

การพัฒนาและการประเมินฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans*
ของน้ำยาบ้วนปากสูตรสารสกัดสมุนไพรตำรับจตุผลาธิกะ

Development and Evaluation of Antibacterial Activity against *Streptococcus mutans*
of Mouthwash with Jatu-Phala-Tiga Herbal Formulation Extract

นันทน์ภัส แก้วตาเสน¹ ปิยวดี คำสวัสดิ์² สายสุตา แสงกล้า¹ พรรณนิภา แจกแดงพะเนา³

รัชฎาวรรณ อรรถนิมิตต์¹ และ ปราณี ศรีราช^{1*}

Nunnapat Kaewtasan¹ Piyawadee Khamsawat² Saisuda Saengkla¹ Phannipha Chekdaengphanao³

Ratchawwan Aukkanimart¹ and Pranee Sriraj^{1*}

¹สาขาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร

สกลนคร 47160 ประเทศไทย

²โรงพยาบาลห้วยเกิ้ง อุดรธานี 41110 ประเทศไทย

³สาขาวิชาแพทย์แผนไทย คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยเฉลิมกาญจนา ศรีสะเกษ 33000 ประเทศไทย

¹Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Natural Resources, Rajamangala University
of Technology Isan Sakon Nakhon Campus, Sakon Nakhon 47160, Thailand

²Huaikoeng Hospital, Udon Thani 41110, Thailand

³Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Public Health, Chalermkarnchana University,
Sisaket 33000, Thailand

*E-mail: pranee.si@rmuti.ac.th

Received: Oct 04, 2025

Revised: Nov 30, 2025

Accepted: Dec 02, 2025

บทคัดย่อ

สมุนไพรตำรับจตุผลาธิกะ มีสรรพคุณ แก้ไข้ แก้ลม แก้โรคลา บำรุงธาตุ รุ่ถ่ายรูกัด ด้านเชื้อจุลินทรีย์ และด้านการอักเสบ แต่ยังไม่มีการศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ซึ่งเป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ฟันผุ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ของสารสกัดเอทานอลจตุผลาธิกะ และพัฒนาสารสกัดดังกล่าวไปเป็นน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับจตุผลาธิกะ ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดจตุผลาธิกะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 368.62 ± 5.15 มิลลิกรัม สมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดแห้ง และ 652.33 ± 6.8 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมของสารสกัดแห้ง ตามลำดับ ทั้งยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MBC) เท่ากับ 12.5 ± 0.00 และ 200 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* นอกจากนี้ น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับจตุผลาธิกะ สูตรที่ 3 (ซึ่งมีสารสกัดจตุผลาธิกะความเข้มข้นเท่ากับ 2MIC เป็นส่วนประกอบ) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดในทุกช่วงเวลาที่ทำการศึกษาทดสอบ

คำสำคัญ: จตุผลาธิกะ น้ำยาบ้วนปาก ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม สเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์

Abstract

The Jatu-Phala-Tiga herbal formulation has been traditionally used to relieve fever, relieve flatulence, treat eye diseases, restore the body's constitution, restore digestive balance, inhibit microorganisms and suppress inflammation. However, its inhibitory effect against the growth of *Streptococcus mutans*, the primary causative

agent of dental caries, has not yet been investigated. This study aimed to determine the total phenolic and flavonoid contents of the ethanolic extract of Jatu-Phala-Tiga, to evaluate its antibacterial activity against *S. mutans*, and to further develop the extract into Jatu-Phala-Tiga herbal mouthwash formulas. The results revealed that the Jatu-Phala-Tiga extract had total phenolic and flavonoid contents of 368.62 ± 5.15 mg gallic acid equivalent/g dry extract and 652.33 ± 6.8 mg quercetin equivalent/g dry extract, respectively. It also exhibited antibacterial activity against *S. mutans* with the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of 12.5 ± 0.00 and 200 ± 0.00 mg/mL, respectively and inhibited its biofilm formation. In addition, the Jatu-Phala-Tiga herbal mouthwash formula 3 (containing the extract with a concentration of 2MIC as an ingredient) displayed the highest antibacterial activity across all tested time intervals.

Keywords: Jatu-Phala-Tiga, Mouthwash, Antibacterial activity, Antibiofilm activity, *Streptococcus mutans*

1. บทนำ

โรคฟันผุจัดเป็นโรคติดเชื้ในช่องปากที่ส่งผลกระทบต่อประชากรทุกช่วงวัยทั่วโลก ทั้งในเด็ก วัยรุ่น ผู้ใหญ่ และผู้สูงอายุ [1] โดยสาเหตุหลักส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*; *S. mutans*) ซึ่งมีความสามารถในการยึดเกาะบนผิวฟัน และสามารถสังเคราะห์สาร exopolysaccharides ในปริมาณมากเพื่อสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ที่ก่อให้เกิดการผุกร่อนของฟัน และยังสามารถย่อยคาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) ให้เป็นกรดแลคติก (lactic acid) ซึ่งมีผลในการทำลายสารเคลือบฟันนำไปสู่การเกิดฟันผุในที่สุด [2], [3]

ในปัจจุบัน มีการใช้แนวทางต่าง ๆ ในการควบคุมคราบจุลินทรีย์ (plaque) เช่น การแปรงฟัน และการใช้น้ำยาบ้วนปาก รวมทั้งน้ำยาฆ่าเชื้อ เพื่อป้องกันฟันผุ [4] การใช้ผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากเป็นวิธีที่ง่ายต่อการนำสารป้องกันฟันผุเข้าสู่ช่องปาก อีกทั้งยังใช้งานได้สะดวก และมีต้นทุนต่ำ จึงสามารถนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งของกิจวัตรการดูแลสุขภาพช่องปากประจำวันได้อย่างมีประสิทธิภาพ [5]

น้ำยาบ้วนปากประกอบด้วยองค์ประกอบหลากหลายที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ระงับกลิ่นปาก และต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการควบคุมการสะสมของคราบจุลินทรีย์ รวมถึงช่วยในการป้องกันโรคเหงือก และฟันผุ [6] chlorhexidine เป็นน้ำยาบ้วนปากที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ทุกสายพันธุ์ สามารถช่วยลดคราบจุลินทรีย์ โรคเหงือกอักเสบ อย่างไรก็ตาม น้ำยาบ้วนปากนี้อาจก่อให้เกิดผลข้างเคียง เช่น ฟันเปลี่ยนสี รสชาติไม่พึงประสงค์ ภาวะปากแห้ง และผลกระทบต่อช่องปากโดยรวม

ในทางลบ [5], [7] จากการศึกษาพบว่าการใช้สมุนไพรเพื่อการดูแลสุขภาพมีมาอย่างยาวนานตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน อีกทั้งยังมีรายงานถึงการนำสมุนไพรมาพัฒนาเป็นน้ำยาบ้วนปาก อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบรายงานการพัฒนา น้ำยาบ้วนปากจากสมุนไพรตำรับจตุผลาธิกะ (Jatu-Phala-Tiga) รวมถึงการประเมินฤทธิ์ยับยั้ง *S. mutans* ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ดังกล่าวด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาตำรับสมุนไพรจตุผลาธิกะเป็นผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปาก เนื่องจากยังไม่พบรายงานว่ามีการทำผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากจากสมุนไพรตำรับจตุผลาธิกะ

จตุผลาธิกะเป็นตำรับสมุนไพรที่ประกอบด้วยสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ สมอไทย (*Terminalia chebula* Retz.) สมอเทศ (*Terminalia arjuna* (Roxb. ex DC.) Wight & Am.) สมอพิเภก (*Terminalia bellerica* (Gaertn.) Roxb.) และมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* Linn.) มีสรรพคุณตามตำรับยาไทยคือ แก้ไข้ แก้โรคตา บำรุงธาตุ รุ้ถ่ายรู้ปิด [8] จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าจตุผลาธิกะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [9] ด้านการอักเสบ ด้านแบคทีเรีย [10] อย่างไรก็ตามพบว่ามีรายงานน้อยมากเกี่ยวกับการศึกษาความสามารถของตำรับจตุผลาธิกะในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคฟันผุ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะตรวจสอบหาสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic content) และสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoid content) รวมทั้งทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *S. mutans* ของสารสกัดเอทานอลจตุผลาธิกะ และน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับจตุผลาธิกะ ซึ่งมีสารสกัดจตุผลาธิกะเป็นส่วนประกอบ ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปพัฒนาและต่อยอดในการวิจัยสมุนไพรที่มีศักยภาพในการป้องกันโรคที่เกี่ยวข้องกับงานด้านทันตสาธารณสุข

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. สมุนไพร

ผลสมอไทย ผลสมอเทศ ผลสมอพิเภก และผลมะขามป้อม ซื้อจากร้านขายสมุนไพรในตำบลพังโคน อำเภอพังโคน จังหวัดสกลนคร ได้มีการตรวจสอบเอกลักษณ์ภายนอกของสมุนไพร โดยผู้เชี่ยวชาญที่มีใบประกอบวิชาชีพการแพทย์แผนไทย ด้านเภสัชกรรมไทย

2.2. การเตรียมสารสกัดจตุผลาลิกะ

นำผลสมอไทย ผลสมอเทศ ผลสมอพิเภก และผลมะขามป้อม มาบดให้ละเอียด ในอัตราส่วน 1:1:1:1 จากนั้นนำมาสกัดด้วยเอทานอล 95% ในอัตราส่วน 1:2 (น้ำหนัก:ปริมาตร) ปิดฝาให้สนิท ไม่โดนแสง ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน โดยมีการเขย่าทุกวัน หลังจากนั้นกรองหยาบด้วยผ้าขาวบาง และกรองซ้ำด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator; Buchi, Switzerland) ที่ความดัน 50 - 200 มิลลิบาร์ ความเร็ว 70 รอบต่อนาที และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดที่แห้งสนิท ก่อนนำไปใช้ให้ละลายสารสกัดด้วย 0.5% DMSO (dimethyl sulfoxide) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

2.3. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

ในการศึกษานี้ใช้เชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* (ATCC 25175T) โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Brain Heart Infusion (BHI) ทั้งในรูปแบบของอาหารแข็ง (BHI agar) และอาหารเหลว (BHI broth) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งควบคุมระดับ CO₂ ที่ 5% เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำเชื้อที่ได้ไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร

2.4. การตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ใช้วิธี Folin-Ciocalteu assay ซึ่งทำโดยเตรียมสารสกัดเอทานอลจตุผลาลิกะที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงใน 96-well plate 20 ไมโครลิตร เติม Folin-Ciocalteu reagent (Sigma, USA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติม 75% sodium carbonate ปริมาตร 80 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และนำมา

คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากกราฟมาตรฐานของ gallic acid แล้วรายงานในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดแห้ง (mg gallic acid equivalent/g of dry extract) [11]

2.5. การตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

การตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ใช้วิธี aluminium chloride colorimetric ซึ่งทำโดยใช้ quercetin เป็นสารมาตรฐาน เติมสารสกัดเอทานอลจตุผลาลิกะ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 130 ไมโครลิตร และ 5% sodium nitrite ปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 10% aluminum chloride ปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร และบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา เติม 1 M sodium hydroxide ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และนำมาคำนวณปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมจากกราฟมาตรฐานของ quercetin แล้วรายงานในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมสารสกัดแห้ง (mg quercetin equivalent/g dry extract) [12]

2.6. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans*

การประเมินฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ของสารสกัดเอทานอลจตุผลาลิกะใช้วิธี disc diffusion โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BHI broth และปรับความขุ่นของเชื้อให้เป็น 0.5 McFarland จากนั้นนำเชื้อที่ได้กระจายให้ทั่วพื้นผิวของ BHI agar การเตรียมสารสกัดสมุนไพรทำโดยการนำสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่น paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ก่อนนำไปวางบนจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อกระจายอยู่แล้ว โดย positive control ที่ใช้คือ 0.2% chlorhexidine และ negative control ที่ใช้คือ 0.5% DMSO จากนั้นบ่มในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มข้นของ CO₂ 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ หรือโซนยับยั้ง (inhibition zone) โดยวัดเป็นหน่วยมิลลิเมตร และบันทึกผลการทดลอง ซึ่งดำเนินการทดสอบซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ [13]

2.7. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration; MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (minimum bactericidal concentration; MBC) ทำโดยวิธี broth dilution method ใน 96-well plate โดยเจือจางสารสกัดให้มีความเข้มข้นในช่วง 500 - 3.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี two-fold dilution และเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland จากนั้นเติมสารสกัดที่เจือจางแล้ว และเชื้อที่ปรับความเข้มข้นแล้วในอัตราส่วน 1:1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO₂ 5% นาน 48 ชั่วโมง วัดผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) โดยสังเกตหลุมสุดท้ายที่ใส และไม่มีตะกอนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก้นหลุม สำหรับการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MBC) ทำต่อจากการหาค่า MIC โดยดูดอาหารในหลุมที่ใส มาหยดลงบน BHI agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO₂ 5% นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงอ่านผลค่า MBC คือความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยสังเกตจากไม่พบโคโลนีบนอาหาร BHI agar ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เพื่อยืนยันผลการทดลอง [14]

2.8. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของการสกัดสมุนไพร

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของการสกัดสมุนไพรใช้วิธี crystal violet staining for biofilm assay ใน 96-well plate ซึ่งทำโดยการเตรียมสารสกัดเอทานอลเจือจางมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น MIC, 1/2MIC, 1/4MIC, 1/8MIC และ 1/16MIC ด้วย BHI broth เตรียม BHI broth ที่มี 2% sucrose และเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบให้มีค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.08 - 0.1 จากนั้นเติมสารสกัดสมุนไพร 2% sucrose ใน และเชื้อที่ปรับความเข้มข้นแล้วในอัตราส่วน 1:1 โดย positive control คือ 0.2% chlorhexidine และ negative control คือ 0.5% DMSO บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO₂ 5% นาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เมื่อครบเวลาล้างไบโอฟิล์มด้วย phosphate buffer (ความเข้มข้น 1x) และนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที จากนั้นย้อมสีด้วย

0.1% crystal violet เป็นเวลา 20 นาที แล้วถ่ายภาพไบโอฟิล์มด้วยกล้อง phase contrast microscope และละลายสีด้วย 30% acetic acid ปริมาณ 150 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม [15]

2.9. การเตรียมผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพร

ในการศึกษานี้ได้พัฒนาน้ำยาบ้วนปาก 3 สูตร คือ สูตรที่ 1 (ไม่มีสารสกัดสมุนไพรเป็นส่วนประกอบ) ส่วนสูตรที่ 2 และสูตรที่ 3 เป็นสูตรที่มีสารสกัดเอทานอลเจือจางเป็นส่วนประกอบ โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ MIC และ 2MIC ตามลำดับ (Table 1) การเตรียมน้ำยาบ้วนปากทำโดยชั่งน้ำหนักของสารสกัดสมุนไพรตามรับจุลผลาธิกะ 625 มิลลิกรัม (สำหรับสูตรที่ 2) และ 1,250 มิลลิกรัม (สำหรับสูตรที่ 3) ละลายด้วย เอทานอล 95% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใช้การ sonicate ช่วยในการละลายสารสกัดสมุนไพรให้เร็วขึ้น เติมน้ำ glycerin และ parabens ที่ละลายด้วย propylene glycol และ 70% sorbitol และผสมสารให้เข้ากัน เติมน้ำ peppermint และคนผสมสารให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 50 มิลลิลิตร เมื่อละลายเข้ากันดีแล้ว นำไปกรองโดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

2.10. การศึกษาผลของน้ำยาบ้วนปากต่อจุลผลาธิกะต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษาลงของน้ำยาบ้วนปากต่อจุลผลาธิกะต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียใช้วิธี time-kill curve assay ซึ่งทำโดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO₂ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับปริมาณเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland นำน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 1 สูตรที่ 2 และสูตรที่ 3 มาผสมกับเชื้อ *S. mutans* ที่เตรียมไว้ อัตราส่วน 1:1 กลุ่มควบคุม positive control คือ 0.2% chlorhexidine และ negative control คือน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 1 นำหลอดทดลองที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 30 วินาที, 1 นาที และ 2 นาที นำมาเจือจางด้วย 0.9% sodium chloride ในอัตราส่วน 1:1 แล้ว spread plate บนอาหาร BHI agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO₂ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น แล้วดูความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและจำนวนโคโลนีของเชื้อที่พบ

2.11. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) ($n = 3$) การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มใช้การวิเคราะห์

ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) ทดสอบร่วมกับ Duncan post-hoc test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ p -value < 0.05 โดยโปรแกรม statistical package for the social science (SPSS)

Table 1 Ingredients of mouthwash with Jatu-Phala-Tiga herbal formulation extract

Ingredients	Volume (mL)		
	Formula 1 (mouthwash base)	Formula 2 (MIC of the extract)	Formula 3 (2MIC of the extract)
Ethanol (with Jatu-Phala-Tiga extract)	-	0.5 (625 mg of the extract)	0.5 (1,250 mg of the extract)
Glycerin	4	4	4
70% Sorbitol	2	2	2
Parabens	0.5	0.5	0.5
Peppermint	-	0.5	0.5
Water qs ad	50	50	50

3. ผลการวิจัย

3.1. ผลการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

ผลการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเอทานอลจตุผลาธิกะ พบว่าสารสกัดเอทานอลจตุผลาธิกะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 368.62 ± 5.15 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดแห้ง และมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 652.33 ± 6.8 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมสารสกัดแห้ง

3.2. ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans*

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ใช้วิธี disc diffusion โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่น paper disc ที่มีสารสกัดจตุผลาธิกะเทียบกับ positive control คือ 0.2% chlorhexidine และ negative control คือ 0.5% DMSO ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้ 11.22 ± 1.38 , 16.18 ± 1.53 และ 6.00 ± 0.00 มิลลิเมตรตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองของสารสกัดจตุผลาธิกะมีความแตกต่างจากผลที่ได้จาก positive control และ negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงใน Table 2

3.3. ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MBC) ทำโดยวิธี broth dilution method ซึ่งผลที่ได้พบว่าสารสกัดเอทานอลจตุผลาธิกะมีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ± 0.00 และมีค่า MBC เท่ากับ 200 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน chlorhexidine (positive control) พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 0.01 ± 0.00 และมีค่า MBC เท่ากับ 0.04 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.4. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของการสกัดสมุนไพร

จากการนำสารสกัดเอทานอลจตุผลาธิกะมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม พบว่าที่ความเข้มข้น MIC, 1/2MIC, 1/4MIC, 1/8MIC และ 1/16MIC มีค่าการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม เท่ากับร้อยละ 45.81 ± 1.38 , 37.76 ± 4.76 , 29.38 ± 1.79 , 24.84 ± 4.56 และ 8.82 ± 4.05 ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับ positive control คือ 0.2% chlorhexidine และ negative control คือ 0.5% DMSO มีค่าการยับยั้งไบโอฟิล์ม เท่ากับร้อยละ 50.00 ± 3.83 และ 0.01 ± 0.00 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงใน Table 3

Table 2 Antibacterial activity against *S. mutans* of the herbal extract examined by disc diffusion method

Tested substances	Inhibition zone (mm)
Jatu-Phala-Tiga extract	11.22 ± 1.38 ^b
0.2% chlorhexidine (positive control)	16.18 ± 1.53 ^c
0.5% DMSO (negative control)	6.00 ± 0.00 ^a

Data are presented as mean ± standard deviation (SD).

Mean values followed by different superscripts (a, b, c) within a column are significantly different ($p < 0.05$).

Table 3 Inhibitory effect on biofilm formation by *S. mutans* of the herbal extract with different concentrations

Tested substances	% Inhibition of biofilm formation
Jatu-Phala-Tiga extract	
MIC	45.81 ± 1.38 ^c
1/2MIC	37.76 ± 4.76 ^{b,c}
1/4 MIC	29.38 ± 1.79 ^b
1/8 MIC	24.84 ± 4.56 ^b
1/16 MIC	8.82 ± 4.05 ^a
0.2% chlorhexidine (positive control)	50.00 ± 3.83 ^c
0.5% DMSO (Negative control)	0.01 ± 0.00 ^a

Data are presented as mean ± standard deviation (SD).

Mean values followed by different superscripts (a, b, c) within a column are significantly different ($p < 0.05$).

3.5. ผลการศึกษาฤทธิ์ของน้ำยาบ้วนปากตำรับ จตุผลาธิกะต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ผลการศึกษาฤทธิ์ของน้ำยาบ้วนปากตำรับจตุผลาธิกะต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* โดยใช้วิธี time-kill curve assay พบว่าที่เวลา 0, 30 วินาที, 1 และ 2 นาที จำนวนโคโลนีของ *S. mutans* ที่พบในกรณีของน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 1 เท่ากับ 41.0 ± 1.4 , 55.0 ± 1.4 , 48.5 ± 2.8

และ 45.0 ± 4.2 ตามลำดับ ในกรณีของน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 2 เท่ากับ 35.5 ± 2.1 , 24.5 ± 3.5 , 36.5 ± 3.5 และ 21.0 ± 5.6 ตามลำดับ และในกรณีของน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 3 เท่ากับ 24.5 ± 4.9 , 16 ± 5.6 , 12.5 ± 3.5 และ 21 ± 2.8 ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับจตุผลาธิกะ สูตรที่ 3 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดในทุกช่วงเวลาที่ทำการศึกษา (Figure 1)

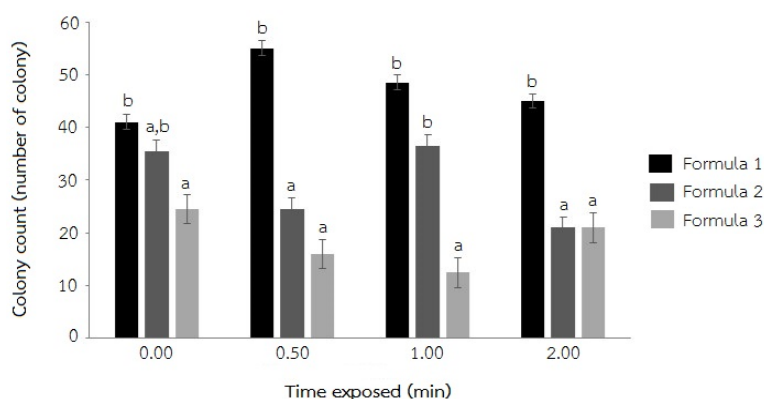


Figure 1 Antibacterial activity of Jatu-Phala-Tiga herbal mouthwash against *S. mutans* studied by time-kill curve assay

Data are presented as mean ± standard deviation (SD).

Mean values with different numbers (a, b) are significantly different ($p < 0.05$).

4. อภิปรายผลการวิจัย

ตำรับสมุนไพรจตุผลาภิกะมีสรรพคุณตามตำรับยาไทยคือ แก้ไข้ แก้ลมแก้โรคตา บำรุงธาตุ รู้ถ่ายรู้ปิต [8] เป็นตำรับที่ประกอบด้วยสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ สมอไทย (*Terminalia chebula* Retz.), สมอเทศ (*Terminalia arjuna* (Roxb. ex DC.) Wight & Arn.), สมอพิเภก (*Terminalia bellerica* (Gaertn.) Roxb.) และมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* Linn.) มีสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านแบคทีเรีย [10] จากผลการศึกษาหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวม และสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดเอทานอลจตุผลาภิกะพบว่ามีความแตกต่างจากการศึกษาของ Wetchakul et al. [9] เนื่องจากมีปัจจัยที่แตกต่างกัน เช่น ความเข้มข้นของสารสกัด โดยการศึกษาในครั้งนี้ใช้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การศึกษาของ Wetchakul et al. ใช้ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และการศึกษาในครั้งนี้ใช้เวลาหมักสารสกัดเป็นเวลา 3 วัน ในขณะที่การศึกษาของ Wetchakul et al. ใช้เวลาในการหมักสารสกัดเป็นเวลา 7 วัน จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจตุผลาภิกะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* เนื่องจากมีสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ และมีรายงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่า สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย [16]

จากผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ของสารสกัดเอทานอลจตุผลาภิกะด้วยวิธี disc diffusion ในครั้งนี้ พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเท่ากับ 11.22 ± 1.38 มิลลิเมตร และมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 12.5 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาของ Bellamkonda et al. [17] ที่ได้ค่า MIC ของการสกัดสมอไทย ซึ่งเป็นสมุนไพรในตำรับจตุผลาภิกะ เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากสารสกัดสมอไทยเป็นสมุนไพรเดี่ยว ส่วนสารสกัดจตุผลาภิกะเป็นสารสกัดรวมเป็นตำรับ และวิธีการสกัดสารของ Bellamkonda et al. ใช้เวลาสกัดสารเพียง 24 ชั่วโมง ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ใช้เวลาสกัดสาร 3 วัน จึงทำให้มีค่า MIC และค่า MBC แตกต่างกัน และจากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจตุผลาภิกะต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มโดยเชื้อ *S. mutans* พบว่ามีค่าการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากกลุ่ม positive control

(0.2% chlorhexidine) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sadr Haghighi et al. [18] ซึ่งศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดตรีผลาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการสะสมของคราบจุลินทรีย์ และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* และ *Lactobacillus* ซึ่งพบว่าสารสกัดตรีผลามีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ ใกล้เคียงกับ chlorhexidine ทั้งในผู้ที่มีสุขภาพเหงือกปกติ และผู้ป่วยที่มีภาวะเหงือกอักเสบเรื้อรังหรือโรคปริทันต์อักเสบ

จากรายงานของ Sanseera [19] ซึ่งทำการศึกษาดูฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในช่องปากของสารสกัดจากส่วนเหนือดินของต้นขลุ่ย เพื่อใช้พัฒนาตำรับยาสมุนไพร โดยใช้อเอทานอลเป็นตัวทำละลายในการเตรียมสารสกัด และประเมินฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ด้วยวิธี disc diffusion method ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากต้นขลุ่ยที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. mutans* ได้ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง เท่ากับ 7.10 ± 0.20 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน erythromycin ที่ความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง เท่ากับ 23.90 ± 0.36 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่าสารสกัดต้นขลุ่ยมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ได้ในระดับหนึ่ง [19]

chlorhexidine ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพสูงในการต่อต้านจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม มักทำให้เกิดคราบบนฟันและวัสดุอุดฟัน รวมถึงส่งผลต่อการรับรู้รส ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาน้ำยาบ้วนปากจากสมุนไพร [20] ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำสมุนไพรตำรับจตุผลาภิกะมาพัฒนาเป็นน้ำยาบ้วนปาก และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* เปรียบเทียบกับ 0.2% chlorhexidine ในหลอดทดลอง ซึ่งพบว่า 0.2% chlorhexidine มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าน้ำยาบ้วนปากตำรับจตุผลาภิกะ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Srinagesh et al. [21] ที่เปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปาก 6% ตรีผลากับ 0.2% chlorhexidine พบว่า เมื่อใช้น้ำยาบ้วนปาก 6% ตรีผลา และ 0.2% chlorhexidine วันละ 2 ครั้ง สามารถลดปริมาณเชื้อ *Streptococcus* ในช่องปากได้ 17% และ 44% ตามลำดับ แม้สารสกัดเอทานอลจตุผลาภิกะจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูง แต่มีข้อจำกัดด้านการยับยั้งและการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย โดยมีค่า MIC เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ MBC ที่ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงมากเมื่อเทียบกับ 0.2% chlorhexidine อย่างไรก็ตาม ศักยภาพ

ของสารสกัดเอทานอลจตุผลาธิกะอยู่ที่ความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* โดยมีค่าสูงถึงร้อยละ 45.81 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับ 0.2% chlorhexidine กลไกการออกฤทธิ์ดังกล่าวบ่งชี้ว่าสารออกฤทธิ์ในตำรับจตุผลาธิกะมุ่งเน้นการลดการยึดเกาะของไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นต้นเหตุหลักของโรคฟันผุ มากกว่าการฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยตรง อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันผลที่ได้จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อประเมินประสิทธิภาพและความปลอดภัยของสารสกัดจตุผลาธิกะให้มีความชัดเจนยิ่งขึ้น

5. บทสรุป

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเอทานอลจตุผลาธิกะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 368.62 ± 5.15 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดแห้ง และมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 652.33 ± 6.8 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมสารสกัดแห้ง รวมทั้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* โดยมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง เท่ากับ 11.22 ± 1.38 มิลลิเมตร และมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 12.5 ± 0.00 และ 200 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม โดยที่ค่า MIC มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม เท่ากับร้อยละ 45.81 ± 1.38 เมื่อเปรียบเทียบกับ 0.2% chlorhexidine (positive control) ซึ่งมีค่าการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม เท่ากับร้อยละ 50.00 ± 3.83 จะเห็นได้ว่าสารสกัดเอทานอลจตุผลาธิกะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มใกล้เคียงกับ positive control เมื่อนำไปพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับจตุผลาธิกะ และนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* โดยวิธี time-kill curve assay พบว่าในทุกเวลาน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 3 (ซึ่งมีสารสกัดจตุผลาธิกะความเข้มข้นกับ 2MIC เป็นส่วนประกอบ) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ได้ดีที่สุด แม้สารสกัดเอทานอลจตุผลาธิกะจะมีข้อจำกัดด้านการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แต่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่โดดเด่น จึงมีศักยภาพเบื้องต้นสำหรับการนำมาพัฒนาเป็นน้ำยาบ้วนปาก โดยมีเป้าหมายหลักเพื่อการป้องกันและควบคุมการสะสมของคราบจุลินทรีย์ซึ่งเกิดจากการสร้างไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ แนวทางการศึกษาต่อยอดควรมีการแยกสารออกฤทธิ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ และประเมินความปลอดภัยและความคงตัวในระยะยาวในทางคลินิกอย่างครอบคลุมต่อไป

6. References

- [1] Chen, H. and et al. 2024. Novel strategy of *S. mutans* gcrR gene over-expression plus antibacterial dimethylaminohexadecyl methacrylate suppresses biofilm acids and reduces dental caries in rats. **Dental Materials**. 40(10): e41-e51.
- [2] Liu, B. and et al. 2024. An optimized caries model of *Streptococcus mutans* in rats and its application for evaluating prophylactic vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**. 20(1): 2345943.
- [3] Seguya, A. and et al. 2022. Chlorhexidine versus organoselenium for inhibition of *S. mutans* biofilm, an *in vitro* study. **BMC Oral Health**. 22(1): 14.
- [4] Sugai, K. and et al. 2023. Isolation of *Streptococcus mutans* temperate bacteriophage with broad killing activity to *S. mutans* clinical isolates. **iScience**. 26(12): 108465.
- [5] Kamble, A. and et al. 2022. Effectiveness of oral probiotics in reducing *S. mutans* count in caries-active children: A comparison with chlorhexidine and herbal mouthrinse (Hiora®). **International Journal of Clinical Pediatric Dentistry**. 15(Suppl. 2): S207-S211.
- [6] Yazicioglu, O., Ucuncu, M.K. and Guven, K. 2024. Ingredients in commercially available mouthwashes. **International Dental Journal**. 74(2): p. 223-241.
- [7] Oshvandi, K. and et al. 2024. Comparison of the effect of licorice and chlorhexidine mouthwash on the oral health of intubated patients in the intensive care unit. **BMC Oral Health**. 24(1): 682.
- [8] Sato, V.H. and et al. 2018. Pharmacological effects of Chatuphalatika in hyperuricemia of gout. **Pharmaceutical Biology**. 56(1): 76-85.
- [9] Wetchakul, P. and et al. 2019. Traditional tonifying polyherbal infusion, Jatu-Phala-Tiga, exerts antioxidant activities and extends lifespan

- of *Caenorhabditis elegans*. **BMC Complementary Medicine and Therapies**. 19(1): 209.
- [10] Dhingra, A.K. and et al. 2022. Pharmacological properties of chebulinic acid and related ellagitannins from nature: An emerging contemporary bioactive entity. **Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine**. 5: 100163.
- [11] Miliauskas, G., Venskutonis, P.R. and van Beek, T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**. 85: 231-237.
- [12] Gajula, D. and et al. 2009. Determination of total phenolics, flavonoids and antioxidant and chemopreventive potential of basil (*Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L.). **International Journal of Cancer Research**. 5: 130-143.
- [13] Hemeg, H.A. and et al. 2020. Antimicrobial effect of different herbal plant extracts against different microbial population. **Saudi Journal of Biological Sciences**. 27(12): 3221-3227.
- [14] Dhawan, B., Gadepalli, R. and Kapil, A. 2009. *In vitro* activity of daptomycin against *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates associated with skin and soft tissue infections: first results from India. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 65(2): 196-198.
- [15] Li, B. and et al. 2018. Curcumin as a promising antibacterial agent: Effects on metabolism and biofilm formation in *S. mutans*. **BioMed Research International**. 2018: 4508709.
- [16] Mahboubi, A. and et al. 2015. Total phenolic and flavonoid content and antibacterial activity of *Punica granatum* L. var. *pleniflora* flowers (Golnar) against bacterial strains causing foodborne diseases. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 15(1): 366.
- [17] Bellamkonda, P. and et al. 2021. Evaluation of antimicrobial activity of extracts of *Terminalia chebula* and *Piper nigrum* against *Streptococcus mutans*: An *in vitro* study. **Journal of Pharmaceutical Research International**. 33(36A): 218-224.
- [18] Sadr Haghighi, A.H. and et al. 2022. Antibacterial efficacy of the combination of triphala and chlorhexidine mouthwashes on salivary *Streptococcus mutans* of orthodontic patients: A randomized clinical trial. **Journal of International Oral Health**. 14(6): 636-641.
- [19] Sanseera, D. 2023. Study on antibacterial activity in bacterial cavity of the extraction from *Pluchea indica* (Linn.) for development of herbal toothpaste formulation. **UTK Research Journal**. 17(2): 58-69. (in Thai)
- [20] Indra, G., Maragathavalli, G. and Rajeshkumar, S. 2021. Preparation of mouthwash using triphala aqua-ethanolic extract - A comparative study on antimicrobial and cytotoxic effects. **International Journal of Dentistry and Oral Science**. 8(8): 3648-3651.
- [21] Srinagesh, J., Krishnappa, P. and Somanna, S.N. 2012. Antibacterial efficacy of triphala against oral streptococci: An *in vivo* study. **Indian Journal of Dental Research**. 23(5): 696.