Original Article

ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดเอทานอลจากใบพลูต่อเชื้อ *Enterococcus faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม

Antimicrobial Activity of *Piper betle* Ethanolic Leaf Extract on *Enterococcus faecalis* Biofilm

สุภารัตน์ คำแดง[1*], ใจนุช กาญจนภู[2], นิภาพร เมืองจันทร์[1], ทรงพล สิทธิการค้า[1], อดุลย์ศักดิ์ เหลาแหลม[1], วุฒิไกร วิลามาตย์[1], นพวัฒน์ เพ็งคำศรี[1]

Suparat Khamdang[1*], Jainuch Kanchanapoo[1], Nipaporn Meungchan[1], Songpon Sittikanka[1], Adulsak Ihaolaem[1], Wootthikrai Wilamat[1], Noppawat Pengkumsri[1]

Received: 3 March 2010 **Accepted:** 2 Sep 2010

บทคัดย่อ

Enterococcus faecalis เป็นเชื้อสาเหตุสำคัญของความล้มเหลวในการรักษาคลองรากฟัน การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดเอทานอลจากใบพลูต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระและเจริญแบบไบโอฟิล์ม และหาเวลาที่เหมาะสมของสารสกัดในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระของสารสกัดเอทานอลจากใบพลู ด้วยวิธี agar well diffusion assay หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ (minimum inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (minimum bactericidal concentration, MBC) ด้วย agar dilution assay พร้อมทั้งศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อและเวลาสัมผัสสารทดสอบ (contact time) ของเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบพลูมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. faecalis* โดยมีค่า inhibition zone เท่ากับ 12.4±0.13 มม. (antimicrobial index = 1.5±0.03) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเท่ากับ 6.25 มก./มล. และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อเท่ากับ 12.5 มก./มล. และพบว่าต้องใช้สารสกัดเอทานอลจากใบพลูที่ความเข้มข้น 50 มก./มล. เป็นเวลา 8 ชั่วโมงจึงสามารถฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์มได้

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านจุลชีพ, พลู, เจริญแบบไบโอฟิล์ม, *Enterococcus faecalis*
วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2553; 6(2): 84-91

---

[1] ปร.ด, ผู้ช่วยศาสตรจารย์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

[2] ปร.ด, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม 235 ถ.เพชรเกษม เขตภาษีเจริญ กรุงเทพมหานคร 10163

[1] Ph.D, Assistant Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Warin Chamrap, Ubon Ratchathani 34190

[2] Ph.D, Facuity of Pharmaceutical Sciences, Siam University, 235 Petkasem Road, Phasicharoen, Bangkae Bangkok 10163

* Corresponding author: Suparat Khamdang, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University , 34190
Tel. +66 45 353630 Fax. +66 45 353626 E-mail: suparatkha@hotmail.com

Abstract

Enterococcus faecalis is a major organism causing root canal treatment failure. This study was aimed to evaluate antimicrobial effects of *Piper betle* ethanolic extract on *E. faecalis* growing in a form of either planktonic or biofilm. The optimal time for its antimicrobial activity was also investigated. The antimicrobial effect against planktonic *E. faecalis* was first investigated using agar well diffusion assay. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were then determined by agar dilution method. The results showed that ethanolic extract of *Piper betle* inhibited *E. faecalis* that grew in a planktonic form with an inhibition zone of 12.4±0.13 mm (antimicrobial index = 1.5±0.03) in agar well diffusion assay. MIC and MBC of 6.25 and 12.5 mg/mL, respectively, were reported using agar dilution assay. Ethanolic extract of *Piper betle* as high as 50 mg/ml showed bactericidal effects when incubated with *E. faecalis* biofilms for 8 hours.

Keywords: antimicrobial activity, *Piper betle* Linn., biofilm, *Enterococcus faecalis*
IJPS 2010; 6(2): 84-91

บทนำ

การรักษาคลองรากฟันมีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดแบคทีเรียจากคลองรากฟันที่มีการติดเชื้อ และป้องกันการติดเชื้อซ้ำ (Sjogren et al., 1991) ก่อนที่จะทำการอุดฟันด้วยสารเฉื่อย การติดเชื้อในคลองรากฟันปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จในการรักษาคลองรากฟัน จากการศึกษาทางคลินิกพบว่าการใช้น้ำยาล้างสวนล้างคลองรากฟัน การขยายคลองรากฟัน และการใส่ยาในคลองรากฟันจะช่วยลดจำนวนแบคทีเรียในคลองรากฟัน แต่มีเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์มีฤทธิ์ดื้อต่อยาต้านจุลชีพโดยเฉพาะ *E. faecalis* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่เจริญในทางเดินอาหารของมนุษย์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ยากต่อการกำจัด (Harrison et al., 1981) แต่ถูกทำลายได้โดย 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 2% chlorhexidine และ 2.5% sodium hypochlorite ซึ่งใช้เป็นน้ำยาสวนล้างคลองรากฟันหลังการเอา pulp ออกก่อนที่จะทำการรักษาในขั้นตอนต่อไป (Wang et al., 2007; Isabelle et al., 2006) การเจริญของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ รวมถึง *E. faecalis* บนผิวรากฟันมีลักษณะของการเจริญแบบไบโอฟิล์ม ซึ่งพบว่าเป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพเพิ่มขึ้น

ใบพลู (*Piper betel* Linn. วงศ์ Piperaceae) เป็นสมุนไพรที่คนไทยในสมัยก่อนใช้เคี้ยวกินกับหมาก จากการศึกษาของมาลี และคณะ (มาลีและคณะ,2551) พบว่าสารสกัดจากใบพลูด้วยเอทานอล 95% มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *E. faecalis* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 6.25 มก./มล. และ MBC เท่ากับ 25 มก./มล. น้ำมันพลูและสารสกัดจากใบพลู มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบเช่น *Bacillus subtilis, Salmonella* sp., *Escherichia coli, Pseudomonas solanacearum* นอกจากนี้น้ำมันพลูและสารสกัดจากใบพลูด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ ไดเอธิลอีเทอร์ อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และ เอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค ได้แก่ *Staphylococcus aureus, β-hemolytic Streptococcus group A.* และ *E. faecalis (Suppakul et al., 2006)* และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราซึ่งได้แก่ *Aspergillus niger, A. flavus, A. parasiticus* และ *Fusarium* sp. รวมถึงเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคผิวหนังซึ่งได้แก่ *Trichophyton mentagrophytes, T. rubrum, Epidermophyton floccosum* และ *Microsporum gypseum* (Amadioha, 2001)

ดังนั้น การศึกษาวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดเอทานอลจากใบพลูต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระ และเจริญยึดแบบไบโอฟิล์ม ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับการเจริญของเชื้อในช่องปาก เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ในการพัฒนาสมุนไพรพื้นบ้านของไทยมาทดแทนการใช้สารเคมี และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาสมุนไพรมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ต่อไป

วัสดุอุปกรณ์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ คือ *E. faecalis* (ATCC 29212, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) ใบพลูสดจากเขตพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ Tryptic Soy Agar (TSA) Tryptic Soy Broth (TSB) Mueller Hinton Agar (MHA) (บริษัท Merck, สหรัฐอเมริกา) สารละลาย 17% EDTA 2% chlorhexidine และ 5% sodium hypochlorite ได้จากคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ampicillin disc ความแรง 10 μg/disc (บริษัท Dickinson ประเทศสหรัฐอเมริกา) nitrocellulose membrane (เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มม. บริษัท Millipore corp. ประเทศสหรัฐอเมริกา) สารเคมีที่ใช้สำหรับการศึกษาครั้งนี้สั่งซื้อจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา และเป็นสารเคมีเกรดมาตรฐานสำหรับการทดลอง

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดเอทานอลจากใบพลู

ล้างใบพลูให้สะอาด อบที่อุณหภูมิ 45 ^{0}C จนแห้ง บดด้วยเครื่องบดสมุนไพร ชั่งน้ำหนักผงแห้ง ห่อด้วยผ้าขาวบางนำไปแช่ใน 95% เอทานอลใน percolator พอท่วมทิ้งไว้ 1 วัน ไขเอาส่วนของเหลวจนหมด ทำการสกัดซ้ำด้วย 95% ethanol จำนวน 3 ครั้ง รวมสารสกัดที่ได้ทั้งหมดกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 2 แล้วทำให้แห้งโดยใช้ rotary evaporator (Buchi สวิทเซอร์-แลนด์) จากนั้นชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้เพื่อคำนวณ %yield

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยวิธี agar well diffusion assay (Suppakul et al., 2006)

เตรียมสารสกัดเอทานอลจากใบพลู (50 มก./มล. ใน 10% DMSO) สารละลายมาตรฐาน 17% EDTA 2% chlorhexidine และ 2.5% sodium hypochlorite กรองสารละลายเพื่อทำให้ปราศจากเชื้อด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 μm (บริษัท Millipore corp. สหรัฐอเมริกา) เตรียมเชื้อ *E. faecalis* จาก overnight broth culture ใน TSB ให้ได้ความขุ่นใกล้เคียงกับ McFarland No.0.5 กระจายเชื้อให้ทั่วบน MHA plate เจาะหลุมด้วย cock borer (เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม.) จำนวน 6 หลุม/plate หยดสารละลายชนิดต่างๆ ปริมาตร 25 μL ลงในหลุม โดยใช้ 10% DMSO เป็น negative control จากนั้นนำไปเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 24 ชม. อ่านผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone หรือ inhibition zone) ที่เกิดขึ้น สารที่จัดว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. faecalis* จะต้องมี inhibition zone > 5 มม. (Suppakul et al., 2006) คำนวณค่า antimicrobial index (AI) จากสูตร (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone - ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ well) / ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ well (Villasenor et al., 2004)

2.2 การหาค่า MIC และ MBC โดยวิธี agar dilution assay (Hammer et al., 1999)

เตรียมสารสกัดจากใบพลูด้วยเอทานอล และสารมาตรฐานทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ แบบ two fold dilution ใน MHA slant หยดเชื้อ *E. faecalis* ที่ความขุ่นใกล้เคียงกับ McFarland No.0.5 ปริมาตร 1 μL ลงไปบนผิวของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 24 ชม. อ่านผลโดยสังเกตความเข้มข้นต่ำสุดที่มองไม่เห็นเชื้อขึ้นถือเป็นค่า MIC หลังจากนั้นถ่ายเชื้อจากหลอดที่ไม่เห็นการเจริญของเชื้อทั้งหมดโดยใช้ไม้พันสำลีชุบน้ำเกลือป้ายบนผิวอาหารและนำไปป้ายบน MHA plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 24 ชม. ความเข้มข้นที่ไม่มีการเจริญของเชื้อหรือมีจำนวนโคโลนี < 5 ถือว่าความเข้มข้นนั้นเป็นค่า MBC (พัชรียา และคณะ, 2552)

2.3 การทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม (Giardino et al., 2007)

จำลองการเจริญของเชื้อแบบไบโอฟิล์มโดยหยดเชื้อที่ความขุ่นใกล้เคียงกับ McFarland No.0.5 ลงบน nitrocellulose membrane ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 มม. บน TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 48 ชม. หลังจากนั้นทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อโดยถ่ายเชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์มลงในหลอดที่มีสารสกัดเอทานอลจากใบพลูและสารมาตรฐานทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน TSB นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำหลอดทดลองไป sonicate 5 นาที เพื่อให้เชื้อหลุดออกจาก nitrocellulose membrane และกระจายตัวดีเจือจางสารละลาย 10 เท่า แล้วทำการ spread plate บน MHA นำไปบ่มที่ 37 ^{0}C เป็นเวลา 24 ชม. นับจำนวนโคโลนีต่อ plate โดย plate ที่มีจำนวนโคโลนี < 5 ถือว่ามีฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม

2.4 การหาเวลาสัมผัสสารออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม (Abdullah et al., 2005)

จำลองการเจริญของเชื้อแบบแบบไบโอฟิล์มด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น บ่มเชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์มในหลอดที่มีสารสกัดเอทานอลจากใบพลู และสารมาตรฐานทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้นต่ำสุด ที่ฆ่าเชื้อแบบไบโอฟิล์มที่ได้จากข้อ 2.3 แต่ละหลอดบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลาแตกต่างกันดังนี้ 0.5 1 2 4 8 16 และ 24 ชม. เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วถ่ายแผ่น biofilm ลงในหลอดทดลองที่มีเฉพาะ TSB เพื่อ sonicate แยกเชื้อและ spread plate เพื่อนับจำนวนโคโลนีต่อ plate โดย plate ที่มีจำนวนโคโลนี < 5 และใช้เวลาสั้นที่สุดถือว่าเป็นเวลาที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม

ผลการทดลอง

สกัดใบพลูด้วยวิธีหมักผงใบพลูแห้งกับ 95% เอทานอลหลังจากทำให้แห้งด้วย rotary evaporation ได้ปริมาณของสารคิดเป็น 3.87% ของน้ำหนักสด และ 16.29% ของน้ำหนักแห้ง

1. ฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. faecalis*

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระด้วยวิธี agar well diffusion ผลการทดสอบพบว่า ampicillin ซึ่งเป็น positive control ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone 26.4±0.63 มม. คิดเป็น antimicrobial index (AI) เท่ากับ 4.3±0.13 ส่วน 17% (170 มก./มล.) EDTA, 2% (20 มก./มล.) chlorhexidine และ 2.5% (25 มก./มล.) sodium hypochlorite ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (AI) เท่ากับ 24.5±0.63 (3.9±0.13), 24.3±0.73 (3.9±0.15) และ 14.1±0.82 (1.8±0.16) มม. ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเอทานอลจากใบพลูมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone 12.4±0.13 มม. หรือมีค่า AI เท่ากับ 1.5±0.03 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone ของสารทดสอบต่างๆ ต่อเชื้อ *E. faecalis* ด้วยวิธี agar well diffusion

สารทดสอบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zones (mm, X±SD)	Antimicrobial index (AI)
Ampicillin (10 µg/disc)	26.4±0.63	4.3±0.13
EDTA (170 มก./มล.)	24.5±0.63	3.9±0.13
Chlorhexidine (20 มก./มล.)	24.3±0.73	3.9±0.15
Sodium hypochlorite (25 มก./มล.)	14.1±0.82	1.8±0.16
Piper betle ethanolic leave extract (50 มก./มล.)	12.4±0.13	1.5±0.03

หมายเหตุ: สารทดสอบที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพคือ เส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone > 5 มม. หรือมี AI > 0 (Suppakul et al., 2006)

2. ค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *E. faecalis*

การหาค่า MIC และ MBC ของสารทดสอบต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระในครั้งนี้เลือกใช้วิธี agar dilution assay ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบพลูมีค่า MIC 6.25 มก./มล. และ MBC 12.50 มก./มล.สารมาตรฐาน EDTA, chlorhexidine และ sodium hypochlorite มีค่า MIC 1.25, 0.625 และ 1.25 มก./มล. ตามลำดับ และมีค่า MBC เท่ากับ 2.50, 0.625 และ 5 มก./มล. ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และค่า minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารทดสอบต่างๆ ต่อเชื้อ *E. faecalis*

สารทดสอบ	MIC (มก./มล.)	MBC (มก./มล.)
EDTA	1.25	2.5
Chlorhexidine	0.625	0.625
Sodium hypochlorite	1.25	5.0
Piper betle ethanolic leave extract	6.25	12.5

3. ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม

สารสกัดเอทานอลจากใบพลูมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม โดยความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อคือ 50 มก./มล. คิดเป็น 4 เท่าของค่า MBC ต่อเชื้อที่เจริญแบบอิสระ เช่นเดียวกันกับสารมาตรฐาน chlorhexidine และ sodium hypochlorite ความเข้มที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อคือ 3.125 และ 25 มก./มล. คิดเป็น 5 เท่าของค่า MBC ต่อเชื้อที่เจริญแบบอิสระ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่า minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารทดสอบต่างๆ ต่อเชื้อ *E.faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม

สารทดสอบ	MBC (มก./มล.)
EDTA	>12.5
Chlorhexidine	3.125
Sodium hypochlorite	25.0
Piper betle ethanolic leave extract	50.0

4. เวลาสัมผัสสารที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม

สารสกัดเอทานอลจากใบพลูเข้มข้น 50 มก./มล. มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม แต่ต้องใช้เวลาในการสัมผัสสารนานถึง 8 ชม. ในขณะที่ chlorhexidine (3.125 มก./มล.) และ sodium hypochlorite (25 มก./มล.) เริ่มออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่เวลา 2 และ 4 ชม. ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ค่า contact time (ชม.) ของสารทดสอบต่างๆ ต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม

สารทดสอบ	Contact time (ชม.)
Chlorhexidine (3.125 มก./มล.)	2
Sodium hypochlorite (25 มก./มล.)	4
Piper betle ethanolic leave extract (50 มก./มล.)	8

วิจารณ์และสรุปผล

เป้าหมายของการศึกษาและพัฒนาสมุนไพรไทยเพื่อนำมาใช้ในกระบวนการรักษาคลองรากฟันคือ การทำน้ำยาล้างคลองรากฟัน หรือยาที่ใส่ในคลองรากฟัน ซึ่งมีจุดประสงค์เพื่อช่วยกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่ยังเหลือตกค้างอยู่หลังจากขยายคลองรากฟัน ช่วยลดการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันและช่วยให้คลองรากแห้ง น้ำยาล้างคลองรากฟันที่ดีควรมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี และไม่เป็นพิษหรือระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน (สุวิมล และคณะ, 2543) มีรายงานถึงความเป็นพิษและระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อที่เกิดจากน้ำยาล้างคลองรากที่มีใช้ในปัจจุบัน มีรายงานชนิดของแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาล้างหรือใส่คลองราก เช่น *E. faecalis* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่มีการศึกษาพบว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อซ้ำในการรักษาคลองรากฟัน (Gomes et al., 2006; Stuart et al., 2007; Souto et al., 2008) *E. faecalis* อาศัยในคลองรากฟันทั้งแบบอิสระ (planktonic bacteria) และ biofilm หมายถึงการยึดเกาะกันเป็นกลุ่มล้อมรอบด้วย matrix ซึ่งเป็นสารจำพวก polysaccharide อยู่บนพื้นผิว มีรูในการผ่านเข้าออกของอาหาร แก๊ส และของเสีย (Chavant et al., 2007) จากการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าบริเวณที่เชื้อจุลินทรีย์อาศัยอยู่แบบไบโอฟิล์ม คือ บริเวณคลองรากฟันส่วนปลาย รูเปิดปลายรากฟัน ผิวนอกของปลายรากฟันที่ติดเชื้อ ตลอดจนแท่งกัตตาเปอร์ชาที่อุดเกินปลายรากซึ่งการอาศัยอยู่แบบไบโอฟิล์มนี้เองเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อมีความต้านทานต่อสารต้านแบคทีเรีย (แสงอุษา, 2550; Portenier et al., 2003)

มาลีและคณะ (มาลีและคณะ, 2551) ศึกษาพบว่าสารสกัดจากใบพลูและเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. faecalis* เมื่อทำการ

ทดสอบฤทธิ์โดยวิธี broth dilution assay พบว่าเฉพาะสารสกัดใบพลูเท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ แต่สารสกัดจากเปลือกมังคุดไม่พบฤทธิ์ดังกล่าว ดังนั้นในการศึกษาฤทธิ์ต้าน *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม จึงเลือกศึกษาเฉพาะสารสกัดจากใบพลูเท่านั้น ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระด้วยวิธี agar well diffusion assay ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบพลู ให้ค่า clear zone 12.4±0.13 มม. หรือมีค่า AI เท่ากับ 1.5±0.03 ในขณะที่ 17% EDTA, 2% chlorhexidine และ 2.5% sodium hypochlorite มีค่า clear zone (AI) เท่ากับ 24.5±0.63 (3.9±0.13) 24.3±0.73 (3.9±0.15) และ 14.1±0.82 (1.8±0.16) มม. ตามลำดับแสดงให้เห็นว่าสารสกัดเอทานอลจากใบพลูที่ความเข้มข้น 50 มก./มล. มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการศึกษาของมาลีและคณะ เนื่องจากสารสกัดเอทานอลจากใบพลูเป็นสารที่มีสีจึงทำให้อ่านค่า MIC และ MBC ได้ยากเมื่อทดสอบด้วย broth dilution assay ดังนั้นในการหา MIC และ MBC ของสารทดสอบต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระในการศึกษานี้เลือกใช้วิธี agar dilution assay ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากใบพลูด้วยเอทานอลมีค่า MIC เท่ากับ 6.25 มก./มล. และ MBC เท่ากับ 12.50 มก./มล. ส่วนค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากใบพลูด้วยเอทานอลเมื่อทดลองด้วยวิธี broth dilution method (มาลีและคณะ, 2551) มีค่าเท่ากับ 6.25 มก./มล. และ 25 มก./มล. ค่า MIC ที่ได้จากทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกัน แต่ค่า MBC ที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธี agar dilution assay มีค่าต่ำกว่าค่า MBC ที่ได้จากการทดลองด้วยวิธี broth dilution assay ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความสามารถในการละลายของสารสกัดจากใบพลูด้วยเอทานอล ซึ่งอาจทำให้ตกตะกอนเมื่ออยู่ในอาหารเหลว ทำให้ค่าที่ได้สูงกว่าความเป็นจริง อย่างไรก็ตามค่า MIC ที่ได้จากการทดลองในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกันไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้เพราะว่ามีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อค่า MIC ที่ได้เช่น ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ต่างกัน ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น (Curtin and Cormican, 2003) ส่วนสารที่มีใช้ในทางทันตกรรมเช่น EDTA, chlorhexidine และ sodium hypochlorite มีค่า MIC เท่ากับ 1.25 0.625 และ 1.25 มก./มล. ตามลำดับ และมีค่า MBC เท่ากับ 2.50, 0.625 และ 5 มก./มล. ตามลำดับ จะเห็นว่าค่า MBC ของสารดังกล่าวต่ำกว่าความเข้มข้นที่ใช้ในคลินิกคือ EDTA 170 มก./มล., chlorhexidine 20 mg/ml และ sodium hypochlorite13-25 มก./มล. การติดเชื้อซ้ำในการรักษาคลองรากฟันที่พบอาจเนื่องมาจากระยะเวลาในการสัมผัสสาร *E. faecalis* สายพันธุ์ดื้อยา หรือการที่เชื้อ *E. faecalis* มีการเจริญแบบไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นลักษณะของการเจริญเติบโตของ *E. faecalis* ที่พบบ่อย การเจริญแบบไบโอฟิล์มนี้ ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านของยาเข้าไปในไบโอฟิล์มลดลง และอัตราการเมตาบอลิซึมและการเจริญเติบโตของเชื้อในไบโอฟิล์มจะต่ำกว่าปกติเนื่องจากอาหารจำกัด ซึ่งทำให้การออกฤทธิ์ของยาลดลงด้วย (Curtin and Cormican, 2003) ยาไม่สามารถฆ่าเชื้อที่อยู่ชั้นในของไบโอฟิล์มเป็นสาเหตุให้เชื้อที่เจริญของเชื้อแบบไบโอฟิล์มทนต่อยาต้านจุลชีพได้ 100-1000 เท่า (Nikolaev and Plakunov, 2007)

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลจากใบพลูในการฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม พบว่าความเข้มที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อคือ 50 มก./มล. ซึ่งคิดเป็น 4 เท่าของค่า MBC (12.5 มก./มล.) ต่อเชื้อที่เจริญแบบอิสระ เช่นเดียวกันกับสารมาตรฐาน chlorhexidine และ sodium hypochlorite ความเข้มที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อคือ 3.125 และ 25 มก./มล. คิดเป็น 5 เท่าของค่า MBC ต่อเชื้อที่เจริญแบบอิสระ ตามลำดับ ส่วน EDTA นั้นที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ (12.5 มก./มล.) ไม่สามารถฆ่าเชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์มได้ต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้นจึงสามารถฆ่าเชื้อได้ ซึ่งอธิบายได้ว่าการที่เชื้อเจริญแบบไบโอฟิล์มนั้นเป็นกลไกหนึ่ง ซึ่งเชื้อในธรรมชาติมักจะใช้ในการปรับตัวเพื่อการอยู่รอดในสภาวะที่มีอาหารจำกัดหรือ เพื่อทนต่อ host immune defense (Jefferson, 2004) การสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียต้องอาศัยยีนควบคุม การสร้างซึ่งยีนนั้นเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนปกติในสภาวะดังกล่าวข้างต้น (Johnson, 2008) แบคทีเรียที่รวมกลุ่มเกาะกันเป็นไบโอฟิล์มคือมีจำนวนมากกว่า 1,000 ตัว จะทำให้เชื้อสามารถดื้อต่อ phagocytosis, antibody และ antibiotic ซึ่งกลไกการดื้อนี้มีความสัมพันธ์กับการเข้าจับของสารต้านจุลชีพต่อ exo-polysaccharide ซึ่งเป็น matrix ที่ล้อมรอบกลุ่มของแบคทีเรียเกิดได้ช้าลง นอกจากนี้ยังมีการ

ปรับเปลี่ยนของสารอาหารที่อยู่รอบๆ เพื่อใช้ในการทนต่อสารต้านจุลชีพ ปริมาณสารอาหารที่จำกัด ทำให้ลดกระบวนการเมตาบอลิซึม และลดอัตราการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ยาต้านจุลชีพออกฤทธิ์ได้น้อยลง แบคทีเรียส่วนที่อยู่ชั้นในของไบโอฟิล์มมีชั้นป้องกันอย่างแข็งแรง ดังนั้นชั้นนอกของไบโอฟิล์มจึงเป็นชั้นที่ป้องกันส่วนที่อยู่ภายในไม่ให้ถูกทำลาย ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการดื้อยา (Stewart and Costerton, 2001) คุณสมบัติที่สำคัญจากการปรับตัวในการเจริญแบบไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. faecalis* คือ การดื้อต่อน้ำยาฆ่าเชื้อ ดังนั้น ค่า MBC ของการเจริญแบบไบโอฟิล์มจึงสูงกว่าแบบอิสระ สารสกัดเอทานอลจากใบพลูเข้มข้น 50 มก./มล. มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม แต่ต้องใช้เวลาในการสัมผัสสารนานถึง 8 ชม. ในขณะที่ chlorhexidine (3.125 มก./มล.) และ sodium hypochlorite (25 มก./มล.) มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่เวลา 2 และ 4 ชม. ตามลำดับ ทั้งนี้อธิบายได้เช่นเดียวกันคือ การที่ยาต้านจุลชีพจะออกฤทธิ์ได้ต้องใช้เวลาที่มากขึ้นในการแทรกซึมเข้าสู่ชั้นใน เพื่อทำลายเชื้อที่อยู่ในใจกลางของแผ่นไบโอฟิล์ม ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Abdullah et al. (2005) ที่ศึกษาหาระยะเวลาในการสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในคลินิกทันตกรรม คือ 0.2% chlorhexidine 17% EDTA 3% NaOCl ของเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์มเทียบกับเชื้อที่เจริญแบบ planktonic โดยให้เวลาสัมผัสสารนานสูงสุด 60 นาที ซึ่งผลการศึกษาพบว่าในเชื้อที่เจริญแบบอิสระ 0.2% chlorhexidine และ 3% NaOCl สามารถฆ่าเชื้อได้ที่เวลา 15 และ 1 นาที ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์มพบว่า 0.2% chlorhexidine และ 3% NaOCl มีจำนวน colony ของเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญตามเวลาสัมผัสสารที่เพิ่มขึ้นแต่เฉพาะ 3% NaOCl เท่านั้นที่สามารถฆ่าเชื้อได้เมื่อเวลาสัมผัสสารเท่ากับ 2 นาที ซึ่งระยะเวลาที่ได้แตกต่างจากการศึกษาของ Gomes et al. (2001) ที่พบว่า 0.2% chlorhexidine และ 4% NaOCl สามารถฆ่าเชื้อได้เมื่อเวลาสัมผัสสารเท่ากับ 30 วินาที และ 5 นาที ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาในครั้งนี้มีความแตกต่างกัน 0.2%chlorhexidine (3.125 มก./มล.) และ sodium hypochlorite (25 มก./มล.) มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่เวลา 2 และ 4 ชม. ตามลำดับ จะเห็นว่าเวลาในการสัมผัสสารแล้วมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์มที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ มีระยะเวลานานกว่าผลจากการศึกษาทั้งสองดังกล่าวข้างต้น เนื่องจากมีความแตกต่างในหลายๆ ด้าน เช่น จำนวนเชื้อเริ่มต้น วิธีการเตรียมเชื้อแบบไบโอฟิล์ม ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ขั้นตอนและวิธีการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ และการเตรียมสารทดสอบต่างๆ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ TSB เป็นตัวทำละลาย ซึ่งทำให้เชื้อมีแหล่งของอาหาร และความหนืดของสารละลายมีผลต่อการแทรกซึมหรือการออกฤทธิ์ของสารทดสอบด้วย ซึ่งต่างจากการทดลองของ Abdullah และคณะ (Abdullah et al,2005) ที่ใช้สารละลายฟอสเฟตเป็นตัวทำละลาย ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรเลือกตัวทำละลายที่สามารถละลายสารได้ดีที่สุดเพื่อลดปัญหาจากปัจจัยดังกล่าว และเนื่องจากสารสกัดเอทานอลจากใบพลูที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นสารสกัดหยาบ ซึ่งประกอบด้วยสารจำนวนมาก นอกเหนือจากสารสำคัญออกฤทธิ์ จึงทำให้ต้องใช้สารในปริมาณที่สูง ฉะนั้นควรแยกสกัดสารสกัดเอทานอลจากใบพลูเพื่อให้ได้ส่วนสกัดที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นและนำมาศึกษาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัย พร้อมทั้งเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่สำหรับการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

มาลี จงธนากร, ใจนุช กาญจนภู, สุภารัตน์ คำแดง. ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดสมุนไพรต่อ *Enterococcus faecalis* ว.ทันต มหิดล 2551; 28(2): 177-187.

สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์, ณัฐยา ลีลาอภิรดี, พรพิศ เหลาพรม, และคณะ. ผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อเชื้อแบคทีเรียในคลองรากฟัน. ว ทันต. ขอนแก่น 2543; 3(1): 41-46.

แสงอุษา เขมาลีลากุล. เอกสารประกอบการบรรยายเรื่อง "รู้เรื่องสารพันเชื้อเพื่อรักษารอยโรคและการใช้ยาปฏิชีวนะกับการรักษาคลองรากฟัน" 2550.

พัชรียา สมาธิ, เพ็ญโฉม จันทร์หวาน, ภัสพิมล มากคง, และคณะ. ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรไทย. การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 19 ประจำปี 2552.

Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, et al. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medication. *J Endod* 2005; 31(1): 30-36.

Amadioha AC. Fungicidal activity of some plant extracts against rhizoctonia. *Arch Phytopathol Plant Prot* 2001; 33(6): 509-517.

Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, et al. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods* 2007; 68: 605-612.

Curtin J, Cormican M. Measuring antimicrobial activity against biofilm bacteria. *Rev Environ Sci Biol/Technol* 2003; 2: 285-291.

Giardino L, Ambu E, Savoldi E, et al. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Sodium Hypochlorite, MTAD, and Tetraclean Against *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Endod* 2007; 33(7): 852-855.

Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, et al. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodiumhypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis. Int Endod J* 2001; 34: 424-428.

Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa ELT, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102: 247-253.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J App Microbiol* 1999; 86: 985-990.

Harrison JW, Hand RE. The effect of dilution and organic matter on the anti-bacterial property of 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod* 1981; 7: 128-132.

Isabelle PI, Waltimo T, Orstavik D, et al. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without certimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod* 2006; 2: 138-141.

Jefferson KK. Mini review: what drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS microbiol let* 2004; 236: 163-173.

Johnson LR. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *J Theoretic Biol* 2008; 251: 24-34.

Nikolaev YA, Plakunov VK. Biofilm-city of microbes or an analogue of multicellular organism?. *Microbiol* 2007; 76(2): 125-128.

Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis*-the root canal survivor and 'star' in post-treatment disease. *J Endod Top* 2003; 6: 135-159.

Sjogren U, Figdor D, Spangberg L, et al. The antibacterial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int endod J* 1991; 24: 119-125.

Souto R, Paula A, Columbo V. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Arch Oral Biol* 2008; 53: 155-160.

Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilm. *Lancet* 2001; 358: 135-138.

Stuart CH, Schwartz AS, Beeson TJ, et al. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2007; 33(5): 567-569.

Suppakul P, Sanla-Ead N, Phoopuritham P. Antimicrobial and antioxidant activities of betel oil. *Kasetsart J (Nat. Sci.)* 2006; 40: 91-100.

Villasenor IM, Canlas AP, Faustino KM, et al. Evaluation of the bioactivity of tri-pene mixture isolated from Carmona retusa (Vahl.) Masam leaves. *J Ethnopharmacol* 2004; 92: 53-56.

Wang Q, Zhang C, Yin X. Evolution of the bactericidal effect of Er,Cr: YSGG and Nd: YAG lesers in experimentally infected root canals. *J Endod* 2007; 33(7): 830-832.