าเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ได้อย่างรวดเร็วในเวลา 30 นาที ที่ระดับความเข้มข้น 1 เท่า 2 เท่า และ 4 เท่าของค่า MBC โดยทำให้ โคโรนีของเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและลดลงประมาณ 1.5 เท่า 2 เท่า 4 เท่า ตามลำดับ การลดลงของโคโรนีของเชื้อแปรผันไปตามปริมาณของสารสกัดชะเอมเทศที่เพิ่มมากขึ้นในแต่ละเวลาที่ทดสอบ และสารสกัดชะเอมเทศสามารถฆ่าเชื้อได้เกือบทั้งหมดที่ความเข้มข้น 4 เท่าของค่า MBC ภายใน 90 นาที (รูปที่ 1)

ตารางที่ 1 *แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญและการฆ่าเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ของสารสกัดชะเอมเทศเปรียบเทียบผลกับกลุ่มควบคุมบวกคลอร์เฮกซิดีน*

Table 1 *The MIC and MBC of licorice extract against S. mutans compared to those chlorhexidine used as positive control.*

Pathogen	Licorice Extract		Chlorhexidine	
	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
S. mutans A32-2	781	3,125	0.078	0.625



รูปที่ 1 *Time-killing curve แสดงจำนวนเชื้อที่คงอยู่เป็นโคโรนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังทดสอบด้วยสารสกัดชะเอมเทศระดับ 1 เท่า 2 เท่า และ 4 เท่าของความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ ในระยะเวลา 30 60 90 นาที ผลการศึกษาแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง*

Figure 1 *Time-killing curve was plotted as the number of remaining viable cells of S. mutans A32-2 (x 10^5 CFU/ml) treated with licorice extract at 1x, 2x and 4x MBC for 30 60 90 minutes. The results were presented as means ± standard errors of three independent experiments*

กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์

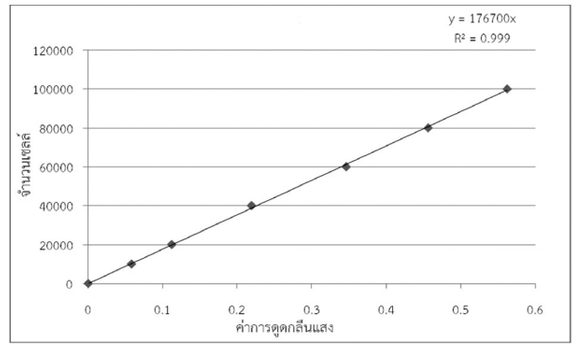
กราฟมาตรฐานโดยแนวแกน Y แสดงจำนวนเซลล์และแนวแกน X แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (Absorbance) พบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์จากผู้ป่วยรายที่ 1 คือ Y = 176700X และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R2) เท่ากับ 0.999 และความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์จากในผู้ป่วยรายที่ 2 คือ Y = 206100X และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R2) เท่ากับ 0.990 (รูปที่ 2 และ รูปที่ 4)

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดชะเอมเทศต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์ โดยเทคนิค MTT assay

ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดชะเอมเทศต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์จากผู้ป่วย 2 ราย พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 390 และ 781 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อร้อยละความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ของกลุ่มควบคุม โดยมีค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ในผู้ป่วยรายที่ 1 เท่ากับ 103.917 และ 98.118 ตามลำดับและในผู้ป่วยรายที่ 2 เท่ากับ 97.385 และ 104.650 ตามลำดับ ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงความเป็นพิษของสารสกัดชะเอมเทศต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 1,562, 3,125 และ 6,250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ในผู้ป่วยรายที่ 1 เท่ากับ 28.056, 20.376 และ 30.720 ตามลำดับและในผู้ป่วยรายที่ 2 เท่ากับ 47.674, 35.463 และ 63.952 ตามลำดับ (รูปที่ 3 และ 5)

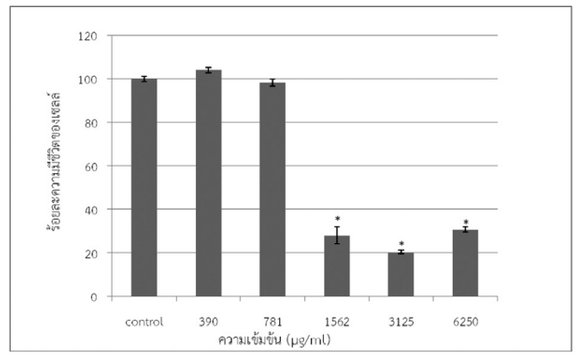
บทวิจารณ์

จากการศึกษาของกลุ่มวิจัยแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากรากชะเอมเทศสายพันธุ์ *Glycyrrhiza uralensis* มีฤทธิ์ในต้านต่อการเจริญของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส



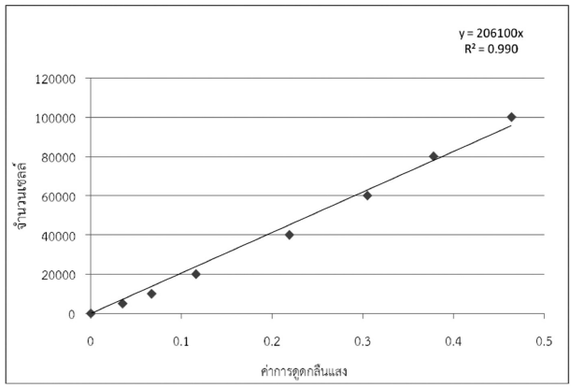
รูปที่ 2 *แสดงกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์ในผู้ป่วยรายที่ 1*

Figure 2 *Standard curve showed the relation between an absorbance and number of human gingival fibroblast cells of first patient.*



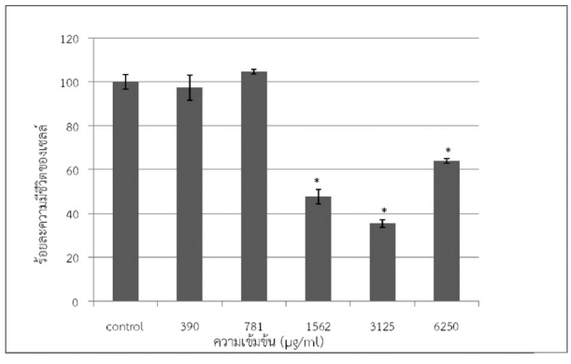
รูปที่ 3 *แสดงร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์จากผู้ป่วยรายที่ 1 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากชะเอมเทศที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (*) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ P< 0.05*

Figure 3 *% cell viability of human gingival fibroblast cells of first patient when treated with varied concentrations of licorice extract. (*) Statistical significance was defined as P< 0.05.*



รูปที่ 4 *แสดงกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์ในผู้ป่วยรายที่ 2*

Figure 4 *Standard curve showed the relation between an absorbance and number of human gingival fibroblast cells of second patient.*



รูปที่ 5 *แสดงร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์จากผู้ป่วยรายที่ 1 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากชะเอมเทศที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (*) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ P< 0.05*

Figure 5 *% cell viability of human gingival fibroblast cells of first patient when treated with varied concentrations of licorice extract. (*) Statistical significance was defined as P< 0.05.*

มิวแทนส์ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ หรือค่า MIC เท่ากับ 781 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ หรือค่า MBC เท่ากับ 3,125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สารสกัดชะเอมเทศนี้ยังออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้อย่างรวดเร็วภายใน 30 นาทีที่ระดับค่า MBC ดังนั้นจากคุณสมบัติของสารสกัดชะเอมเทศที่กลุ่มวิจัยได้นำมาศึกษานี้ น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำสมุนไพรที่มีแหล่งผลิตในประเทศไทยซึ่งหาซื้อได้ง่ายและมีราคาถูกมาทำการศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้านต่อโรคฟันผุต่อไป ผลต้านต่อเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ของสารสกัดชะเอมเทศของการศึกษานี้สอดคล้องไปกับผลการศึกษาที่ผ่านมา จากการวิจัยของ Hu และคณะในปี ค.ศ.2011[5] ได้ทำการสกัดรากชะเอมเทศสายพันธุ์ *Glycyrrhiza uralensis* ได้เป็นสารสกัดหยาบซึ่งมีฤทธิ์ต้านต่อการเจริญของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ โดยมีค่า MIC อยู่ที่ 15.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีระดับต่ำกว่าค่า MIC ของสารสกัดหยาบที่ทางกลุ่มวิจัยได้นำมาศึกษา อย่างไรก็ตามความแตกต่างของระดับการออกฤทธิ์ของสารสกัดอาจเนื่องมาจากแหล่งที่มาของชะเอมเทศสายพันธุ์ *Glycyrrhiza uralensis* ที่มีความแตกต่างกันและวิธีการสกัดที่มีรายละเอียดแตกต่างกันออกไปในแต่ละการวิจัย อาจส่งผลให้องค์ประกอบของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านต่อเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ มีความแตกต่างกันได้ โดยสารสกัดจากรากชะเอมเทศที่กลุ่มวิจัยได้นำมาศึกษามีแหล่งที่มาจากประเทศจีนและสกัดโดยการใช้เอธานอล ในขณะที่สารสกัดในงานวิจัยของ Hu และคณะ[5] ได้ทดลองสกัดรากชะเอมเทศที่มาจากหลายแหล่งปลูกในประเทศจีนรวมกันและได้การสกัดด้วยวิธีการใหม่ โดยใช้เอธานอลที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค (food-grade ethanol) จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสำคัญในสารสกัดหยาบจากรากชะเอมเทศพบว่ามีปริมาณ ไกลเซอไรซอล เอ อยู่เป็นจำนวนมากและลดความเป็นพิษจากการสกัดได้โดยไม่พบสารที่เป็นพิษต่อร่างกาย เช่น ตะกั่ว สารหนู เป็นต้น[5]

จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ไกลเซอไรซอล เอ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็พโตคอค-

คัส มิวแทนส์ และมีค่า MIC อยู่ที่ 1 ถึง 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร[8] Hu และคณะ[5] ได้ทำการศึกษาต่อโดยนำสารสกัดหยาบจากรากชะเอมเทศปริมาณ 7 ถึง 15 มิลลิกรัม มาเป็นส่วนผสมในลูกอมที่ปราศจากน้ำตาล ปริมาณของสารสกัดหยาบที่ใช้ อ้างอิงจากระดับการออกฤทธิ์ต้านต่อเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ของไกลเซอไรซอล เอ ที่อยู่ในสารสกัดชะเอมเทศ การศึกษาพบว่าลูกอมดังกล่าวสามารถฆ่าเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ได้ จากนั้นทดลองให้อาสาสมัครได้อมลูกอมวันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 10 วัน พบว่าอาสาสมัครที่ได้รับอมลูกที่มีส่วนผสมของสารสกัดชะเอมเทศมีปริมาณเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ในน้ำลายลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การศึกษาของ Peter และคณะ ในปี ค.ศ. 2010[13] ได้ศึกษาในลักษณะเดียวกันและพบว่าลูกอมที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากรากชะเอมเทศปริมาณ 15 มิลลิกรัม สามารถลดปริมาณเชื้อสเตร็พโตคอคคัส-มิวแทนส์ในน้ำลายได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มเด็กที่มีความเสี่ยงสูงของการเกิดโรคฟันผุ อย่างไรก็ตาม การศึกษา Peter และคณะ ในปี ค.ศ. 2010[13] และ Hu และคณะในปี ค.ศ. 2011[5] ไม่ได้รายงานผลของสารสกัดชะเอมเทศที่นำมาเป็นส่วนผสมของลูกอมต่อเซลล์ของเนื้อเยื่อในช่องปาก เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำสารสกัดชะเอมเทศที่กลุ่มวิจัยได้ศึกษาไปใช้ได้อย่างปลอดภัยต่อเนื้อเยื่อในช่องปาก ทางกลุ่มวิจัยได้ศึกษาผลด้านความเป็นพิษของสารสกัดชะเอมเทศต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์ที่ระดับความเข้มข้น 390, 781, 1,562, 3125 และ 6,250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ครอบคลุมการออกฤทธิ์ของสารสกัดชะเอมเทศต่อการเจริญของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ในห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกจากผู้ป่วย 2 ราย ให้ผลที่สอดคล้องกันโดยพบว่าที่ระดับ MIC ได้แก่ ความเข้มข้น 781 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อร้อยละความมีชีวิตของเซล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงถึงระดับความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลลล์ ในขณะที่ระดับ MBC ได้แก่ ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 3,125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแสดงความเป็นพิษต่อเซลลล์ โดยมีผลลดร้อยละความมีชีวิตของเซลล์มากกว่าร้อยละ 50 การศึกษาของกลุ่มวิจัยสอดคล้องไปกับการศึกษาที่ผ่านมาที่แสดงถึงความเป็นพิษของสารสกัดชะเอมเทศต่อเซลล์ของเนื้อเยื่อ จากการศึกษาของ Kuo และคณะ ในปี ค.ศ. 2009[10] ได้ทดสอบสารสกัดหยาบชะเอมเทศสายพันธุ์ *Glycyrrhiza uralensis* ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหุ้มปลายอวัยวะเพศชาย (human foreskin fibroblast cells) เพื่อหวังผลในการยับยั้งการติดเชื้อเอนเทอร์โรไวรัส 71 ในการรักษาโรคเยื่อหุ้มสมอง-สมองอักเสบ พบว่าสารสกัดชะเอมเทศมีความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 10 ถึง 20 ที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 300 ถึง 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 30 ที่ระดับความเข้มข้น 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์สารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดหยาบชะเอมเทศในการศึกษานี้ได้แก่ ไกลเซอไรซิน และจากการศึกษาของ Jayaprakasam และคณะในปี ค.ศ. 2009[11] พบว่าสารสกัดบริสุทธิ์จากชะเอมเทศสายพันธุ์ *Glycyrrhiza uralensis* ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ ลิควิริทิน ลิควิริทิเจนิน เจ็ดสี่ไพรม์ไดไฮดรอกซี่ฟลาโวน ไอโซลิควิริทิเจนิน ไอโซออนโอนิน และไกลเซอไรซิน สามารถยับยั้งการผลิตอิโอทาซินโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่อยู่ภายในปอด ซึ่งเป็นการเข้าถึงการรักษาโรคหอบหืด การศึกษาได้แสดงผลในแง่ของการยับยั้งการผลิตอีโอทาซินจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์และร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ พบว่าลิควิริทินสามารถยับยั้งการผลิตอีโอทาซินวัน ได้ประมาณร้อยละ 50 ไอโซออนโอนินและไกลเซอไรซินมีผลในการยับยั้งการผลิตอีโอทาซินวันได้ประมาณร้อยละ 20 ลิควิริทิเจนินสามารถยับยั้งการผลิตอีโอทาซินได้อย่างสมบูรณ์และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่ไอโซลิควิริทิเจนินและเจ็ดสี่ไพรม์ไดไฮดรอกซี่ฟลาโวน สามารถยับยั้งการผลิตอีโอทาซินวันได้อย่างสมบูรณ์ แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าสารสกัดชะเอมเทศของการศึกษานี้มีสารสกัดบริสุทธิ์หลายตัวที่ออกฤทธิ์ในการรักษาโรคหอบหืดโดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ในอีกทางหนึ่งสารสกัดบริสุทธิ์บางตัวได้แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ของเนื้อเยื่อร่วมด้วย

รากของชะเอมเทศมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านต่อการเกิดโรคฟันผุอยู่หลายชนิด ในแต่ละชนิดมีการออกฤทธิ์ที่เหมือนหรือแตกต่างกันไป ตัวอย่างเช่น ไกลเซอไรซอล เอ ไกลเซอไรซอล บี และแกนเคานินจี มีฤทธิ์ต้านต่อเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ โดยมีค่า MIC ที่ 1, 32 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร[5,8] ไกลเซอไรซินมีรสหวานโดยให้ความหวาน 50 เท่าเมื่อเทียบกับน้ำตาลซูโครส มีฤทธิ์ยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรีย (Anti-adherent property) แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย[6,14] กรดไกลเซอไรซิก เป็นรูปแบบหนึ่งของไกลเซอไรซินที่ปราศจากน้ำตาลมีผลลดการทำลายผิวเคลือบฟัน โดยจะไปมีผลยับยั้งการผลิตกรดที่เกิดจากแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ (dental plaque)[15] อย่างไรก็ตามสารสำคัญบางชนิดอาจส่งผลเสียต่อร่างกายและเซลล์ของเนื้อเยื่อได้ เช่น ไกลเซอไรซิน ซึ่งพบมากในสารสกัดหยาบจากรากชะเอมเทศ สายพันธุ์ *Glycyrrhiza uralensis*[16] เมื่อได้รับไกลเซอไรซินโดยการรับประทานจะเปลี่ยนเป็นกรดไกลเซอเรทิก (glycyrrhetic acid) โดยแบคทีเรียในลำไส้ ซึ่งอาจก่อให้เกิด ความดันโลหิตสูง ระดับโปรแทสเซียมในเลือดต่ำ (hypokalemia) เป็นต้น[17] จากงานวิจัยของ Kuo และคณะ ในปี ค.ศ. 2009[10] ที่กล่าวมาข้างต้น ไกลเซอไรซินซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดหยาบชะเอมเทศแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ นอกจากนี้ไกลเซอไรซิน ยังเป็นสารหลักที่สกัดได้จากรากชะเอมเทศที่ทางกลุ่มวิจัยได้นำมาศึกษา และผลการศึกษาแสดงความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์ ดังนั้นแนวทางการศึกษาเพื่อพัฒนาสารสกัดชะเอมเทศดังกล่าวให้มีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยในการนำไปใช้ต้านต่อโรคฟันผุต่อไปนั้นอาจจะมีการคัดแยกสารสำคัญบางตัวที่อาจเป็นพิษต่อเซลล์ของเนื้อเยื่อนั้นๆ ออกจากสารสกัดหยาบ เช่น ไกลเซอไรซิน เป็นต้น โดยการศึกษามุ่งหวังประสิทธิภาพการต้านต่อโรคฟันผุจากสารสำคัญที่คงเหลืออยู่ร่วมกัน และไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ของเนื้อเยื่อในช่องปาก

บทสรุป

สารสกัดหยาบจากรากชะเอมเทศสายพันธุ์ *Glycyrrhiza uralensis* ที่กลุ่มวิจัยนำมาศึกษามีฤทธิ์ต้านต่อเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 781 และ 3,125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดชะเอมเทศแสดงความเป็นพิษของต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 1,562 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 781 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเหงือกของมนุษย์ ผลการศึกษาเป็นข้อมูลพื้นฐานแสดงระดับความเข้มข้นในการนำสารสกัดชะเอมเทศดังกล่าว ไปใช้ในการออกฤทธิ์ต้านต่อการเจริญของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ และมีความปลอดภัยต่อเนื้อเยื่อในช่องปาก ได้แก่ ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 781 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ให้การสนับสนุนทุนวิจัยและเครื่องมือวิจัย รศ.ดร.เนติ วระนุช ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ให้ความอนุเคราะห์สารสกัดหยาบชะเอมเทศ และนางสาวนิรัชชา ไชยสมบูรณ์ นักวิทยาศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความช่วยเหลืองานวิจัยจนสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

1. Bouras P, Skouroliakou M, Tsonas S. Licorice: a traditional herb and its modern effect on human. *EHP* 2001; 7: 135-149.
2. Shibata S. A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice. *Yakugaku Zasshi* 2000; 120: 849-862.
3. Messier C, Epifano F, Genovese S, Grenier D. Licorice and its potential beneficial effects in common oro-dental diseases. *Oral Dis* 2012; 18: 32-39.

4. La VD, Tanabe S, Bergeron C, Gafner S, Grenier D. Modulation of matrix metalloproteinase and cytokine production by licorice isolates licoricidin and licorisoflavan A: potential therapeutic approach for periodontitis. *J Periodontol* 2011; 82: 122-128.
5. Hu CH, He J, Eckert R, Wu XY, Li LN, Tian Y, et al. Development and evaluation of a safe and effective sugar-free herbal lollipop that kills cavity-causing bacteria. *Int J Oral Sci* 2011; 3: 13-20.
6. Sela MN, Steinberg D, Segal R. Inhibition of the activity of glucosyltransferase from Strepto-coccus mutans by glycyrrhizin. *Oral Microbiol Immunol* 1987; 2: 125-128.
7. Steinberg D, Sgan-Cohen HD, Stabholz A, Pizanty S, Segal R, Sela MN. The anticariogenic activity of glycyrrhizin: preliminary clinical trials. *Isr J Dent Sci* 1989; 2: 153-157.
8. He J, Chen L, Heber D, Shi W, Lu QY. Antibacterial compounds from Glycyrrhiza uralensis. *J Nat Prod* 2006; 69: 121-124.
9. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res* 2008; 42: 409-418.
10. Kuo KK, Chang JS, Wang KC, Chiang LC. Water extract of Glycyrrhiza uralensis inhibited enterovirus 71 in a human foreskin fibroblast cell line. *Am J Chin Med* 2009; 37: 383-394.
11. Jayaprakasam B, Doddaga S, Wang R, Holmes D, Goldfarb J, Li XM. Licorice flavonoids inhibit eotaxin-1 secretion by human fetal lung fibroblasts in vitro. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 820-825.
12. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
13. Peters MC, Tallman JA, Braun TM, Jacobson JJ. Clinical reduction of S. mutans in preschool children using a novel liquorice root extract lollipop: a pilot study. *Eur Arch Paediatr Dent* 2010; 11: 274-278.
14. Segal R, Pisanty S, Wormser R, Azaz E, Sela MN. Anticariogenic activity of licorice and glycyrrhizine I: Inhibition of in vitro plaque formation by Streptococcus mutans. *J Pharm Sci* 1985; 74: 79-81.
15. Edgar WM. Reduction in enamel dissolution by liquorice and glycyrrhizinic acid. *J Dent Res* 1978; 57: 59-64.
16. Asl MN, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. *Phytother Res* 2008; 22: 709-724.
17. Wen D, Liu Y, Li W, Liu H. Separation methods for antibacterial and antirheumatism agents in plant medicines. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 812: 101-117.