ฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากย่านางต่อเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์

พิมพ์บุษร์ พรหมศรี[1*] ชุติมา ไตรรัตน์วรกุล[2] พนิดา ธัญญศรีสังข์[3]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากรากย่านางต่อเชื้อรา *Candida albicans* ซึ่งพบได้บ่อยในเด็ก โดยเฉพาะในวัยทารก และเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิด oral candidiasis หรือ oral thrush อีกด้วย สารสกัดที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราในการศึกษานี้ได้จากการสกัด 2 วิธี คือ การสกัดด้วยน้ำโดยนำผงรากย่านางต้มในน้ำเดือด ซึ่งใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวทำละลาย โดยความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่เตรียมได้ คือ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และการสกัดด้วยเอทานอลโดยแช่ผงรากย่านางในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 3 วัน ใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 (20% ethanol) และไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 (10% dimethyl sulfoxide, 10% DMSO) โดยความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่เตรียมได้ เท่ากับ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นจึงนำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยวิธี agar well diffusion และหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดในการทำลายเชื้อรา (minimum fungicidal concentration, MFC) ด้วยวิธี broth microdilution โดยการทดสอบทั้งหมดจะทำซ้ำ 3 ครั้ง จากการทดลองพบว่า สารสกัดด้วยน้ำของรากย่านางไม่พบโซนยับยั้ง และไม่พบฤทธิ์ทำลายเชื้อ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมได้ สำหรับสารสกัดด้วยเอทานอลที่ละลายด้วย 20% ethanol และ 10% DMSO เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion ไม่พบโซนยับยั้ง แต่พบว่าสามารถทำลายเชื้อ *C. albicans* ได้เมื่อทดสอบด้วยวิธี broth microdilution โดยมีค่า MFC เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากันทั้งคู่ จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดด้วยน้ำของรากย่านางไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *C. albicans* ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลที่ละลายด้วย 20% ethanol และ 10% DMSO มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *C. albicans* ได้ดีเท่ากัน

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ย่านาง การสกัดด้วยน้ำ การสกัดด้วยเอทานอล แคนดิดา อัลบิแคนส์

[1] นิสิตปริญญาโท สาขาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

[2] ศ.พิเศษ, สาขาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

[3] ผศ.ดร., ภาควิชาจุลชีววิทยา หน่วยปฏิบัติการวิจัยจุลชีววิทยาช่องปาก และวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

* Corresponding author: Tel.: 089-1951635. E-mail address: pimbuch214@hotmail.co.th

บทนำ

เชื้อราแคนดิดา (*Candida*) เป็นเชื้อราที่สามารถพบได้ทั่วไปตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย รวมถึงในช่องปากโดยไม่ก่อให้เกิดโรคในผู้ที่มีสุขภาพดี แต่จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาสในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ โดยเฉพาะในเด็กทารกที่ระบบภูมิคุ้มกันยังทำงานไม่สมบูรณ์ หากไม่ได้รับการดูแลสุขภาพช่องปากที่ดี เช่น การดูดนมแล้วไม่ได้รับการทำความสะอาดช่องปาก อาจจะก่อให้เกิดโรคติดเชื้อราในช่องปากได้ (oral candidiasis) [1]

Oral candidiasis เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อรา *Candida* ส่วนใหญ่มักเกิดจากเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*Candida albicans*) โดย oral candidiasis แบ่งออกเป็นหลายรูปแบบ ขึ้นอยู่กับลักษณะที่พบทางคลินิก รูปแบบที่พบได้บ่อยในเด็ก คือ pseudomembranous candidiasis หรือเรียกว่า oral thrush อาการแสดงจะเห็นเป็นฝ้าขาว (white patches) คล้ายคราบนม บริเวณด้านบนของลิ้นและเยื่อเมือกด้านในกระพุ้งแก้ม หลังจากขูดฝ้าขาวอาจจะพบเนื้อเยื่อสีแดงและพบเลือดออกได้และในบางรายอาจจะพบอาการเจ็บปวดร่วมด้วย [2] เชื้อ *C. albicans* นอกจากเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อราในช่องปากแล้ว พบว่ายังเกี่ยวข้องกับฟันผุในเด็กอีกด้วย [3] ซึ่งจากการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเด็กที่มีฟันผุและไม่มีฟันผุ พบว่าในเด็กที่มีฟันผุจะพบเชื้อ *C. albicans* สูงกว่าเด็กที่ไม่มีฟันผุ [4] เนื่องจากเชื้อ *C. albicans* มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มและยังสามารถเกาะกลุ่มกับเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคฟันผุได้ [5]

สำหรับการป้องกัน และรักษาโรคติดเชื้อราในช่องปาก [6] สามารถทำได้หลายวิธีไม่ว่าจะเป็นวิธีทางกล ได้แก่ การเช็ดทำความสะอาดช่องปาก โดยเฉพาะบริเวณด้านบนของลิ้นหลังดื่มนม การทำความสะอาดขวดนม โดยเฉพาะบริเวณจุกขวดนม เป็นต้น นอกจากวิธีทางกลแล้วยังมีการใช้สารต้านจุลชีพ (antimicrobial agents) เพื่อลดเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค เช่น ยาต้านเชื้อรานิสเตติน (Nystatin) โคลไตรมาโซล (Clotrimazole) และฟลูโคนาโซล (Fluconazole) เป็นต้น ซึ่งให้ผลการรักษาอย่างมีประสิทธิภาพ [7-9] อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่ายาต้านเชื้อราจะให้ผลการรักษาอย่างมีประสิทธิภาพ แต่พบว่าเมื่อใช้ต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน อาจทำให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยาและส่งผลให้เกิดการติดเชื้อซ้ำได้ ดังนั้นการศึกษาค้นคว้า และพัฒนาสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพดีขึ้น และมีผลข้างเคียงลดลงจึงยังเป็นที่ต้องการ

ปัจจุบันการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของพืชสมุนไพรมีมากขึ้น โดยย่านางเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่ใช้เป็นอาหารและยามาตั้งแต่สมัยโบราณ จัดอยู่ในวงศ์ Menispermaceae และมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Tiliacora triandra (Colebr.) Diels* รากของย่านางเป็นหนึ่งในส่วนประกอบของตำรับยาเบญจโลกวิเชียร หรือยาห้าราก [10] สรรพคุณของย่านางมีฤทธิ์ในการลดไข้ แก้ปวด ช่วยฟื้นฟูความจำ และสมองที่สูญเสียจากการติดสุรา ต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง [11] และจากการทดสอบด้านความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง เมื่อฉีดสารสกัดด้วยน้ำของใบย่านางในหนูไม่พบความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) และความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง (subchronic toxicity) [12] นอกจากนี้การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านจุลชีพของย่านาง พบว่าส่วนต่าง ๆ ของย่านางสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายเชื้อจุลชีพก่อโรคได้หลายชนิด โดยสารสกัดด้วยน้ำของรากย่านางมีฤทธิ์ต้านเชื้อสแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) ซึ่งรวมถึง *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลิน (Methicillin-resistant *S. aureus*) [13] สารสกัดด้วยเมทานอลพบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม (*Plasmodium falciparum*) [14] และเชื้อวัณโรคไมโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลซิส (*Mycobacterium tuberculosis*) [15] และสารสกัดด้วยเอทานอลพบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพได้หลายชนิด ได้แก่ บาซิลลัส ซีเรียส (*Bacillus cereus*) เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) [16] จากคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโต หรือทำลายเชื้อจุลชีพเหล่านี้ จึงนำมาซึ่งแนวคิดที่จะนำสารสกัดจากรากย่านางด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำและสกัดด้วยเอทานอลมาศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *C. albicans* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้บ่อยในเด็ก และเป็นสาเหตุของการเกิด oral candidiasis

วิธีการวิจัย

1.การเตรียมสารสกัดรากย่านาง

ผงรากย่านางที่ใช้ในการวิจัยนี้ซื้อจากร้านสมุนไพรท่าพระจันทร์ กรุงเทพมหานคร ซึ่งได้รับการพิสูจน์จาก รศ. เภสัชกรหญิง ร.ต.อ. หญิง ดร. สุชาดา สุขหร่อง ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นจึงนำผงรากย่านางมาสกัด 2 วิธี ดังนี้

1.1<u>วิธีการสกัดด้วยน้ำ</u>

นำผงรากย่านางต้มในน้ำเดือด จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองมาตราฐานเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลาย สำหรับส่วนผงที่เหลือนำไปต้มในน้ำเดือดอีกครั้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำสารละลายที่ได้ในแต่ละครั้งมารวมกันแล้วนำไประเหยจนแห้ง สารสกัดที่ได้จะเก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิท และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการทดสอบต่อไป

1.2 <u>วิธีการสกัดด้วยเอทานอล</u>

นำผงรากย่านางมาแช่ในเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยแช่จนท่วม ปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน นำมากรองด้วยกระดาษกรองมาตราฐานเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลาย สำหรับส่วนผงที่เหลือนำมาแช่ต่อในเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 อีกครั้ง ทำซ้ำ 3

ครั้ง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ในแต่ละครั้งมารวมกัน และนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสารด้วยความดันต่ำ (rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส นำสารสกัดหยาบที่ได้มาใส่ไว้ในภาชนะที่ปิดสนิท และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการทดสอบต่อไป

โดยสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดด้วยน้ำจะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวทำละลาย และความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่เตรียมได้ คือ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดด้วยเอทานอล จะใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ 20% ethanol และ 10% DMSO โดยความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่เตรียมได้ เท่ากับ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2. **การเตรียมเชื้อรา**

C.albicans สายพันธุ์ ATCC 90028 ถูกนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อซาโบโรด์ เด็กซ์โทรสชนิดวุ้น (sabouraud dextrose agar, SDA) โดยอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการถ่ายโคโลนีเดี่ยว (single colony) มาเพาะต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อซาโบโรด์ เด็กซ์โทรสชนิดเหลว (sabouraud dextrose broth, SDB) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3. **การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารสกัดหยาบรากย่านาง**

3.1 <u>การทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion</u>

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นโดยนำ metal cup ที่ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มาวางบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยวาง 7 ตำแหน่งระยะห่างเท่าๆ กัน จากนั้นนำเชื้อที่เตรียมไว้แล้วสำหรับทดสอบ (โดยการเพาะไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อประมาณ 10^7 CFU/ml) 500 ไมโครลิตร ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นที่หลอมเหลวไว้แล้ว และอุ่นพอสัมผัสได้ (ประมาณ 50 องศาเซลเซียส) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ให้มีความหนาประมาณ 4 มิลลิเมตร รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว แล้วจึงดึง metal cup ออก เกิดเป็นหลุมสำหรับใส่สารที่ต้องการทดสอบ นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้นี้ไปทดสอบทันที

ใช้ปิเปตดูดสารที่ต้องการทดสอบชนิดละปริมาณ 100 ไมโครลิตร มาปล่อยในหลุมของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ตามที่กล่าวไว้ข้างต้น ซึ่งสารที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ สารสกัดด้วยน้ำรากย่านางความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดด้วยเอทานอลของรากย่านางความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ละลายใน 20% ethanol และสารสกัดด้วยเอทานอลของรากย่านางความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ละลายใน 10% DMSO โดยมีคลอเฮกซิดีน กลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (0.2% CHX) เป็นตัวควบคุมบวก ส่วน 20% ethanol , 10% DMSO และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ หลังจากนั้นจึงนำไปอบในตู้อบเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หากพบโซนยับยั้ง (zone of inhibition) ซึ่งมีลักษณะเป็นวงใสรอบหลุมของสารที่ทดสอบ แสดงว่าสารนั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ใช้ทดสอบ อ่านค่าความกว้างของโซนยับยั้งที่เกิดขึ้น โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งในหน่วยมิลลิเมตร ทำการทดลองนี้ 3 ซ้ำ

3.2 <u>การทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดหยาบรากย่านางในการทำลายเชื้อรา</u>

สามารถทำการทดสอบได้ด้วยวิธี broth microdilution โดยจะใช้เชื้อที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับความขุ่นให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 จากนั้นนำมาเพาะต่อจนกระทั่งถึงระยะ log (log phase) ซึ่งก่อนการทดลองนี้จะปรับเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับค่าความขุ่นมาตรฐาน 0.5 แม็คฟาแลนด์ (0.5 McFarland standard) หรือมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.08-0.12 (ปริมาณเชื้อประมาณ 10^5 CFU/ml)

หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB ลงในทุกหลุมของถาดพลาสติกเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96 well plate) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สารสกัดที่เตรียมไว้สำหรับทดสอบ 100 ไมโครลิตรในหลุมแรก ทำการเจือจางทีละ 2 เท่า (2- fold serial dilution) จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ลดลงไปตามลำดับ แล้วจึงดูดเชื้อ *C.albicans* ซึ่งเตรียมไว้สำหรับใช้ทดสอบ (0.5 แม็คฟาแลนด์) ใส่ลงไปในหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร ดังนั้นสารสกัดด้วยน้ำรากย่านางและสารสกัดด้วยเอทานอลของรากย่านางที่ละลายด้วย 10% DMSO จะมีความเข้มข้นสุดท้ายเริ่มตั้งแต่ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางลงไปที่ละ 2 เท่าจนถึง 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลของรากย่านางที่ละลายด้วย 20% ethanol จะมีความเข้มข้นสุดท้ายเริ่มตั้งแต่ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางลงไปที่ละ 2 เท่าจนถึง 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปอบในตู้อบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นของเชื้อ หากพบความขุ่นแสดงว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อรา หลุมที่ใสแสดงว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อรา จากนั้นดูดสารละลายทุกหลุมที่ใส หลุมละ 5 ไมโครลิตร มาหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นที่เตรียมไว้ แล้วนำไปอบในตู้อบเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดหยาบรากย่านางในการทำลายเชื้อราได้ (minimum fungicidal concentration, MFC) โดยเป็นความเข้มข้นของสารสกัดหลุมแรกที่ไม่มีโคโลนีของเชื้อขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้น ทำการทดลองนี้ 3 ซ้ำ

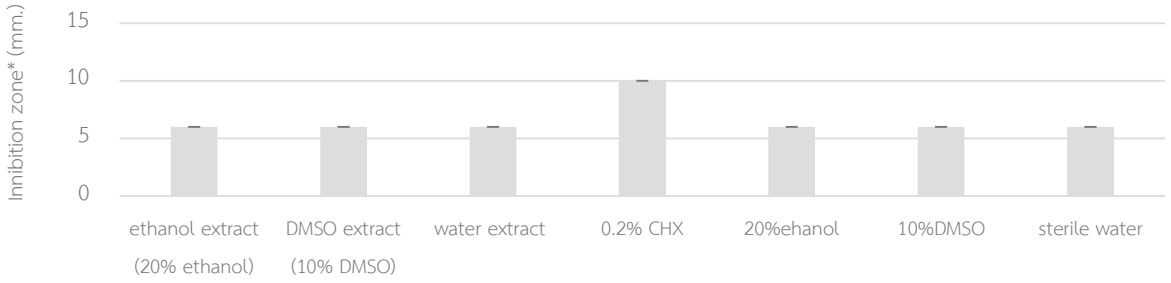
4. **การวิเคราะห์ข้อมูล**

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) โดยใช้ค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) จากการคำนวณข้อมูลที่ได้ในการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

การเตรียมสารสกัดรากย่านางโดยวิธีการสกัดด้วยน้ำและสกัดด้วยเอทานอล จะได้สารสกัดหยาบมีลักษณะเหนียวหนืดเป็นสีน้ำตาลเข้ม และคิดเป็นผลผลิตร้อยละ (% yield) 5.72 และ 2.1 % ตามลำดับ

โดยผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดรากย่านางต่อเชื้อ *C.albicans* สายพันธุ์ ATCC 90028 ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของรากย่านางที่ละลายด้วยน้ำ และสารสกัดด้วยเอทานอลของรากย่านางที่ละลายด้วย 20% ethanol และ 10% DMSO ไม่แสดงลักษณะของโซนยับยั้ง แต่รอบ ๆ หลุมของสารสกัดด้วยเอทานอลของรากย่านางที่ละลายด้วย 20% ethanol และ 10% DMSO พบลักษณะเป็นวงสีน้ำตาลขุ่น ในขณะที่ 0.2% CHX ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก แสดงลักษณะของโซนยับยั้ง โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง เท่ากับ 10.00±0.00 มิลลิเมตร (แสดงดังภาพที่ 1)



* รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมใส่สารทดสอบ เท่ากับ 6 mm.

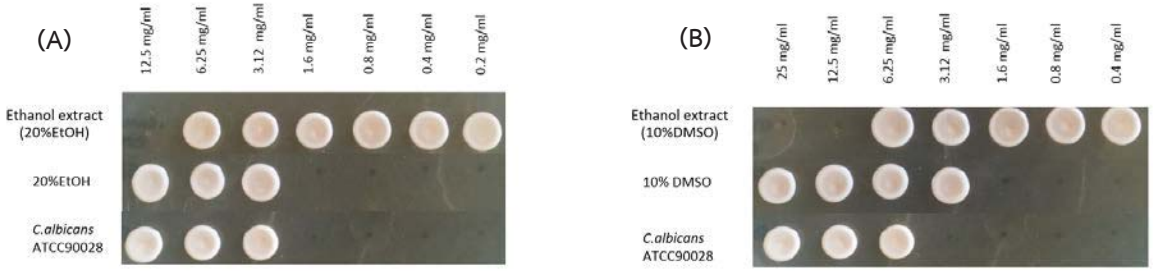
ภาพที่ 1 แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดรากย่านางต่อเชื้อ *C.albicans* โดยวิธี agar well diffusion

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยวิธี broth microdilution พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของรากย่านางมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์ ATCC90028 โดยสารสกัดด้วยเอทานอลของรากย่านางที่ละลายด้วย 20% ethanol และ 10% DMSO แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำลายเชื้อ *C. albicans* เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากัน (แสดงดังตารางที่1 และภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดรากย่านางในการทำลายเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี broth microdilution

	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการทำลายเชื้อรา (MFC)*	
เชื้อที่ใช้ทดสอบ	Ethanol extract (20% EtOH)	Ethanol extract (10%DMSO)
C.albicans ATCC 90028	12.5±0.0 mg/ml	11.5 ±0.0 mg/ml

*ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แสดงเป็นค่า mean±SD



ภาพที่ 2 แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดรากย่านางในการทำลายเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี broth microdilution โดยความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดด้วยเอทานอลของรากย่านางที่ละลายด้วย 20% ethanol ที่เตรียมได้ คือ 12.5 mg/ml (A) ในขณะที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดด้วยเอทานอลของรากย่านางที่ละลายด้วย 10% DMSO คือ 25 mg/ml (B)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามีเพียงสารสกัดด้วยเอทานอลของรากย่านางเท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *C. albicans* ขณะที่สารสกัดด้วยน้ำของรากย่านางไม่พบฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Nuaeissara และคณะ (2011) [13] ที่พบว่าสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลของรากย่านางมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* โดยแสดงลักษณะของโซนยับยั้งเท่ากับ 10.8±0.3 และ 15.7±1.2 มิลลิเมตรตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาใช้ทดสอบไม่เท่ากัน และวิธีการสกัดที่ต่างกัน รวมถึงสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบเป็นคนละสายพันธุ์กัน นอกจากนี้ยังพบว่าแหล่งเพาะปลูกของสมุนไพร ช่วงระยะเวลาของการเก็บเกี่ยว การเก็บรักษาสมุนไพรก่อนการสกัด รวมถึงตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสาร ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อองค์ประกอบของสารสกัด โดยจาก

การศึกษานี้พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ โดยมีความเป็นไปได้ที่สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายในตัวทำละลายเช่น เอทานอล เป็นต้น ซึ่งตัวทำละลายแต่ละชนิดมีความสามารถในการสกัดแยกสารได้ไม่เหมือนกัน

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดทั้ง 3 ตัวอย่างด้วยวิธี agar well diffusion ไม่พบโซนยับยั้ง แต่พบลักษณะเป็นวงสีน้ำตาลขุ่นรอบหลุมของสารสกัดด้วยเอทานอลที่ละลายด้วย 20% ethanol และ 10% DMSO จึงพิจารณาทำการทดสอบเพิ่มเติมด้วยวิธี broth microdilution โดยจากผลการทดลองพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของรากย่านางสามารถทำลายเชื้อ *C. albicans* ได้ โดยมีค่า MFC เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามการที่ผลการทดสอบของทั้ง 2 วิธีนี้ไม่ไปในทางเดียวกัน อาจเนื่องมาจาก agar well diffusion เป็นการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรเบื้องต้น อาศัยการแพร่ของสารสกัดลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นซึ่งมีเชื้อเจริญอยู่ หากสารที่ทดสอบนั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ จะเกิดโซนยับยั้งขึ้นโดยเห็นเป็นวงใสรอบหลุมทดสอบ ซึ่งวิธีการนี้ทำได้ง่าย และรวดเร็ว สามารถทดสอบกับสารต้านจุลชีพได้หลายชนิดพร้อม ๆ กัน [17] แต่อย่างไรก็ตามลักษณะของโซนยับยั้งอาจไม่ชัดเจน หรือแสดงขอบเขตที่ไม่แน่นอน ซึ่งผลที่ได้ก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของสารสกัดสมุนไพร ความสามารถในการละลายหรือซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อของสมุนไพร [18] อัตราการเจริญและปริมาณของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ เป็นต้น สำหรับวิธี broth microdilution เป็นการทดสอบเชิงปริมาณ สามารถทราบค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ทำลายเชื้อได้ โดยการเจือจางสารที่ทดสอบลดลงที่ละ 2 เท่า โดยวิธีนี้เชื้อจะสัมผัสกับสารที่ทดสอบโดยตรง วิธีนี้มีข้อจำกัด คือค่า MFC ที่ได้อาจจะไม่ใช่ค่าจริงเพราะเวลาทำการทดสอบมักจะใช้การเจือจางสารที่ต้องการทดสอบเป็นที่ละ 2 เท่าไปเรื่อย ๆ ค่าจริงของ MFC จึงอาจอยู่ระหว่างค่าที่อ่านได้และความเข้มข้นที่ต่ำถัดลงไป [17, 19] โดยการศึกษานี้จะมีปริมาณเชื้อและวิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 2 วิธีต่างกัน เนื่องจากวิธี agar well diffusion ต้องการเชื้อในปริมาณที่มากเพียงพอเพื่อให้เชื้อขึ้นเต็มพื้นที่ผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผลการทดสอบทั้ง 2 วิธีไม่ไปทางเดียวกัน

จากหลาย ๆ งานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดของย่านางมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นส่วนใบหรือราก [13-15, 20] ทวีผล และคณะ [20] ทำการศึกษาพบอัลคาลอยด์ในสารสกัดของรากย่านาง 2 ชนิด ได้แก่ อัลคาลอยด์ชนิดที่ละลายน้ำ และชนิดที่ไม่ละลายน้ำ เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย (*P. falciparum*) พบว่ามีเพียงอัลคาลอยด์ชนิดที่ไม่ละลายน้ำเท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย ซึ่งเป็นอัลคาลอยด์ในกลุ่ม bisbenzylisoquinolone ได้แก่ Tiliacorinine, Tiliacorine, Nor-Tiliacorinine A นอกจากฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพแล้วยังพบว่าย่านางมีฤทธิ์ในการลดไข้ ลดอนุมูลอิสระ และต้านมะเร็งอีกด้วย [11] จึงมีการนำย่านางมาใช้ในการแพทย์แผนไทยมากขึ้น

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดรากย่านางมากมาย แต่ยังไม่มีหลักฐาน หรือการศึกษาที่แสดงถึงกลไกของรากย่านางในการต้านเชื้อจุลชีพ รวมถึงการศึกษาด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อพัฒนารากย่านางมาใช้ประโยชน์ในการรักษาต่อไป

สรุปผลงานวิจัย

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของรากย่านางไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *C. albicans* ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลไม่แสดงลักษณะของโซนยับยั้งเมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion แต่พบลักษณะเป็นวงสีน้ำตาลขุ่นรอบหลุมทดสอบ จึงพิจารณาทำการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution เพิ่มเติม ซึ่งจากการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของรากย่านางมีฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ รศ. ร.ต.อ.หญิง ดร. สุชาดา สุขหร่อง อาจารย์ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาและในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ นางสาววรกร วิวัชรากรกุล เจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ นางสาววันเพ็ญ ชินเฮง และเจ้าหน้าที่ภาคจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่อำนวยความสะดวก ให้คำแนะนำและเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

[1.] Russell, C. and Lay, K.M. (1973). Natural history of *Candida* species and yeasts in the oral cavities of infants. **Archives of oral biology**. 18(8), 957-62.

[2.] Lynch, D.P. (1994). Oral candidiasis. History, classification, and clinical presentation. **Oral surgery, oral medicine, and oral pathology**. 78(2), 189-93.

[3.] de Carvalho, F.G., Silva, D.S., Hebling, J., Spolidorio, L.C. and Spolidorio, D.M. (2006). Presence of *mutans streptococci* and *Candida spp*. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. **Archives of oral biology**. 51(11), 1024-8.

[4.] Raja, M., Hannan, A. and Ali, K. (2010). Association of oral candidal carriage with dental caries in children. **Caries research**. 44(3), 272-6.

[5.] Barbieri, Dd.S.A.V., Vicente, V.A., Fraiz, F.C., Lavoranti, O.J., Svidzinski, T.I.E. and Pinheiro, R.L. (2007). Analysis of the in vitro adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology.** 38, 624-632.

[6.] NHS Choices. (2016). **Oral thrush in babies**. cited 2017 Mar 1, Available from http://www.nhs.uk/conditions/oral-thrush---babies/Pages/Introduction.aspx.

[7.] Barkvoll, P. and Attramadal, A. (1989). Effect of nystatin and chlorhexidine digluconate on *Candida albicans*. **Oral surgery, oral medicine, and oral pathology**. 67(3), 279-81.

[8.] American Academy of Pediatric Dentistry. (2016). **Useful Medications for Oral Conditions**. cited 2017 Mar 1, Available from: http://www.aapd.org/media/policies_guidelines/rs_commonmeds.pdf.

[9.] McDonald, R.E., Avery, D.R., Weddell, J.A. and John, V. (2011). **Dentistry for the Child and adolescent.** Missouri : Mosby elsevier.

[10.] มูลนิธิฟื้นฟูส่งเสริมการแพทย์แผนไทยเดิม อายุรเวทวิทยาลัย (ชีวกโกมารภัจจ์). (2535). **ตำราการแพทย์แผนไทยเดิม (แพทย์ศาสตร์สงเคราะห์)**. กรุงเทพฯ : สามเจริญพานิช.

[11.] Kaewpiboon, C., Winayanuwattikun, P., Yongvanich, T., Phuwapraisirisan, P. and Assavalapsakul, W. (2014). Effect of three fatty acids from the leaf extract of *Tiliacora triandra* on P-glycoprotein function in multidrug-resistant A549RT-eto cell line. **Pharmacognosy magazine**. 10(Suppl 3), 549-56.

[12.] Sireeratawong, S., Lertprasertsuke, N., Srisawat, U., Thuppia, A., Ngamjariyawat, A. and Suwanlikhid, N. (2008). Acute and subchronic toxicity study of the water extract from *Tiliacora triandra(Colebr.) Diels* in rat. **Songklanakarin jornal of science and technology**. 30(5), 611-19.

[13.] Nuaeissara, S., Kondo, S. and Itharat, A. (2011). Antimicrobial activity of the extracts from Benchalokawichian remedy and its components. **Journal of the Medical Association of Thailand**. 94 (Suppl 7), 172-7.

[14.] Pavanand, K., Webster, H.K., Yongvanitchit, K. and Dechatiwongse, T. (1989). Antimalarial activity of *Tiliacora triandra Diels* against *Plasmodium falciparum* in vitro. **Phytotherapy research**. 3(5), 215-7.

[15.] Sureram, S., Senadeera, S.P., Hongmanee, P., Mahidol, C., Ruchirawat, S. and Kittakoop, P. (2012). Antimycobacterial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Tiliacora triandra* against multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**. 22(8), 2902-5.

[16.] Naibaho, N.M., Laohankunjit, N., Kerdchoechuen, O. (2012). Volatile composition and antibacterial activity of essential oil from Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves. **Agricultural Sci J**. 43(2), 529-32.

[17.] รวี เถียรไพศาล. (2552). **แบคทีเรียและโรคติดเชื้อที่พบบ่อยในช่องปาก**. สงขลา : ไอคิว มีเดีย.

[18.] ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญบุตร และสาธร พรตระกูลพิพัฒน์. (2551). “การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ, ใน **“ ประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มข ครั้งที่ 9 สัตวแพทย์ทางเลือกวันนี้”**, 91. วันที่ 11-12 มิถุนายน 2551 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

[19.] อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์. (2551). **แบคทีเรียทางการแพทย์**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

[20.] Dechatiwongse, T., Chavalittumrong, P. and Nutakul, W. (1987). Isolation of the in vitro antimalarial principles from *Tiliacora triandra Diels*. **Bull DeptMed Sci**. 29(1), 33-8.