บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบเกิดจากคราบจุลินทรีย์ ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์จำนวนมากที่จับกลุ่มกันและยึดเกาะที่บริเวณฟัน ขอบเหงือกและใต้เหงือก ซึ่งเรียกว่าไบโอฟิล์ม (biofilm) จุลินทรีย์เหล่านี้ยึดเกาะกับผิวเคลือบฟันและเคลือบรากฟันโดยมีสารโพลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสเป็นตัวช่วยให้เกิดการจับกลุ่มของจุลินทรีย์ และทำให้กลุ่มจุลินทรีย์เหล่านี้ยึดเกาะกับผิวเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน โรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่ต้องได้รับการรักษา เพราะก่อให้เกิดความเจ็บปวดและมีผลกระทบต่อการบดเคี้ยว ซึ่งมีผลต่อสุขภาพโดยรวมของบุคคลนั้น แม้ว่าโรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบจะสามารถป้องกันได้ด้วยการทำความสะอาดช่องปากอย่างสม่ำเสมอและถูกวิธี แต่โรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบยังเป็นปัญหาที่สำคัญยิ่งทางทันตสาธารณสุขของไทย จากรายงานผลการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติ ครั้งที่ 6 พ.ศ. 2549-50 ของกรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุขพบว่า ประชากรร้อยละ 96 มีฟันผุ และร้อยละ 84 มีโรคปริทันต์อักเสบ โดยเฉพาะประชาชนในเขตชนบทที่ห่างไกล ในการรักษาอนามัยช่องปากและป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ ในสมัยโบราณมีวิธีทำความสะอาดฟันโดยใช้กิ่งไม้บางชนิดมาสีฟัน [1] เช่น กิ่งข่อย ซึ่งในปัจจุบันนี้ประชาชนที่อยู่ในถิ่นทุรกันดารและห่างไกลความเจริญบางพื้นที่ยังคงทำความสะอาดฟันโดยการใช้กิ่งข่อยสีฟัน

ข่อยเป็นพืชสมุนไพรในตระกูล Moraceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Streblus asper* Lour หรือ *Streblus lactescens* Blanco หรือ *Carius Lactescens* Blanco ข่อยเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณหลายอย่างเช่น ในอินเดียใช้น้ำต้มจากเปลือกข่อยเป็นยาแก้ไข้ รักษาโรคบิด ท้องร่วง ไซนัส แก้พิษ และฆ่าเชื้อโรคที่บาดแผล [2] ยางจากต้นข่อยสามารถฆ่าเชื้อได้ รากใช้เป็นยาแก้บิด ใช้พอกบริเวณที่เกิดฝีและใช้แก้พิษงู [3] น้ำต้มจากเปลือกใช้ทำความสะอาดบาดแผล รักษาโรคผิวหนัง แก้พยาธิผิวหนัง ยางจากต้นข่อยใช้เป็นยาระงับประสาทและแก้ปวดบวม เมล็ดเป็นยาอายุวัฒนะ แก้ท้องร่วง ริดสีดวง เลือดกำเดา น้ำสกัดจากข่อย ใช้เป็นยาฆ่าเชื้อและช่วยกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติยับยั้งการเกิดมะเร็งอีกด้วย [4]

ในภาคเหนือของไทยใช้ใบข่อยอบไฟให้เหลืองกรอบ ชงน้ำต่างใบชา เพื่อใช้เป็นยาระบายท้อง ขับปัสสาวะ แก้ไตพิการ และเป็นยาบำรุงหัวใจ สำหรับประโยชน์ของข่อยต่อช่องปากที่มีรายงาน เช่น ในอินเดียใช้กิ่งข่อยอ่อนทุบให้นิ่มใช้เป็นไม้สีฟัน ทำให้ฟันแน่นทน ในประเทศอื่นๆใช้น้ำต้มจากเปลือกข่อยต้มกับเกลือ เป็นยาอมแก้เหงือกอักเสบ ในประเทศไทยพบว่ามีการใช้กิ่งข่อยสีฟัน ใช้น้ำยางจากต้นข่อยผสมเกลือใส่ฟันหรือถูบริเวณที่ปวดฟัน เหงือกบวม จะแก้อาการเจ็บปวดได้ [5,6]

ข่อยมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี โดยสามารถฆ่าจุลินทรีย์ในช่องปากและทางเดินอาหารได้ [7] จึงนำมาใช้เป็นยาแก้บิดและท้องร่วง สำหรับแบคทีเรียต่างๆ ที่ยับยั้งการเจริญได้เท่าที่มีรายงานคือ ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดบิด (*Shigella dysenteriae*) ไทฟอยด์ (*Samonella typhi*) [8]

ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ในคลองรากฟันและเชื้อก่อโรคปริทันต์ [9,10] มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อกลุ่ม Streptococci โดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดแผ่นคราบจุลินทรีย์และโรคฟันผุ [7,11-14] นอกจากนี้สารสกัดข่อยยังไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ไม่พบพิษเฉียบพลันเมื่อทดสอบในหนูถีบจักรที่ได้รับสารสกัดจากใบข่อยทางปากหรือฉีดเข้าช่องท้อง ในปริมาณ 50 และ 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม ไม่มีพิษกึ่งเฉียบพลันในหนูขาวเมื่อให้สารสกัดจากใบข่อยทางปากในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม วันละครั้งทุกวันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ [15]

รายงานของนักวิจัยไทยหลายกลุ่มได้พิสูจน์ความสามารถของสารสกัดข่อยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) ทั้งในหลอดทดลอง [7,11,12] และการทดสอบในช่องปาก [11,14] สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์ และคณะ [11] ได้รายงานผลการใช้น้ำบ้วนปากผสมสารสกัดจากใบข่อยในอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ซึ่งพบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ในช่องปากได้ โดยไม่ทำให้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยรวมในช่องปากเปลี่ยนแปลง ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแคลเซียม ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความจุบัพเฟอร์ของน้ำลาย นอกจากนี้ยังพบว่าการบ้วนปากด้วยสารสกัดจากใบข่อยเช้า-เย็นโดยไม่แปรงฟันเป็นเวลา 4 วันติดต่อกัน สามารถลดการอักเสบของเหงือกได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการบ้วนปากด้วยน้ำกลั่น [16]

สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์ และคณะได้ทำการศึกษาต่อเนื่องในอาสาสมัครที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบโดยใช้สารละลายของสารสกัดจากใบข่อยฉีดล้างในร่องลึกปริทันต์ภายหลังการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟัน ก็พบว่าสามารถลดการอักเสบของเหงือก และลดเชื้อก่อโรคปริทันต์ได้ [17] กลุ่มผู้วิจัยจึงได้พัฒนาสารสกัดจากใบข่อยเป็นเจลสำหรับใส่ในร่องลึกปริทันต์ (อนุสิทธิบัตรเลขที่ 2141, พ.ศ. 2548) และทำการทดสอบในอาสาสมัครพบว่ามีความปลอดภัยทางคลินิก สามารถลดการอักเสบของเหงือกและสามารถลดเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส (*Porphyromonas gingivalis*) ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคปริทันต์ได้ [18] เมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ พบว่าสารสกัดจากใบข่อยมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไซโคลออกซีจีเนส-2 (COX-2) และ อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า (IL-1β) ในเซลล์โมโนไซต์ (monocyte) ได้ [19] นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากใบข่อยมีคุณสมบัติในการลดการยึดเกาะของเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*Candida albicans*) ต่อเซลล์เยื่อบุผิวกระพุ้งแก้มและฟันปลอมชนิดอะคริลิก (denture acrylic) ได้ด้วย [20,21]

แม้จะมีรายงานการศึกษาที่พบว่าสารสกัดจากใบข่อยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคฟันผุและโรคปริทันต์ได้ แต่การศึกษาดังกล่าวข้างต้นได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยต่อเชื้อที่อยู่ในรูป planktonic cells ไม่ใช่เชื้อที่อยู่ในรูปแบบไบโอฟิล์ม เนื่องจากมีรายงานการศึกษามากมายที่บ่งชี้ว่า เชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มและเจริญเติบโตอยู่ภายในไบโอฟิล์มมีความต้านทานต่อ antibodies, antibiotics และ antibacterial agents ต่างๆได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดเดียวกันที่อยู่เป็น planktonic cells [22,23] ดังนั้นหากสามารถยับยั้งหรือลดการสร้างไบโอฟิล์มได้ จะสามารถลดการเกิดโรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบหรือทำให้การดำเนินโรคช้าลง โครงการวิจัยที่เสนอนี้เป็นการวิจัยต่อเนื่อง

เพื่อขยายการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยต่อการยับยั้งหรือลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรคในช่องปาก เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาสมุนไพรข่อยเป็นผลิตภัณฑ์ในด้านการรักษาสุขภาพช่องปากในเชิงพาณิชย์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อการยับยั้งหรือลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรคในช่องปาก

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. พยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบและจุลชีพที่เกี่ยวข้อง

โรคปริทันต์อักเสบเป็นสภาวะที่มีการอักเสบของอวัยวะต่าง ๆ ที่รองรับฟัน ซึ่งเชื่อว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในคราบจุลินทรีย์ที่สะสมอยู่ที่ผิวฟันเป็นเวลานาน ในปี ค.ศ. 1976 มีผู้เสนอว่าโรคปริทันต์มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียที่ไม่จำเพาะเจาะจง (non specific plaque hypothesis) ซึ่งนำเสนอโดย Walter Loesche [24] กล่าวว่าโรคปริทันต์มีสาเหตุจากสารพิษซึ่งสร้างจากเชื้อจุลชีพทุกชนิดที่อยู่ในคราบจุลินทรีย์ ขณะเดียวกันก็มีการศึกษาและยืนยันว่าโรคปริทันต์มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียที่จำเพาะ (specific hypothesis) ซึ่งอาจเป็นเชื้อแบคทีเรียตัวใดตัวหนึ่ง หรือกลุ่มของเชื้อที่จำเพาะก็ได้ ดังนั้นจึงมีการค้นคว้าเพื่อศึกษาว่าเชื้อแบคทีเรียตัวใดหรือกลุ่มเชื้อใดที่เป็นสาเหตุที่แท้จริงของโรคปริทันต์ โดยใช้วิธีการต่าง ๆ เข้าช่วยในการศึกษาค้นคว้า เช่น วิธีทางจุลชีววิทยา (microbiology) ชีวเคมี (biochemistry) ตลอดจนวิธีการทางระบบภูมิคุ้มกันวิทยา (immunology)

การศึกษาในปัจจุบันพบว่ามีเชื้อแบคทีเรียมากกว่า 500 ชนิด ที่มีความสามารถเกาะกลุ่ม (colonize) ในคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก [25] การจำแนกลักษณะของเชื้อแบคทีเรียแต่ละกลุ่มนั้นสามารถจำแนกจากปริมาณของเชื้อที่ตรวจพบและชนิดของเชื้อต่าง ๆ ที่อาศัยอยู่รวมกัน Socransky ได้จำแนกเชื้อแบคทีเรียออกเป็นกลุ่มสีต่าง ๆ ด้วยวิธีการตรวจแยกสารดีเอ็นเอ (DNA –hybridization) และพบว่ากลุ่มสีแดงที่ประกอบไปด้วยเชื้อ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส แทเนอเรลลา ฟอไซเทนซิสและเชื้อ ทริปโพนีมา เดนติโคลา (*Treponema denticola)* เป็นกลุ่มที่น่าสนใจ เนื่องจากประกอบไปด้วยเชื้อแบคทีเรียที่สัมพันธ์กับการมีเลือดออกของเหงือก ซึ่งเป็นตัวชี้วัดที่สำคัญทางคลินิกเมื่อมีการทำลายของอวัยวะปริทันต์เกิดขึ้น [26]

การตัดสินว่าเชื้อแบคทีเรียใดเป็นเชื้อก่อโรคปริทันต์นั้น ต้องอาศัยหลักเกณฑ์ในการพิจารณา โดย Scransky และ Haffajee [26] ได้อธิบายถึงเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคปริทันต์นั้นจะต้องมีคุณลักษณะที่มีความสัมพันธ์ต่อตำแหน่งที่เกิดโรค โดยพบมากในตำแหน่งนั้นและพบเชื้อแบคทีเรียได้ก่อนที่จะเกิดการดำเนินของโรค เชื้อก่อโรคสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เมื่อกำจัดเชื้อ

ดังกล่าวแล้วทำให้หายจากโรคปริทันต์ เมื่อทดลองในสัตว์ทดลองต้องแสดงให้เห็นความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบและสามารถทำลายเนื้อเยื่อได้

ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าเชื้อแบคทีเรียที่สัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบประกอบด้วยเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์ แอคทิโนมัยซิเทมโคมิแทนส์และเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส เนื่องจากเชื้อทั้งสองมีความสำคัญในการเกิดโรคปริทันต์อักเสบแบบเรื้อรังและแบบรุนแรง โดยที่เชื้อ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส มีส่วนที่เป็นอันตรายและทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบได้ ได้แก่ส่วนคาร์โบไฮเดรตของผนังเซลล์ (carbohydrate capsule) ซึ่งสามารถป้องกันขบวนการออบโซไนเซชั่น (opsonization) ในระบบคอมพลีเมนท์ (complement) ทำให้สามารถต่อต้านการกลืนกินของเซลล์ (phagocytosis) และการฆ่าโดยเซลล์นิวโทรฟิลล์ได้และยังมีไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่ไม่เป็นพิษแต่สามารถยับยั้งขบวนการเคโมแทซีส (chemotaxis) นอกจากนั้นมีเมมเบรน เวสซิคัล (membrane vesicle) ไว้สำหรับเก็บเอ็นไซม์โปรติเอส (protease) ซึ่งเอนไซม์นี้ทำให้มีการลดระดับของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) คอมพลีเมนท์และเส้นใยคอลลาเจนส่วนอันตรายที่เกิดจากเชื้อ แอกกริเกทิแบกเทอร์ แอคทิโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ คือ ลิวโคทอกซิน (leucotoxin) ซึ่งเป็นไซโทไลซิน (cytolysins) ชนิดหนึ่ง ทอกซินนี้จะเข้าไปรบกวนทั้งระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (nonspecific immune response) และระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของร่างกาย (specific immune response) ทำให้เซลล์บวมและมีการรั่วซึม และยังมีไลโพโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งทำให้เกิดการละลายตัวของกระดูกเบ้าฟันและขัดขวางการทำงานของเซลล์นิวโทรฟิลล์ได้ [27]

2. ไบโอฟิล์ม (Biofilm)

ไบโอฟิล์ม ประกอบด้วยโคโลนีขนาดเล็ก (microcolonies) จำนวนมากของแบคทีเรียประมาณ 15-20 % โดยปริมาตร และโคโลนีขนาดเล็กในไบโอฟิล์มมีการรวมตัวกันของแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ ซึ่งกระจายอยู่ในโครงสร้างของไบโอฟิล์ม (matrix) หรือ ไกลโคแคลลิกซ์ (glycocalyx) ซึ่งมี 75-80% โดยปริมาตรของไบโอฟิล์ม และภายในไบโอฟิล์มมีช่องว่าง (water channel) ระหว่าง โคโลนีขนาดเล็ก ซึ่งเป็นทางผ่านของสารอาหารหรือสารอื่น ๆ เป็นระบบไหลเวียน เพื่อที่สารอาหารจะแพร่กระจายจากช่องว่างไปที่โคโลนี นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะของไบโอฟิล์มมีหลากหลายรูปแบบ ซึ่งรูปแบบเหล่านี้ถูกกำหนดโดยแรงเฉือน (shear force) ของการไหลผ่านของของเหลวในไบโอฟิล์ม เช่นหากมีแรงเฉือนต่ำ (low shear force) ทำให้ไบโอฟิล์ม มีลักษณะแท่งและบานเป็นดอกเห็ด ส่วนแรงเฉือนมาก (high shear force) ทำให้ไบโอฟิล์ม มีลักษณะยื่นยาว [28]

โรคปริทันต์เป็นโรคติดเชื้อมีสาเหตุจากเชื้อจุลชีพ (micro-organism) ที่อยู่ในคราบจุลินทรีย์ซึ่งเกาะกลุ่ม (colonize) บนผิวฟันหรือใต้ขอบเหงือก คราบจุลินทรีย์ประกอบด้วยจุลชีพ 70% อีก 30% เป็นสารไกลโคโปรตีนของน้ำลายหรือน้ำเหลืองเหงือก เซลล์ตายของเยื่อบุผิว ชีวพิษคายออก (exotoxin) ของเชื้อจุลชีพและเม็ดเลือดขาว เชื้อจุลชีพเหนือเหงือกจะยึดกับเคลือบฟัน (enamel) และเยื่อบุผิวช่องปาก ส่วนจุลชีพใต้เหงือกจะยึดกับเคลือบรากฟันและเยื่อบุผิวร่องลึกปริทันต์ หรือลอยตัวอยู่ในน้ำเหลืองเหงือก นอกจากนี้

จุลชีพใต้เหงือกอาจแทรกซึมเข้าในเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) และท่อเนื้อฟัน (dentinal tubule) ได้

จากการศึกษาทางจุลชีววิทยาของคราบจุลินทรีย์ จุลชีพกลุ่มแรกที่พบเป็นชนิดสเตร็ปโตคอกคัส แซงกิส (*Streptococcus sanguis*) สเตร็ปโตคอกคัสไมทิส (*Streptococcus mitis*) และแอกทิโนไมซิส (*Actinomyces*) หลังจากนั้น 1-2 วันจะพบจุลชีพใช้ออกซิเจน (aerobe) และจุลชีพไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobe) ชนิดรูปกลม (coccus) ติดสีแกรมลบ และรูปแท่ง (rod) ติดสีแกรมบวกและแกรมลบ มากกว่าจุลชีพรูปกลมติดสีแกรมบวก ต่อมาในวันที่ 2 - 4 พบจุลชีพรูปเส้น (filament) และจุลชีพรูปกระสวย (fusiform) และติดสีแกรมลบมากกว่าแกรมบวก แต่จุลชีพรูปกลมลดลง เมื่อถึงวันที่ 5-10 พบจุลชีพรูปเกลียว (spiral) เพิ่มขึ้น และจุลชีพไม่ใช้ออกซิเจนเป็นส่วนใหญ่ ปัจจุบันได้เรียกจุลชีพที่อยู่รวมกันในคราบจุลินทรีย์ว่า ไบโอฟิล์ม

3. การใช้สมุนไพรในการรักษาโรคในช่องปากและโรคปริทันต์

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีสมุนไพรไทยหลายชนิดที่ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดได้ โดยได้มีผู้ทำการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของยาสีฟันสมุนไพร ปณิดา อินนาจันทร์ และคณะ [29] ศึกษาถึงประสิทธิภาพของยาสีฟันทั่วไปและยาสีฟันสมุนไพรทั้งไทยและต่างประเทศในการยับยั้งเชื้อสเตร็บโตคอกคัส มิวแทนส์ พบว่ายาสีฟันแต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไม่แตกต่างกัน ทำนองเดียวกัน Moran และ Addy [30] ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของยาสีฟันบางชนิดที่ขายในท้องตลาด พบว่ายาสีฟันเกือบทั้งหมดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ ยกเว้นยาสีฟันที่มีส่วนผสมของเอมีนฟลูออไรด์ Mullally [31] ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของยาสีฟันสมุนไพรในการควบคุมคราบจุลินทรีย์และเหงือกอักเสบ เปรียบเทียบกับยาสีฟันทั่ว ๆ ไป พบว่ายาสีฟันสมุนไพรกับยาสีฟันที่ผสมฟลูออไรด์มีประสิทธิภาพในการลดคราบจุลินทรีย์และเหงือกอักเสบไม่แตกต่างกัน การที่ยาสีฟันสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้นั้น นอกจากจะเป็นผลมาจากส่วนประกอบในยาสีฟันที่มีฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายเชื้อดังที่กล่าวไปแล้วนั้น ความเข้มข้นของยาสีฟันและระยะเวลาที่ยาสีฟันสัมผัสกับเชื้อก็เป็นปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของยาสีฟันด้วยเช่นกัน มีหลายการศึกษาที่พยายามหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของยาสีฟันที่จะใช้ในการแปรงฟันและเวลาที่เหมาะสมในการแปรงฟัน เช่นการศึกษาของบุญนิตย์และเทอดพงษ์ [32] ได้ทำการศึกษาพบว่าองค์ประกอบของยาสีฟันมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส มิวแทนส์ โดยส่วนประกอบที่เป็นดีเทอร์เจนต์ (detergent) ได้แก่โซเดียมลารีลซัลเฟต (sodium laryl sulfate) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เป็นประจุลบสามารถยึดเกาะกับโมเลกุลของโปรตีนได้ดีและเป็นสารที่นิยมผสมในยาสีฟันกันมาก และยังพบว่าการใช้ยาสีฟัน 0.5 กรัม หรือยาวประมาณ 1 เซนติเมตร น่าจะเพียงพอในการลดเชื้อสเตร็ปโตคอกคัส มิวแทนส์ ในช่องปากลงได้ นอกจากการศึกษาเกี่ยวกับยาสีฟันสมุนไพรชนิดต่าง ๆ แล้ว ยังมีรายงานที่พบว่าสมุนไพรหลายชนิดมีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ กานพลู กระเทียม กระเจี๊ยบ คูณ ทับทิม บัวบก ผักคราดหัวแหวน พญายอ ฟ้าทะลายโจรและมะระขี้นก นอกจากนี้สมุนไพรบางชนิด เช่น ผักคราดหัวแหวนทั้งต้นใช้รักษาอาการปวดเหงือกและฟันได้ ส่วนพญายอมีการใช้แอลกอฮอล์สกัดสารจากใบ

พบว่ามีฤทธิ์ลดการอักเสบ สารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านไวรัสที่ทำให้เกิดโรคเริมที่อวัยวะเพศและริมฝีปาก ใบของฟ้าทะลายโจรใช้ลดการอักเสบ เพิ่มการหลั่งน้ำลาย

4. สมุนไพรข่อย

4.1 ข้อมูลทั่วไปด้านพฤกษศาสตร์และเภสัชวิทยา

ข่อยเป็นพืชในวงศ์ Moraceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Streblus asper* Lour หรือ *Streblus lactescens* Blanco หรือ *Carius lactescens* Blanco [8] ชื่ออื่น ๆ ที่รู้จักได้แก่ Bra-Inka, Bernikka, Koi, Rudi Schwri, Serut, Shakotaka ชื่อพื้นเมืองคือ ส้มพอ (เลย), สะนาย (เขมร), ตองบะแน่ (กะเหรี่ยง) ข่อยเป็นไม้ยืนต้นที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ มีลำต้นสูง 5 - 15 เมตร ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปไข่ รูปวงรี กว้าง 2-4 เซนติเมตร ผิวใบสาก ดอกช่อ ออกที่ซอกใบ แยกเพศอยู่คนละต้น ช่อดอกตัวผู้เป็นช่อกลม ก้านสั้น ช่อดอกตัวเมียออกเป็นกระจุก ก้านดอกค่อนข้างยาว มี 2 – 4 ช่อ มีสีเหลืองแกมเขียวหรือเกือบขาว ผลสดเป็นรูปไข่ เมื่อสุกสีเหลือง ผลยาว 8 – 10 มิลลิเมตร เปลือกของผลจะอ่อนนุ่ม เมล็ดลักษณะคล้ายพริกไทยสีขาวยาว 5 – 6 มิลลิเมตร ข่อยพบได้ทั่ว ๆ ไป ตามพื้นที่ราบ พบตามป่าเบญจพรรณ เจริญได้ดีตามริมแม่น้ำลำคลอง ตลอดจนที่ลุ่มและชื้นแฉะ ทนต่อสภาพดินฟ้าอากาศได้ดี แต่การเจริญช้ากว่าพืชอื่น ๆ ข่อยเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดตั้งแต่อินเดีย ประทศจีนตอนใต้ ตะวันออกของหมู่เกาะฟิลิปปินส์ มาเลเซีย พม่า ไทย ข่อยมีการปลูกแพร่หลายในประเทศไทย นิยมมาปลูกเป็นไม้ประดับหรือสร้างเป็นรั้วบ้านมากกว่าประโยชน์ด้านสมุนไพร

ข่อยเป็นพืชที่นำมาใช้ประโยชน์ทางด้านสมุนไพรหลายประเทศด้วยกัน เช่นในอินเดียใช้น้ำต้มจากเปลือกข่อยเป็นยาแก้ไข้ โรคบิด และท้องร่วง รักษาไซนัส และแก้พิษ ยางจากต้นข่อยสามารถฆ่าเชื้อได้ รากใช้เป็นยาแก้บิดและใช้พอกบริเวณที่เกิดฝี ชาวฮินดูใช้กิ่งข่อยสีฟันทำให้ฟันทนทานและใช้ฆ่าแมลง ส่วนในประเทศอื่น ๆ ได้นำใบข่อยไปใช้ทำความสะอาดเครื่องมือเครื่องใช้ต่าง ๆ น้ำต้มจากเปลือกใช้ทำความสะอาดแผลและรักษาโรคผิวหนัง ยางจากต้นข่อยใช้แก้ปวดประสาทหรือเป็นยาระงับประสาทและแก้ปวดบวม เมล็ดใช้แก้ท้องร่วง ริดสีดวง และเลือดกำเดา รากใช้แก้ลมบ้าหมู น้ำสกัดจากข่อยใช้เป็นยาฆ่าเชื้อและช่วยกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติยับยั้งการเกิดมะเร็งอีกด้วย สำหรับในประเทศไทยนั้นได้มีการใช้ประโยชน์จากข่อยกันมาก เช่น ในแถบจังหวัดเชียงใหม่ ใช้แก่นข่อยหั่นเป็นฝอยเล็ก ๆ มวนเป็นบุหรี่สูบแก้ริดสีดวงจมูก ในภาคเหนือใช้ใบข่อยอบไฟให้เหลืองกรอบ ชงน้ำต่างใบชาเพื่อใช้เป็นยาระบายท้องอ่อน ๆ ขับปัสสาวะ แก้ไตพิการและเป็นยาบำรุงหัวใจ เมล็ดรับประทานเป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงธาตุ เจริญอาหาร แก้ท้องอืดท้องเฟ้อและขับลม เปลือกต้นข่อยแก้พิษในกระดูกและเส้นเอ็น แก้โรคฟัน โรคผิวหนังและริดสีดวงทวาร เนื้อต้นข่อยแก้ริดสีดวงจมูก รากต้นข่อยช่วยรักษาบาดแผลให้แห้ง นอกจากนี้ยังนำเปลือกต้นข่อยใช้ทำกระดาษเรียกว่าสมุดข่อย กระดาษและสมุดนี้เก็บไว้ได้นานถึง 100 ปี โดยแมลงไม่กัดกิน เพราะเปลือกข่อยมีฤทธิ์เบื่อเมาจึงฆ่าแมลงได้ นอกจากนี้น้ำยางต้นข่อยผสมเกลือใส่ที่ฟันหรือถูบริเวณที่ปวดฟันหรือเหงือกบวมจะแก้อาการเจ็บปวดนี้ได้ [5,6]

4.2 สารเคมีที่สำคัญในข่อย

สารเคมีที่สำคัญที่พบในข่อยจะแตกต่างกันไปตามวิธีการสกัด [7] วิธีที่ใช้ในการสกัดสารเท่าที่มีรายงาน ได้แก่ การสกัดด้วยไดเอธิลอีเธอร์และโครมาโตกราฟี สำหรับสารเคมีต่าง ๆ ที่ได้ มีดังนี้

1. แอสเปอร์โรไซด์ มีสูตรโมเลกุล C_{31} H_{48} O_9 มีชื่อทางเคมีว่า 3 – digitoxigenin – 2, 3 – di – O – methyl – D – glycopyranoside

2. สเตรบโบลไซด์ มีสูตรโมเลกุล C_{31} H_{46} O_{10} มีชื่อทางเคมีว่า 3 – strophanthidin – 2, 3 – di – O – methyl – D – fucopyranoside)

3. คามาโลไซด์ มีสูตรโมเลกุล C_{31} H_{48} O_9

4. อินโดรไซด์ มีสูตรโมเลกุล C_{31} H_{46} O_{10}

5. ลัคค์โนไซด์ มีสูตรโมเลกุล C_{31} H_{46} O_{10}

นอกจากนี้ยังมีสารที่ยังวิเคราะห์ไม่ได้อีกหลายชนิด ซึ่งมีสูตรโมเลกุลเป็น C_{31} H_{48} O_{10} , C_{31} H_{46} O_{10}

ข่อยนอกจากจะมีประโยชน์ดังกล่าวมาแล้วยังอาจทำให้เกิดอันตรายได้เช่นกัน จากการเตรียมสารสกัดจากข่อยแล้วฉีดเข้าเส้นเลือดของแมวจะมี LD_{50} เท่ากับ 10.5 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักแมว 1 กิโลกรัม ถ้าหากนำสารอัลฟาและเบต้า – อันแซททูเรเตตแลคโตน ที่ได้จากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ฉีดเข้าหนู จะมี LD_{50} เท่ากับ 4.8 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยสารนี้จะมีผลต่อกล้ามเนื้อเรียบและกล้ามเนื้อหัวใจ ตลอดจนมีผลต่อระดับความดันโลหิต หนูจะมีอาการชักกระตุกก่อนตาย [8]

4.3 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยต่อเชื้อจุลชีพ

ข่อยมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อจุลชีพได้ดี โดยสามารถฆ่าจุลชีพในช่องปากและทางเดินอาหารได้จึงนำมาใช้เป็นยาแก้บิดและท้องร่วง [33] สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่สารสกัดจากใบข่อยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดีเท่าที่มีรายงาน ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคบิด (*Shigella dysenteriae*) และไทฟอยด์ (*Salmonella typhi*) [7]

เทอดพงษ์ ตรีรัตน์ และ บุญนิตย์ ทวีบูรณ์ [32] พบว่าสารสกัดจากใบข่อยใน 100 % เอธานอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในกลุ่มสเตร็ปโตคอกคัส ได้แก่ เชื้อ *S. mutans* และ *S. salivarius*

จากการศึกษาผลของการใช้ยาสีฟันที่ผสมสารสกัดจากใบข่อยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* ในน้ำลาย โดยสมเกียรติ เหลืองไพรินทร์ & สุรัตน์ ลีนะศิริมากุล [14] พบว่าเมื่อใช้ยาสีฟันที่ผสมสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.2 โดยน้ำหนัก ในการแปรงฟันวันละ 2 ครั้ง สามารถลดจำนวนเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญภายในสัปดาห์ที่ 1 และ 3 ตามลำดับ และจำนวนเชื้อจะเพิ่มขึ้นเมื่อหยุดใช้ ยาสีฟันผสมสารสกัดจากใบข่อย สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์ และคณะ [11] ได้ทดสอบผลการใช้น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการบ้วนปากด้วยน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดจากใบข่อยสามารถลดเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ในช่องปากได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการบ้วนปากด้วยน้ำกลั่น โดยไม่ทำให้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยรวมในช่องปากเปลี่ยนแปลงและไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแคลเซียม ค่าความเป็นกรด-ด่างและความจุบัพเฟอร์ของน้ำลาย อีก

ทั้งการศึกษาในลำดับต่อมาในปี ค.ศ. 2002 [10] ศึกษาผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเชื้อจุลชีพที่เจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน 5 ชนิดในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส, พรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย, แอกติโนมัยซิส นาสลันดิอัย (*Actinomyces naeslundii*), แอกกริเกติแบคเตอร์ แอกติโนมัยซิเทมคอมิแทนส์ และเป็ปโตสเตร็ปโตคอคคัส ไมครอส (*Peptostreptococcus micros*) โดยการแพร่ของสารสกัดผ่านกระดาษกรอง ผลการศึกษาพบว่า การใช้สารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 250 และ 500 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ทั้ง 5 ชนิด จากผลการทดลองแสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส แอกกริเกติแบกเทอร์ แอกติโนมัยซิเทมคอมิแทนส์, เป็ปโตสเตร็ปโตคอคคัส ไมครอส, พรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย และแอกติโนมัยซิส นาสลันดิอัย คือ 3.91, 7.81, 15.62, 31.25 และ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส แอกกริเกติแบคเตอร์ แอกติโนมัยซิเทมคอมิแทนส์ และเป็ปโตสเตร็ปโตคอคคัส ไมครอส คือ 31.25, 15.62, 62.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แต่ไม่สามารถทำลายเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย และแอกติโนมัยซิส นาสลันดิอัย

4.4 ตำรับเจลผสมสารสกัดจากใบข่อย ความปลอดภัยทางคลินิกและผลทางคลินิก

จากการศึกษาของอัญชนา ลุนพรม [34] ซึ่งเป็นงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาตำรับเจลผสมสารสกัดจากใบข่อยเพื่อนำมาใช้ร่วมกับการรักษาโรคปริทันต์อักเสบ และการทดสอบความปลอดภัยทางคลินิกในอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดข่อยที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแอกกริเกติแบกเทอร์ แอกติโนมัยซิเทมคอมิแทนส์ (MIC) มีค่าเท่ากับ 7.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของสารสกัดข่อยที่น้อยที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อแอกกริเกติแบกเทอร์ แอกติโนมัยซิเทมคอมิแทนส์ (MBC) มีค่าเท่ากับ 15.62 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และผลการทดสอบความปลอดภัยในการใช้ทางคลินิกในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 40 คน โดยได้ทำการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาของเจลผสมสารสกัดจากใบข่อยกับผิวหนัง (skin irritation test) พบว่าค่าความแดงของผิวหนังบริเวณที่ทดสอบเปรียบเทียบกับผิวหนังปกติพบความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่พบความผิดปกติหรืออาการไม่พึงประสงค์ใด ๆ เกิดขึ้นกับอาสาสมัคร นอกจากนี้เมื่อทดสอบความปลอดภัยทางคลินิกโดยการใส่เจลผสมสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นร้อยละ 24 ลงในร่องเหงือกของอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบและมีสุขภาพแข็งแรงภายในช่วงเวลา 6 สัปดาห์ ผลการศึกษายืนยันว่า ไม่พบอาการข้างเคียงหรืออาการไม่พึงประสงค์ใด ๆ ในผู้ป่วย ระดับการเจ็บเหงือกและระดับการเสียวฟันมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ จึงสรุปได้ว่า เจลผสมสารสกัดจากใบข่อยมีความปลอดภัยทางคลินิก

จากการศึกษาของอรวรรณ อภินทนาพงศ์ [18] ซึ่งเป็นการศึกษาเกี่ยวกับความปลอดภัยทางคลินิกผลทางคลินิกและทางจุลชีววิทยาของการใช้เจลผสมสารสกัดจากใบข่อยใส่ลงในร่องลึกปริทันต์ร่วมกับการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง ผลการศึกษาพบว่าไม่มีอาการข้างเคียงใด ๆ ในอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่ม และค่าความลึกของร่องลึกปริทันต์ ระดับการยึดเกาะอวัยวะปริทันต์ ร้อยละการมี

เลือดออกของเหงือก มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 6 และ 12 เมื่อเปรียบเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 ในอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่ม และกลุ่มที่ขูดหินน้ำลายเกลารากฟันร่วมกับการใช้เจลผสมสารสกัดจากใบข่อยสามารถลดเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสได้อย่างมีนัยสำคัญที่สัปดาห์ที่ 6 และ 12 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันเพียงอย่างเดียว

ระเบียบวิธีการวิจัยและอุปกรณ์การวิจัย

1. อุปกรณ์การวิจัย

1. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Applied Biosystem 7500 Fast Instrument, PE Applied bisystem, USA)
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (Hermle Z200A, Hermle Labortechnik, Germany)
3. Vortex mixer (vortex-genie 2^{TM}, Scientific industrial, USA)
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
5. เครื่องเสียงความถี่สูง (Ultrasonic disintegrator) (MSE Ltd., London, UK)
6. เครื่อง shaker (Shaker 25, Compact Rocker, National Labnet Company, USA)
7. หลอดทดลอง (test tube) และชั้นวางหลอดทดลอง
8. ปิเปตอัตโนมัติขนาดเล็ก (semiautomatic micropipette) และ plastic tip
9. ตู้อบ (Incubator)
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
11. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol lamp)
12. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
13. เครื่องชั่งสาร
14. เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ (beaker) ขวดรูปชมพู่ (flask) กระบอกตวง (cylinder)
15. ตู้ดูดอากาศ (hood)
16. เครื่องกรองจุลินทรีย์
17. นาฬิกาจับเวลา
18. ชุดตรวจประกอบด้วย กระจกส่องปาก (mouth mirror) ที่คีบสำลี (cotton plier) และเอ็กซพลอเรอร์ EXD 5 (Hu –friedy , Chicago, Illinois, USA)
19. เครื่องมือตรวจปริทันต์ (periodontal probe) ชนิด PCPUNC 15 (Hu- friedy, Chicago, Illinois, USA)
20. กระดาษรูปกรวย (paper point) และสำลีที่ปราศจากเชื้อ

เคมีภัณฑ์

1. Ringer solution
2. Thioglycolate medium
3. Trypticase-soy broth
4. Instagene mixer (BIO_RAD®)
5. ชุดพีซีอาร์ (applied biosystem™, USA)
6. TaqMan® Gene Expression Assays
7. Tween 80
8. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer)
9. Ethyl alcohol

2. ระเบียบวิธีวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย

ได้นำเสนอโครงร่างวิจัยเพื่อขอรับการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรคในช่องปากในการศึกษานี้จะใช้รูปแบบของไบโอฟิล์มใต้เหงือกในหลอดทดลอง (in vitro subgingival biofilm model) ตามวิธีที่รายงานโดย Sedlacek และคณะ [35] ซึ่งนำคราบจุลินทรีย์และน้ำลายจากอาสาสมัครมาสร้างไบโอฟิล์มในหลอดทดลอง

2.1 การคัดเลือกอาสาสมัคร (subjects)

อาสาสมัครในการศึกษานี้ เป็นผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบที่เข้ามารักษาในคลินิกภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 5 คน

ข้อกำหนดในการคัดเลือกของอาสาสมัคร (inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังของภาควิชา ปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2. มีฟันที่มีร่องลึกปริทันต์ ตั้งแต่ 5 มิลลิเมตร อย่างน้อย 4 ซี่ ยกเว้นฟันกรามแท้ซี่ที่สาม
3. มีสุขภาพดีไม่มีโรคทางระบบ
4. มีอายุอยู่ในช่วง 20-60 ปี
5. มีความเต็มใจในการเข้าร่วมโครงการวิจัย

ข้อกำหนดในการคัดเลือกออกของอาสาสมัคร(Exclusion criteria)

1. มีโรคทางระบบ
2. ได้รับยาปฏิชีวนะหรือยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่กลุ่มสเตียรอยด์ (NASID) เพื่อการรักษาอื่นๆ ในช่วงเวลา 3 เดือน ที่ผ่านมา
3. สูบบุหรี่
4. อยู่ในภาวะตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร
5. ได้รับน้ำยาบ้วนปากที่เป็น antiseptic ในช่วง 3 เดือน ที่ผ่านมา
6. ได้รับการใส่ยาหรือสารใด ๆ ลงไปในร่องเหงือกในช่วง 6 เดือนที่ผ่านมา
7. มีประวัติแพ้สารสกัดจากใบข่อยและน้ำมันตะไคร้
8. ใส่เครื่องมือจัดฟันหรือฟันปลอม

อาสาสมัครได้รับการตรวจช่องปากโดยผู้วิจัยคนเดียวตลอดการศึกษา อาสาสมัครที่ถูกคัดเลือกจะถูกเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์และน้ำลาย ตามวิธีซึ่งจะกล่าวต่อไปในหัวข้อ 2.3 และ 2.4 หลังจากเก็บคราบจุลินทรีย์ และน้ำลายแล้ว อาสาสมัครได้รับการแนะนำวิธีดูแลอนามัยช่องปาก จากนั้นอาสาสมัครได้รับการขูดหิน น้ำลายทั้งปาก

2.2 การวัดค่าทางคลินิก

อาสาสมัครแต่ละคนจะได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยให้ทราบถึงรายละเอียดของงานวิจัย พร้อมทั้งลงชื่อแสดงความยินยอมก่อนการเข้าร่วมวิจัย จากนั้นผู้วิจัยจะทำการตรวจช่องปากเพื่อวัดค่าทางคลินิกดังนี้

2.2.1 ความลึกร่องลึกปริทันต์ (probing depth, PD)

วัดโดยการใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์ชนิด PCPUNC 15 ของบริษัท Hu-Fridy (Chicago, USA) เป็นค่าจากขอบเหงือกถึงจุดลึกสุดของร่องลึกปริทันต์เป็นมิลลิเมตร โดยวัด 6 ตำแหน่งในฟันแต่ละซี่ คือ ด้านใกล้กลางใกล้แก้ม (mesio – buccal) ด้านกึ่งกลางใกล้แก้ม (mid-buccal) ด้านไกลกลางใกล้แก้ม (disto-buccal) ด้านใกล้กลางใกล้ลิ้น (mesio – lingual) ด้านกึ่งกลางใกล้ลิ้น (mid-lingual) ด้านไกลกลางใกล้ลิ้น (disto-lingual) วัดเฉพาะฟันที่ทำการเก็บคราบจุลินทรีย์

2.2.2 การสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ (clinical attachment loss, CAL)

วัดโดยใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์ วัดจากรอยต่อของเคลือบรากฟันถึงจุดลึกสุดของร่องลึกปริทันต์ ทั้ง 6 ตำแหน่งในฟันแต่ละซี่ที่ทำการเก็บคราบจุลินทรีย์

2.3 การเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์จากอาสาสมัคร

เก็บคราบจุลินทรีย์จากอาสาสมัคร โดยสอดกระดาษรูปกรวย (paper point) 1 อันที่ปราศจากเชื้อ ลงในร่องเหงือก แล้วลากในแนวขนานกับผิวฟัน จากนั้นนำออกมาใส่ใน thioglycolate medium ที่มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปทำให้คราบจุลินทรีย์กระจายตัวออกโดยผ่านเครื่องเสียงความถี่สูง (sonically dispersed) 30 วินาที ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.4 การเก็บน้ำลาย

เก็บน้ำลายแบบไม่กระตุ้น (unstimulated saliva) โดยให้อาสาสมัครกลั้วปากด้วยน้ำก่อน จากนั้นเก็บน้ำลายทุกๆ 1 นาทีในบีกเกอร์ที่ปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำน้ำลายไปเจือจาง (1:10) ด้วย Ringer solution ที่มี 0.05% cysteine จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 2,000xg, 4°C เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่เป็นน้ำใส (supernatant) ไปผ่านเครื่องกรองขนาด 0.2 ไมครอนเพื่อให้ปลอดเชื้อ

2.5 การตรวจหาปริมาณเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ และพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในคราบจุลินทรีย์โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase Chain Reaction, PCR)

นำคราบจุลินทรีย์ส่วนหนึ่งจากที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3 มาแยกสกัดดีเอ็นเอแล้วตรวจหาปริมาณเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ และพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ตามวิธีที่รายงานโดย Hata และคณะในปี 2006 [36] Ashimoto และคณะในปี 1996 [37]

<u>วิธีการ</u>

(1) นำคราบจุลินทรีย์ส่วนหนึ่งจากที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3 มาใส่ในไมโครเซ็นติฟิว ทิวบ์

(2) ปั่นเหวี่ยงไมโครเซ็นติฟิว ทิวบ์ ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

(3) นำน้ำส่วนบนทิ้งไป โดยไม่กระทบกระเทือนตะกอน (pellet) ด้านล่าง แล้วเติม อินสตาจีน มิกเซอร์ (Instagene mixer) ลงไป 120 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปอุ่นที่ 56 °C เป็นเวลา 15-30 นาที

(4) นำไปเขย่าเป็นเวลา 10 วินาที และต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 8 นาที

(5) นำไปเขย่าเป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-3 นาที ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะนำมาเป็น ดีเอ็นเอ ต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์

(6) เตรียมสารที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามคำแนะนำของผู้ผลิตชุดพีซีอาร์

(7) เลือกคู่ไพร์เมอร์ (primer pair) ดังแสดงในตารางที่ 1 เลือกอุณหภูมิและจำนวนรอบตามวิธีที่รายงานโดย Hata และคณะในปี 2006 [36] Ashimoto และคณะในปี 1996 [37] ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 5 ไมโครลิตร โดยใช้วงจรเริ่มต้น (initial cycle) อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ 36 รอบ ซึ่งประกอบด้วย 1) 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 2) อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที 3) 72องศาเซลเซียส 2 นาที และใช้อุณหภูมิสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

(8) นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ มาวิเคราะห์ในอะกาโรสเจล อิเล็คโตรโฟลิซิสร้อยละ 1.5

ตารางที่ 1 แสดงคู่ไพร์เมอร์ และลำดับเบสของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ และพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส

Bacteria	Sequence of primer (5´-3´)	Amplicon size (bp)
S. mutans	5'-AGCCATGCGCAATCAACAGGTT-3' 5'-CGCAACGCGAACATCTTGATCAG-3'	415
P.gingivalis	5'-CCTACGTGTACGGACAGAGCTATA-3' 5'-AGGATCGCTCAGCGTAGCATT-3'	71

2.6 การเตรียมสารสกัดจากใบข่อย

เตรียมสารสกัดใบข่อยตามวิธีที่รายงานโดยสุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์และคณะ [11] โดยการนำใบข่อยแห้งบดให้ละเอียด และแช่ใน 50% เอธานอลเป็นเวลา 1 สัปดาห์ กวนส่วนผสมนี้เป็นระยะ แยกส่วนใสออกโดยการกรองและการปั่นเหวี่ยง กำจัดเอธานอลในส่วนที่เป็นสารละลายโดยการระเหยในเครื่อง rotar evaporator และระเหิดแห้งโดยเครื่อง lyophilizer

เตรียมสารละลายจากสารสกัดจากใบข่อย โดยการละลายสารสกัดข่อยในน้ำกลั่น นำสารละลายที่ได้ผ่านเครื่องเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 15 นาทีเพื่อให้การละลายสมบูรณ์ขึ้น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,400 rpm. ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายที่ได้ผ่านเครื่องกรองขนาด 0.2 ไมครอนเพื่อให้ปลอดเชื้อ เก็บสารละลายนี้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 10°C

2.7 การศึกษาผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรคในช่องปาก

การทดสอบจะทำตามวิธีที่รายงานโดย Walker และคณะ [38] โดยจะมีการปรับวิธีการมาศึกษาใน 96-well flat-bottomed microtitre plate การเตรียม microtitre plate ทำตามวิธีที่รายงานโดย Rukayadi และคณะ [39] คือนำ 10% ของน้ำลายที่เตรียมไว้ในข้อ 2.4 มาใส่ใน 96-well flat-bottomed microtitre plate ในปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปเขย่าเบาๆที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ดูดน้ำลายที่เหลือในแต่ละหลุมออก ทิ้ง plate ไว้ค้างคืนเพื่อให้แห้ง (air-dried)

นำ microtitre plate ที่เตรียมไว้มาทำการทดสอบผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม โดยทำการทดสอบ 2 model

<u>Model 1</u>

นำสารสกัดจากใบข่อย ที่มีความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (trypticase-soy broth) ให้มีความเข้มข้นลดลงทีละสองเท่า (two fold serial dilution) ใน

microtitre plate โดยให้มีปริมาตรในแต่ละหลุม = 150 ไมโครลิตร หลุมที่เป็นหลุมควบคุม ใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเติมคราบจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3 ลงไปในปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปเพาะเลี้ยงใน anaerobic chamber ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2, 4 และ 8 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 2 วัน

<u>หมายเหตุ</u> ใช้ microtitre plate 2 ชุดในแต่ละวัน

<u>Model 2</u>

นำสารสกัดจากใบข่อย ที่มีความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (trypticase-soy broth) ให้มีความเข้มข้นลดลงทีละสองเท่า (two fold serial dilution) ใน microtitre plate โดยให้มีปริมาตรในแต่ละหลุม = 150 ไมโครลิตร หลุมที่เป็นหลุมควบคุม ใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเติมคราบจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3 ลงไปในปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปเพาะเลี้ยงใน anaerobic chamber ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2, 4 และ 8 วัน โดยทุก 2 วัน จะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่างๆดังเช่นที่เตรียมในวันแรก

<u>หมายเหตุ</u> ใช้ microtitre plate 2 ชุดในแต่ละวัน

เมื่อครบเวลา 2, 4 และ 8 วัน ของการทดสอบทั้งสองแบบ นำ microtitre plate ทั้ง 2 ชุด มาทำการหาปริมาณของไบโอฟิล์มยกเว้นแถว D_{1-12} และ H_{1-12} โดยดูดสารละลายในแต่ละหลุมออก แล้วล้างแต่ละหลุมด้วย 50 mM PBS (pH 7.2) ที่ปราศจากเชื้อ (sterile) ในปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร โดยล้างหลุมละ 2 ครั้งเพื่อกำจัดเชื้อที่ไม่เกาะกับ plate จากนั้นทิ้ง plate จากนั้นใส่ 1% (v/v) crystal violet ลงไปในปริมาตรหลุมละ 150 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที เมื่อครบเวลา 15 นาที ล้างสีส่วนเกินออก จากนั้นเติม 33% glacial acetic acid ปริมาตรหลุมละ 150 ไมโครลิตร และนำไปเข้าเครื่องเขย่า plate (MICROMIXER Mx2, FINE PCR®, Korea) เป็นเวลา 45 นาที แล้วนำสารละลายในแต่ละหลุมจำนวน 100 ไมโครลิตร ไปใส่ใน plate ใหม่ วัด optical density (OD) ในแต่ละหลุมที่ 595 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่า OD_{595} ที่ได้จากการทดสอบมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยร้อยละของการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (%inhibition) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1- (OD ของกลุ่มทดลอง / OD ของกลุ่มควบคุม) x 100 และนำมาหาความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยที่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) และ 80 (IC_{80})

2.8 การศึกษาผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อปริมาณเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และแบคทีเรียทั้งหมดที่อยู่ในไบโอฟิล์มโดยวิธีเรียล ไทม์ พีซีอาร์ (real-time PCR)

ในวันที่ 2, 4 และ 8 ของการทดสอบทั้งสองแบบ นำ microtitre plate อีก 1 ชุดที่เหลือ มาตรวจหาปริมาณเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และแบคทีเรียทั้งหมดที่อยู่ในไบโอฟิล์มโดยวิธีเรียล ไทม์ พีซีอาร์ ตามวิธีที่รายงานโดย Morillo และคณะในปี 2004 [40] และ Mangala และคณะในปี 2002 [41]

<u>วิธีการ</u>

(1) นำคราบจุลินทรีย์มาใส่ในไมโครเซ็นติฟิว ทิวบ์ ที่ใส่น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 ไมโครลิตร

(2) เขย่าด้วยเครื่อง vortex (Daigger & company, Illinois, USA) 1 นาที

(3) นำไปทำให้ไบโอฟิลม์กระจายตัวออกโดยผ่านเครื่องเสียงความถี่สูง (Ultrasonic disintegrator)(MSE Ltd., London, UK) 60 วินาที และผ่านเครื่องแยกสารโดยใช้คลื่นความถี่ (soniprep 150, MSE, UK) 30 วินาที ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

(4) ปั่นเหวี่ยงไมโครเซ็นติฟิว ทิวบ์ ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

(5) นำน้ำส่วนบนทิ้งไป โดยไม่กระทบกระเทือนตะกอน (pellet) ด้านล่าง แล้วเติม อินสตาจีน มิกเซอร์ (Instagene mixer; BIO_RAD®) ลงไป 120 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปอุ่นที่ 56 ^{o}C เป็นเวลา 15-30 นาที

(6) นำไปเขย่าเป็นเวลา 10 วินาที และต้มที่อุณหภูมิ 100 ^{o}C เป็นเวลา 8 นาที

(7) นำไปเขย่าเป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-3 นาที ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะนำมาเป็น ดีเอ็นเอ ต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์

(8) เตรียมสารที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามคำแนะนำของผู้ผลิตชุดพีซีอาร์ (applied biosystem™)

เลือกคู่ไพร์เมอร์ (primer pair) ดังแสดงในตารางที่ 2 เลือกอุณหภูมิและจำนวนรอบตามวิธีที่รายงานโดย Morillo และคณะในปี 2004 [40] และ Mangala และคณะในปี 2002 [41] ทำ เรียล ไทม์ พีซีอาร์โดยใช้ taqman probe ในการวัดปริมาณผลผลิต พีซีอาร์ โดยทำการผสมดีเอ็นแม่แบบ 2 ไมโครลิตร, taqman probe 5 ไมโครลิตร, TaqMan® Gene Expression Assays 0.5 ไมโครลิตร และ RNase-free water 2.5 ไมโครลิตร ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต นำเข้าเครื่องเทอร์โมไซเคลอ (Applied Biosystem 7500 Fast Instrument ,PE Applied bisystem,USA) โดยเลือกโปรแกรมเทอร์โมไซคลิง (thermocycling program) โดยใช้วงจรเริ่มต้น (initial cycle) อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ 40 รอบ ซึ่งประกอบด้วย 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที ทำการอ่านค่าที่ได้และบันทึกผล

ตารางที่ 2 แสดงคู่ไพร์เมอร์ และลำดับเบสของเชื้อ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และแบคทีเรียโดยรวม

Bacteria	**Sequence of primer (5´-3´)**	**Amplicon size (bp)**
P. gingivalis	5'-CCTACGTGTACGGACAGAGCTATA-3' 5'-AGGATCGCTCAGCGTAGCATT-3' FAM 5'-TCGCCCGGGAAGAACTTGTCTTCA-3' NFQ	71
Total bacteria	5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3' 5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3' FAM 5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3' TAMRA	466

2.9 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลด้วยสถิติเชิงอนุมาน (Inferential Statistics) โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism version 5.4 ในการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มใต้เหงือกในหลอดทดลอง รวมทั้งผลต่อการลดเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และแบคทีเรียทั้งหมดที่อยู่ในไบโอฟิล์ม โดยกำหนดค่าระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05 ใช้สถิติ Kruskal-Wallis test ร่วมกับ Dunn's Multiple Comparison Test เนื่องจากข้อมูลมีการแจกแจงไม่ปกติ

ผลการวิจัย

1. ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัคร

การศึกษาครั้งนี้ได้มีการตรวจคัดเลือกผู้ป่วยเพื่อเข้าร่วมการศึกษาจำนวน 5 คน อาสาสมัครทุกคนมีร่องลึกปริทันต์ตั้งแต่ 4 มิลลิเมตร ขึ้นไปอย่างน้อย 4 ซี่ ยกเว้นฟันกรามแท้ซี่ที่สาม อาสาสมัครมีสุขภาพดีไม่มีโรคทางระบบ ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครแสดงในตารางที่ 3 นอกจากนี้เมื่อทำการตรวจหาเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ในคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกที่เก็บจากอาสาสมัคร ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีของ Ashimoto และคณะในปี 1996 [37] พบว่าอาสาสมัครทุกคนมีเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส แต่ไม่พบเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

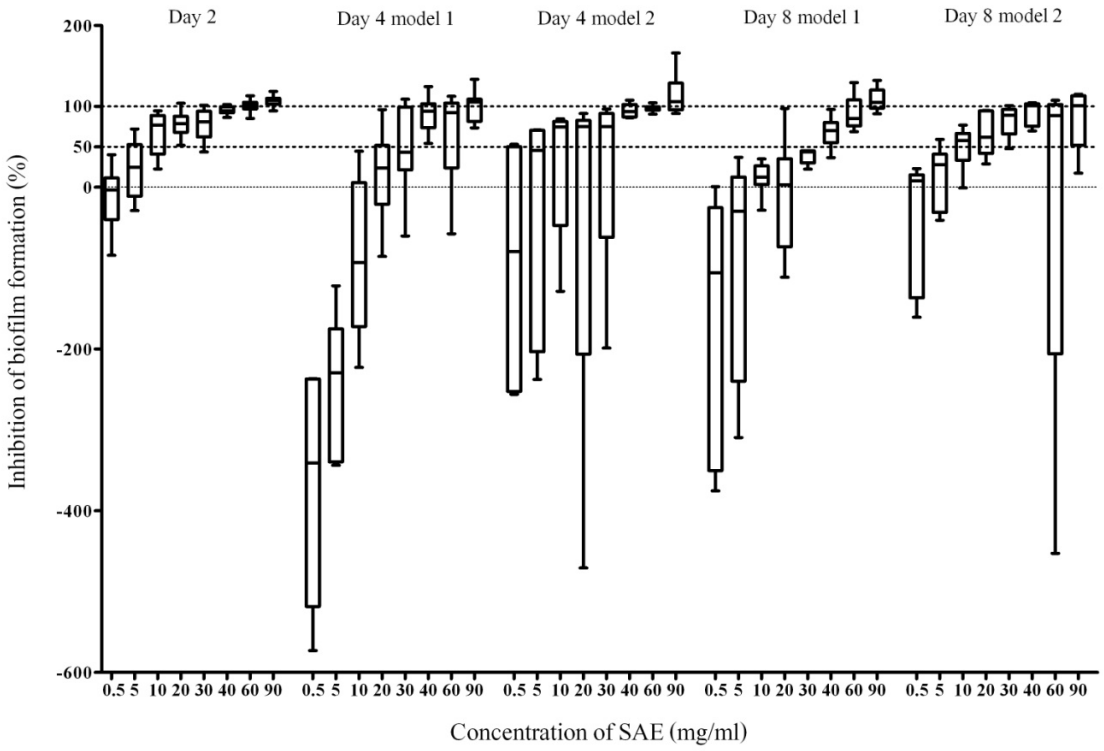
ตารางที่ 3 ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครทั้งหมด (N=5)

อาสาสมัคร	เพศ	อายุ	ค่าเฉลี่ยร่องลึกปริทันต์และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (มิลลิเมตร)
คนที่ 1	หญิง	37	4±0
คนที่ 2	หญิง	35	5±0
คนที่ 3	หญิง	45	4.3±0.6
คนที่ 4	หญิง	35	4±0
คนที่ 5	หญิง	40	4.3±0.6

2. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มใต้เหงือกจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัคร

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้งหมด (N=5) แสดงดัง รูปที่ 1 หากพิจารณาผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มโดยดูจากค่า มัธยฐาน พบว่า ในวันที่ 2 สารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 - 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่าร้อยละ 50 ในวันที่ 4 และ 8 ในกลุ่มที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 2 วัน โดยไม่ใส่สารสกัดจากใบข่อย (model 1) พบว่าสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 40 - 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่าร้อยละ 50 ส่วนในวันที่ 4 และ 8 ในกลุ่มที่เปลี่ยน

อาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมใส่สารสกัดจากใบข่อยทุก 2 วัน (model 2) พบว่าสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 - 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่าร้อยละ 50



รูปที่ 1 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อย (SAE) ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มใต้เหงือกในหลอดทดลอง (N=5) เส้นกึ่งกลางของ box plot แสดงค่ามัธยฐาน ขอบล่างและขอบบนของ box คือ เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25 และ 75 ของข้อมูล

จากรูปที่ 1 จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทุกราย ไม่ว่าจะทดสอบใน model ใดก็ตาม แต่หากใช้ความเข้มข้นต่ำกว่า 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากใบข่อยจะไม่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทุกราย นอกจากนี้ยังอาจกระตุ้นให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์มเพิ่มขึ้นจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครบางรายด้วย

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดจากใบข่อยในวันที่ 2 วันที่ 4 ในกลุ่มที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 2 วัน โดยไม่ใส่สารสกัดจากใบข่อย (model 1) วันที่ 4 ในกลุ่มที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมใส่สารสกัดจากใบข่อยทุก 2 วัน (model 2) วันที่ 8 ในกลุ่มที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 2 วัน โดยไม่ใส่สารสกัดจากใบข่อย (model 1) และวันที่ 8 ในกลุ่มที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมใส่สารสกัดจากใบข่อยทุก 2 วัน (model 2) พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะบางความเข้มข้นดังแสดงในตารางที่ 4-8

เมื่อนำสารสกัดจากใบข่อยแต่ละความเข้มข้นมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในแต่ละ model พบว่าสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในวันที่ 2 แตกต่างจากวันที่ 4 model 1 และวันที่ 4 model 1 แตกต่างจากวันที่ 8 model 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วน model อื่นๆ ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 9

สารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในวันที่ 2 แตกต่างจากวันที่ 4 model 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 10

สารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในวันที่ 2 แตกต่างจากวันที่ 4 model 1 และวันที่ 8 model 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 11-12

สารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในวันที่ 2 แตกต่างจากวันที่ 4 model 1 และวันที่ 8 model 1 แตกต่างจาก model 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 13

สารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในวันที่ 2 แตกต่างจากวันที่ 8 model 1 และวันที่ 8 model 1 แตกต่างจาก model 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 14

สารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในวันที่ 2 แตกต่างจากวันที่ 8 model 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 15

เมื่อใช้สารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในทุก model ได้แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 4 แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อย (SAE) ระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ในวันที่ 2

Concentration of SAE	Difference in rank sum	P-value
0.5 vs 5 mg/ml	-12.3	ns
0.5 vs 10 mg/ml	-41.4	ns
0.5 vs 20 mg/ml	-52.4	ns
0.5 vs 30 mg/ml	-56.1	ns
0.5 vs 40 mg/ml	-93.3	<0.05
0.5 vs 60 mg/ml	-120.6	<0.05
0.5 vs 90 mg/ml	-145.0	<0.05
5 vs 10 mg/ml	-29.1	ns
5 vs 20 mg/ml	-40.1	ns
5 vs 30 mg/ml	-43.8	ns
5 vs 40 mg/ml	-81.0	<0.05
5 vs 60 mg/ml	-108.3	<0.05
5 vs 90 mg/ml	-132.7	<0.05
10 vs 20 mg/ml	-11.0	ns
10 vs 30 mg/ml	-14.7	ns
10 vs 40 mg/ml	-51.9	<0.05
10 vs 60 mg/ml	-79.2	<0.05
10 vs 90 mg/ml	-103.6	<0.05
20 vs 30 mg/ml	-3.7	ns
20 vs 40 mg/ml	-40.9	ns
20 vs 60 mg/ml	-68.1	<0.05
20 vs 90 mg/ml	-92.6	<0.05
30 vs 40 mg/ml	-37.2	ns
30 vs 60 mg/ml	-64.4	<0.05
30 vs 90 mg/ml	-88.9	<0.05
40 vs 60 mg/ml	-27.3	ns
40 vs 90 mg/ml	-51.7	<0.05
60 vs 90 mg/ml	-24.4	ns

ns = not significant difference

ตารางที่ 5 แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ในวันที่ 4 ในกรณีที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 2 วัน โดยไม่ใส่สารสกัดจากใบข่อย (model 1)

Concentration of SAE	Difference in rank sum	P-value
0.5 vs 5 mg/ml	-3.9	ns
0.5 vs 10 mg/ml	-15.7	ns
0.5 vs 20 mg/ml	-29.2	ns
0.5 vs 30 mg/ml	-38.2	<0.05
0.5 vs 40 mg/ml	-54.6	<0.05
0.5 vs 60 mg/ml	-47.4	<0.05
0.5 vs 90 mg/ml	-60	<0.05
5 vs 10 mg/ml	-11.8	ns
5 vs 20 mg/ml	-25.3	ns
5 vs 30 mg/ml	-34.3	ns
5 vs 40 mg/ml	-50.7	<0.05
5 vs 60 mg/ml	-43.5	<0.05
5 vs 90 mg/ml	-56.06	<0.05
10 vs 20 mg/ml	-13.5	ns
10 vs 30 mg/ml	-22.5	ns
10 vs 40 mg/ml	-38.9	<0.05
10 vs 60 mg/ml	-31.7	<0.05
10 vs 90 mg/ml	-44.3	<0.05
20 vs 30 mg/ml	-9.0	ns
20 vs 40 mg/ml	-25.4	ns
20 vs 60 mg/ml	-18.2	ns
20 vs 90 mg/ml	-30.8	<0.05
30 vs 40 mg/ml	-16.4	ns
30 vs 60 mg/ml	-9.1	ns
30 vs 90 mg/ml	-21.7	ns
40 vs 60 mg/ml	7.2	ns
40 vs 90 mg/ml	-5.4	ns
60 vs 90 mg/ml	-12.6	ns

ns = not significant difference

ตารางที่ 6 แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ในวันที่ 4 ในกรณีที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมใส่สารสกัดจากใบข่อยทุก 2 วัน (model 2)

Concentration of SAE	Difference in rank sum	p-value
0.5 vs 5 mg/ml	-5.8	ns
0.5 vs 10 mg/ml	-12.8	ns
0.5 vs 20 mg/ml	-11.4	ns
0.5 vs 30 mg/ml	-17.5	ns
0.5 vs 40 mg/ml	-42.2	<0.05
0.5 vs 60 mg/ml	-47.7	<0.05
0.5 vs 90 mg/ml	-56.9	<0.05
5 vs 10 mg/ml	-7.0	ns
5 vs 20 mg/ml	-5.6	ns
5 vs 30 mg/ml	-11.7	ns
5 vs 40 mg/ml	-36.3	ns
5 vs 60 mg/ml	-41.9	<0.05
5 vs 90 mg/ml	-51.1	<0.05
10 vs 20 mg/ml	1.4	ns
10 vs 30 mg/ml	-4.7	ns
10 vs 40 mg/ml	-29.3	ns
10 vs 60 mg/ml	-34.9	<0.05
10 vs 90 mg/ml	-44.1	<0.05
20 vs 30 mg/ml	-6.1	ns
20 vs 40 mg/ml	-30.8	ns
20 vs 60 mg/ml	-36.3	<0.05
20 vs 90 mg/ml	-45.5	<0.05
30 vs 40 mg/ml	-24.7	ns
30 vs 60 mg/ml	-30.2	<0.05
30 vs 90 mg/ml	-39.4	<0.05
40 vs 60 mg/ml	-5.5	ns
40 vs 90 mg/ml	-14.7	ns
60 vs 90 mg/ml	-9.2	ns

ns = not significant difference

ตารางที่ 7 แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ในวันที่ 8 ในกรณีที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 2 วัน โดยไม่ใส่สารสกัดจากใบข่อย (model 1)

Concentration of SAE	Difference in rank sum	P-value
5 vs 10 mg/ml	-5.381	ns
5 vs 20 mg/ml	-6.967	ns
5 vs 30 mg/ml	-14.67	ns
5 vs 40 mg/ml	-26.22	ns
5 vs 60 mg/ml	-37.08	<0.05
5 vs 90 mg/ml	-45.51	<0.05
10 vs 20 mg/ml	-1.586	ns
10 vs 30 mg/ml	-9.286	ns
10 vs 40 mg/ml	-20.84	ns
10 vs 60 mg/ml	-31.70	<0.05
10 vs 90 mg/ml	-40.13	<0.05
20 vs 30 mg/ml	-7.700	ns
20 vs 40 mg/ml	-19.26	ns
20 vs 60 mg/ml	-30.12	<0.05
20 vs 90 mg/ml	-38.55	<0.05
30 vs 40 mg/ml	-11.56	ns
30 vs 60 mg/ml	-22.42	ns
30 vs 90 mg/ml	-30.85	<0.05
40 vs 60 mg/ml	-10.86	ns
40 vs 90 mg/ml	-19.29	ns
60 vs 90 mg/ml	-8.429	ns

ns = not significant difference

ตารางที่ 8 แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ในวันที่ 8 ในกรณีที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมใส่สารสกัดจากใบข่อยทุก 2 วัน (model 2)

Concentration of SAE	Difference in rank sum	P-value
0.5 vs 5 mg/ml	-7.8	ns
0.5 vs 10 mg/ml	-19.0	ns
0.5 vs 20 mg/ml	-27.6	ns
0.5 vs 30 mg/ml	-36.7	ns
0.5 vs 40 mg/ml	-46.6	<0.05
0.5 l vs 60 mg/ml	-25.7	ns
0.5 vs 90 mg/ml	-43.7	<0.05
5 vs 10 mg/ml	-11.2	ns
5 vs 20 mg/ml	-19.7	ns
5 vs 30 mg/ml	-28.9	ns
5 vs 40 mg/ml	-38.8	<0.05
5 vs 60 mg/ml	-17.8	ns
5 vs 90 mg/ml	-35.9	<0.05
10 vs 20 mg/ml	-8.6	ns
10 vs 30 mg/ml	-17.7	ns
10 vs 40 mg/ml	-27.6	ns
10 vs 60 mg/ml	-6.7	ns
10 vs 90 mg/ml	-24.7	ns
20 vs 30 mg/ml	-9.2	ns
20 vs 40 mg/ml	-19.1	ns
20 vs 60 mg/ml	1.9	ns
20 vs 90 mg/ml	-16.2	ns
30 vs 40 mg/ml	-9.9	ns
30 vs 60 mg/ml	11.1	ns
30 vs 90 mg/ml	-7.0	ns
40 vs 60 mg/ml	20.9	ns
40 vs 90 mg/ml	2.9	ns
60 vs 90 mg/ml	-18.1	ns

ns = not significant difference

ตารางที่ 9 แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ระหว่าง model ต่าง ๆ

Model	Difference in rank sum	P-value
วันที่ 2 vs วันที่ 4 model 1	19.4	<0.05
วันที่ 2 vs วันที่ 4d model 2	2.0	ns
วันที่ 2 vs วันที่ 8 model 1	10.9	ns
วันที่ 2 vs วันที่ 8 model 2	0.7	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 4 model 2	-17.3	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 8 model 1	-8.5	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 8 model 2	-18.7	<0.05
วันที่ 4 model 2 vs วันที่ 8 model 1	8.8	ns
วันที่ 4 model 2 vs วันที่ 8 model 2	-1.3	ns
วันที่ 8 model 1 vs วันที่ 8 model 2	-10.2	ns

ns = not significant difference

ตารางที่ 10 แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ระหว่าง model ต่าง ๆ

Model	Difference in rank sum	P-value
วันที่ 2 vs วันที่ 4 model 1	17.58	<0.05
วันที่ 2 vs วันที่ 4 model 2	0.8485	ns
วันที่ 2 vs วันที่ 8 model 1	9.182	ns
วันที่ 2 vs วันที่8 model 2	1.848	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 4 model 2	-16.73	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 8 model 1	-8.400	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 8 model 2	-15.73	ns
วันที่ 4 model 2 vs วันที่ 8 model 1	8.333	ns
วันที่ 4 model 2 vs วันที่ 8 model 2	1.000	ns
วันที่ 8 model 1 vs วันที่ 8 model 2	-7.333	ns

ns = not significant difference

ตารางที่ 11 แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ระหว่าง model ต่าง ๆ

Model	Difference in rank sum	P-value
วันที่ 2 vs วันที่ 4 model 1	26.8	<0.05
วันที่ 2 vs วันที่ 4 model 2	8.2	ns
วันที่ 2 vs วันที่ 8 model 1	21.9	<0.05
วันที่ 2 vs วันที่ 8 model 2	9.6	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 4 model 2	-18.7	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 8 model 1	-5.0	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 8 model 2	-17.2	ns
วันที่ 4 model 2 vs วันที่ 8 model 1	13.7	ns
วันที่ 4 model 2 vs วันที่ 8 model 2	1.4	ns
วันที่ 8 model 1 vs วันที่ 8 model 2	-12.3	ns

ns = not significant difference

ตารางที่ 12 แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ระหว่าง model ต่าง ๆ

Model	Difference in rank sum	P-value
วันที่ 2 vs วันที่ 4 model 1	22.7	<0.05
วันที่ 2 vs วันที่ 4 model 2	14.8	ns
วันที่ 2 vs วันที่ 8 model 1	26.0	<0.05
วันที่ 2 vs วันที่ 8 model 2	7.0	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 4 model 2	-7.9	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 8 model 1	3.3	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 8 model 2	-15.7	ns
วันที่ 4 model 2 vs วันที่ 8 model 1	11.2	ns
วันที่ 4 model 2 vs วันที่ 8 model 2	-7.9	ns
วันที่ 8 model 1 vs วันที่ 8 model 2	-19.0	ns

ns = not significant difference

ตารางที่ 13 แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ระหว่าง model ต่าง ๆ

Model	Difference in rank sum	P-value
วันที่ 2 vs วันที่ 4 model 1	10.8	ns
วันที่ 2 vs วันที่ 4 model 2	11.2	ns
วันที่ 2 vs วันที่ 8 model 1	23.2	<0.05
วันที่ 2 vs วันที่ 8 model 2	-2.9	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 4 model 2	0.4	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 8 model 1	12.4	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 8 model 2	-13.7	ns
วันที่ 4 model 2 vs วันที่ 8 model 1	12.0	ns
วันที่ 4 model 2 vs วันที่ 8 model 2	-14.1	ns
วันที่ 8 model 1 vs วันที่ 8 model 2	-26.1	<0.05

ns = not significant difference

ตารางที่ 14 แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ระหว่าง model ต่าง ๆ

Model	Difference in rank sum	P-value
วันที่ 2 vs วันที่ 4 model 1	3.8	ns
วันที่ 2 vs วันที่ 4 model 2	1.3	ns
วันที่ 2 vs วันที่ 8 model 1	24.0	<0.05
วันที่ 2 vs วันที่ 8 model 2	-3.2	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 4 model 2	-2.5	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 8 model 1	20.2	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 8 model 2	-7.0	ns
วันที่ 4 model 2 vs วันที่ 8 model 1	22.7	ns
วันที่ 4 model 2 vs วันที่ 8 model 2	-4.6	ns
วันที่ 8 model 1 vs วันที่ 8 model 2	-27.2	<0.05

ns = not significant difference

ตารางที่ 15 แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ระหว่าง model ต่าง ๆ

Model	Difference in rank sum	P-value
วันที่ 2 vs วันที่ 4 model 1	18.9	ns
วันที่ 2 vs วันที่ 4 model 2	12.9	ns
วันที่ 2 vs วันที่ 8 model 1	16.4	ns
วันที่ 2 vs วันที่ 8 model 2	26.8	<0.05
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 4 model 2	-6.0	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 8 model 1	-2.5	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 8 model 2	7.9	ns
วันที่ 4 model 2 vs วันที่ 8 model 1	3.5	ns
วันที่ 4 model 2 vs วันที่ 8 model 2	13.9	ns
วันที่ 8 model 1 vs วันที่ 8 model 2	10.4	ns

ns = not significant difference,

ตารางที่ 16 แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ระหว่าง model ต่าง ๆ

Model	Difference in rank sum	P-value
วันที่ 2 vs วันที่ 4 model 1	13.7	ns
วันที่ 2 vs วันที่ 4 model 2	-2.0	ns
วันที่ 2 vs วันที่ 8 model 1	-0.4	ns
วันที่ 2 vs วันที่ 8 model 2	13.5	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 4 model 2	-15.7	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่8 model 1	-14.2	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 8 model 2	-0.3	ns
วันที่ 4 model 1 vs วันที่ 8 model 1	1.6	ns
วันที่ 4 model 2 vs วันที่ 8 model 2	15.5	ns
วันที่ 8 model 1 vs วันที่ 8 model 2	13.9	ns

ns = not significant difference,

จากการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยที่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มใต้เหงือกในหลอดทดลองได้ร้อยละ 50 พบว่า ในวันที่ 2, 4 model 1, 4 model 2, 8 model 1, และ 8 model 2 สารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 8.4, 30.3, 33.4, 34.3 และ 31.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ร้อยละ 50 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 17

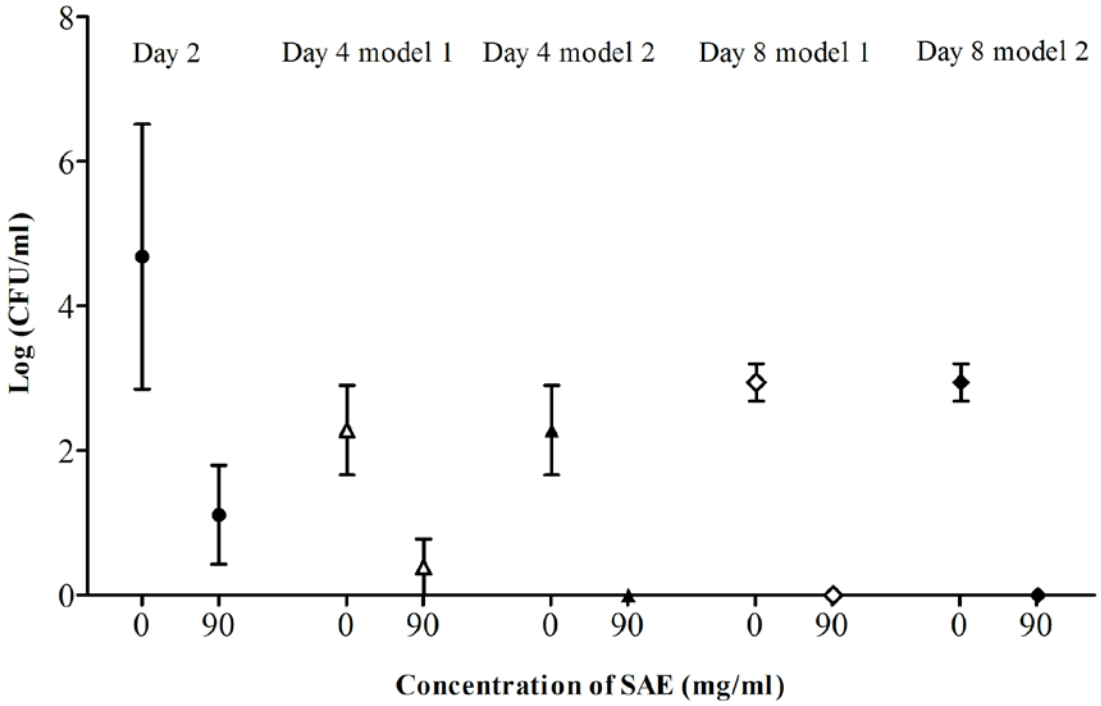
ตารางที่ 17 ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยที่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มใต้เหงือกในหลอดทดลองได้ร้อยละ 50 ในแต่ละ model (n=5)

วันที่	**2**	**4** model 1	**4** model 2	**8** model 1	**8** model 2
IC_{50} (mg/ml)	8.4	30.3	33.4	34.3	31.9
95% Confidence Intervals	7.2 - 9.8	17.5 - 52.5	22.1 - 50.4	24.5 - 50.0	5.5 - 186.1

4. ผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อปริมาณเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ที่อยู่ในไบโอฟิล์มโดยวิธีเรียล ไทม์ พีซีอาร์ (real-time PCR)

4.1 ผลของสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อปริมาณเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส อยู่ในไบโอฟิล์มเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดจากใบข่อย

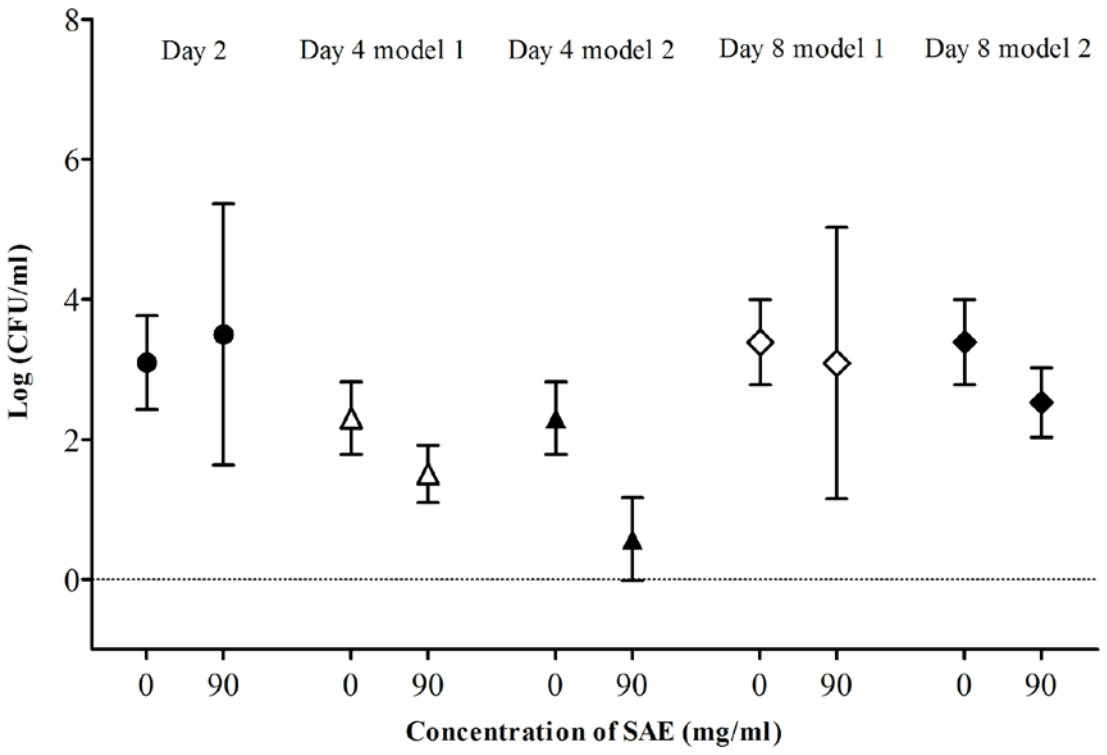
จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มใต้เหงือกในหลอดทดลอง (รูปที่ 1) จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทุกราย จึงได้นำคราบจุลินทรีย์หลังสัมผัสกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมาตรวจหาปริมาณเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในไบโอฟิล์ม ผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อปริมาณเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้งหมด (N=5) แสดงดัง รูปที่ 2 หากพิจารณาโดยดูจากค่ามัธยฐาน พบว่าปริมาณเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ลดลงในทุก model หลังสัมผัสกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแตกต่างกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดจากใบข่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



รูปที่ 2 แสดงค่ามัธยฐาน ค่าสูงสุดและต่ำสุดของปริมาณเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสที่อยู่ในไบโอฟิล์มหลังจากสัมผัสกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดจากใบข่อย (N=5)

4.2 ผลของสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่อยู่ในไบโอฟิล์มเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดจากใบข่อย

ผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้งหมด (N=5) แสดงดัง รูปที่ 3 หากพิจารณา โดยดูจากค่ามัธยฐาน พบว่า ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด เพิ่มขึ้นในวันที่ 2 แต่ในวันที่ 4 และ 8 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดลดลงในทุก model หลังสัมผัสกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แม้ว่าจะแตกต่างกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดจากใบข่อยอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 3 แสดงค่ามัธยฐาน ค่าสูงสุดและต่ำสุดของปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่อยู่ในไบโอฟิล์มหลังจากสัมผัสกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในระยะเวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดจากใบข่อย (N=5)

อภิปรายผล

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มใต้เหงือกในหลอดทดลอง ในอาสาสมัครที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ 5 คน โดยนำตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกมาทำการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรคในช่องปากใน microtitre plate ตามวิธีที่รายงานโดย Walker และ sedlacek [38] เนื่องจากการศึกษาของ Walker และ sedlacek ในปี ค.ศ. 2007 ได้ทำการสร้างไบโอฟิล์มใต้เหงือกในห้องปฏิบัติการโดยนำตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกจากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบและผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติเป็นโรคปริทันต์ พบว่าไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นในห้องปฏิบัติการ มีความคล้ายคลึงทางสายพันธุ์ของเชื้อร้อยละ 69 และความคล้ายคลึงทางสัดส่วนของเชื้อร้อยละ 57 กับตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกเริ่มต้นที่เก็บจากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ ส่วนไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นจากตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกของผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติเป็นโรคปริทันต์พบมีความคล้ายคลึงทางสายพันธุ์ของเชื้อร้อยละ 81 และความคล้ายคลึงทางสัดส่วนของเชื้อร้อยละ 70 กับตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกเริ่มต้น

ในการศึกษานี้ได้เลือกเก็บตัวอย่างจากคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกของอาสาสมัครที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบที่มีร่องลึกปริทันต์ 4-6 มิลลิเมตร ผลจากการเก็บตัวอย่างจากคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกจากอาสาสมัครที่มีร่องลึกปริทันต์ 4-6 มิลลิเมตร ทั้ง 5 คน ไม่พบว่ามีเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อจุลชีพในคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกจะใช้โปรตีนจากน้ำเหลืองเหงือกเป็นแหล่งพลังงานหลักทำให้มียูเรียเกิดขึ้นจากการเมทาบอลิซึมส่งผลให้สภาวะแวดล้อมบริเวณใต้เหงือกมีสภาวะเป็นเบส [42] ทำให้ลดการอยู่รอดของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ในร่องเหงือกซึ่งเป็นเชื้อที่ย่อยสลายน้ำตาลเป็นพลังงานและชอบสภาวะที่เป็นกรด [43]

การศึกษาผลของสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มใต้เหงือกในหลอดทดลองในการศึกษานี้ได้ทำการวัดปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มโดยทำการย้อมสีด้วย crystal violet และนำมาวัดค่า OD ด้วยเครื่อง microplate reader เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไปในการศึกษาเชิงกึ่งปริมาณ (semi- quantitative) ของไบโอฟิล์มของแบคทีเรียและเชื้อรา [44,45]

ในการศึกษาผลของสารต่อการทำลายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่อยู่ในไบโอฟิล์มได้ใช้วิธีเรียล ไทม์ พีซีอาร์ (real-time PCR) ในการตรวจปริมาณเชื้อ แม้ว่าวิธีการตรวจหาเชื้อที่ใช้โดยทั่วไปมีหลายวิธีได้แก่ การเพาะเชื้อ วิธีทางชีวเคมี วิธีทางอิมมูโนโลจิคัลและดีเอ็นเอ โพรบ ไฮบิไดรเซชัน (DNA probe hybridization) แต่วิธีเหล่านี้มีข้อจำกัดที่ความจำเพาะ ความไว และ / หรือค่อนข้างใช้เวลานาน ปัจจุบันได้มีการนำวิธีพีซีอาร์มาใช้ตรวจหาเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและเชื้อก่อโรคอื่น ๆ ในคราบจุลินทรีย์ และพบว่าพีซีอาร์เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจหาเชื้อในการศึกษานี้ได้ถูกทดสอบในการศึกษาก่อนหน้านี้แล้วว่า สามารถตรวจพบเชื้อ แม้จะมีปริมาณเชื้อต่ำสุดที่วิธีพีซีอาร์จะสามารถตรวจพบเชื้อได้คือ 25- 100 เซลล์ [37]

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มใต้เหงือกในหลอดทดลองจากรูปที่ 1 แสดงให้เห็นว่าวันที่ 2 , วันที่ 4 และ 8 ในกลุ่มที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมใส่สารสกัดจากใบข่อยทุก 2 วัน (model 2) พบว่าสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 - 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่าร้อยละ 50 ส่วนในวันที่ 4 และ 8 ในกลุ่มที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 2 วัน โดยไม่ใส่สารสกัดจากใบข่อย (model 1) พบว่าสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 40 - 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่าร้อยละ 50 การที่สารสกัดจากใบข่อยมีประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มใต้เหงือกในหลอดทดลอง อาจเนื่องจากสารสกัดจากใบข่อยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และ แอกกริเกติแบคเตอร์ แอกติโนมัยซิเทมคอมิแทนส์ ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคปริทันต์ที่พบในไบโอฟิล์มใต้เหงือก [26] โดยผลการศึกษาของ สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์ และคณะในปี ค.ศ. 2002 [10] พบว่าค่า MIC ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และ แอกกริเกติแบกเทอร์ แอกติโนมัยซิเทมคอมิแทนส์ คือ 3.91 และ 7.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และค่า MBC ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และ แอกกริเกติแบคเตอร์ แอกติโนมัยซิเทมคอมิแทนส์ คือ 31.25 และ 15.62 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งจากผลการตรวจปริมาณเชื้อโดยวิธีเรียล ไทม์ พีซีอาร์ ในการศึกษานี้ก็ช่วยยืนยันประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยในการต้านเชื้อดังกล่าว เนื่องจากพบว่าสารสกัดจากใบข่อยสามารถลดปริมาณเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและแบคทีเรียโดยรวมในไบโอฟิล์มใต้เหงือกในหลอดทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดจากใบข่อย อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25 ของ box plot จากรูปที่ 1 จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากใบข่อยในความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อาจกระตุ้นให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกของอาสาสมัครบางคนมากขึ้นได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกของอาสาสมัครแต่ละคน มีปริมาณและชนิดของเชื้อจุลชีพแตกต่างกัน ซึ่งสารสกัดจากใบข่อย อาจไม่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อจุลชีพได้ทั้งหมด จึงทำให้เชื้อจุลชีพที่สารสกัดจากใบข่อยไม่สามารถยับยั้งหรือทำลายได้ มีการเจริญเติบโตขึ้น ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการทบทวนวรรณกรรมของ Kaplan ในปี ค.ศ. 2001 [46] ที่แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นที่ต่ำกว่า MIC ของยาปฏิชีวนะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียในหลอดทดลองได้ ดังนั้นหากนำสารสกัดจากใบข่อยมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในทางคลินิกอาจจะต้องระวังในกรณีที่ใช้ในความเข้มข้นที่ต่ำซึ่งอาจกระตุ้นให้มีการสร้างไบโอฟิล์มเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยบางรายได้

จากการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มใต้เหงือกในหลอดทดลองของสารสกัดจากใบข่อยที่แสดงใน ตารางที่ 4 – 16 พบว่าความเข้มข้นที่ 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ในวันที่ 2, 4 (model 1 และ model 2) และ 8 (model 1 และ model 2) ได้แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าการใส่สารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตั้งแต่เริ่มต้นเพียงครั้งเดียวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งไบโอฟิล์มคงอยู่ได้จนถึงวันที่ 8 นอกจากนี้สารสกัดจากใบข่อยยังสามารถลดปริมาณเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสรวมทั้งแบคทีเรียโดยรวมในไบโอ

ฟิล์มใต้เหงือกในหลอดทดลองได้ ดังนั้นหากจะนำสารสกัดจากใบข่อยไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางทันตกรรมเพื่อนำมาใช้ร่วมกับการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟัน น่าจะเลือกสารสกัดจากใบข่อยที่ความเข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพราะในทางปฏิบัติจริงจะสามารถนัดผู้ป่วยกลับมาใส่สารสกัดจากใบข่อยสัปดาห์ละครั้งได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ อรวรรณ ในปี พ.ศ. 2550 [18] และพรพรรณ ในปี พ.ศ. 2551 [47] ซึ่งได้ทำการศึกษาการใช้เจลผสมสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้นร้อยละ 20 -24 ใส่ลงไปในร่องลึกปริทันต์ร่วมกับการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังพบว่ามีความปลอดภัยทางคลินิก ไม่มีอาการข้างเคียงใด ๆ ในอาสาสมัคร และการศึกษาของ อรวรรณ [18] ยังพบว่ากลุ่มทดสอบที่ใส่เจลผสมสารสกัดจากใบข่อยลงไปในร่องลึกปริทันต์ร่วมกับการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันมีการเปลี่ยนแปลงของความลึกร่องลึกปริทันต์ ระดับการยึดเกาะอวัยวะปริทันต์ และการมีเลือดออกของเหงือกในสัปดาห์ที่ 6 และ 12 ไปในทางที่ดีขึ้นมากกว่าอาสาสมัครกลุ่มควบคุม แม้ว่าจะแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบการลดลงของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสในอาสาสมัครกลุ่มทดสอบมากกว่ากลุ่มควบคุมทั้งในสัปดาห์ที่ 6 และ 12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$)

เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มใต้เหงือกในหลอดทดลอง ในวันที่ 2, 4 และ 8 พบว่าที่ความเข้มข้นเดียวกัน สารที่ทดสอบมีแนวโน้มในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น แสดงว่าเชื้อในไบโอฟิล์มมีการดื้อต่อสารที่ใช้ทดสอบเพิ่มขึ้นเมื่อไบโอฟิล์มมีอายุมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sedlacek และWalker ปี ค.ศ. 2007 [35] ที่แสดงให้เห็นว่าไบโอฟิล์มมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นเมื่อไบโอฟิล์มเจริญเติบโตเต็มที่ (mature) และจะมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะสูงสุดเมื่อไบโอฟิล์มอยู่ในสภาวะที่เจริญเติบโตเต็มที่และคงที่แล้ว (steady-state phase of biofilm growth) นอกจากนี้การที่ไบโอฟิล์มดื้อต่อยาอาจเนื่องจากยามีการแพร่เข้าไปในไบโอฟิล์มช้าหรือไม่สมบูรณ์ สารอาหารและของเสียในไบโอฟิล์มสามารถส่งผลต่อการเปลี่ยนสภาวะแวดล้อมซึ่งอาจทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้เต็มที่ รวมทั้งอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในโบโอฟิล์มลดลงส่งผลให้ฤทธิ์ของยาต่อเชื้อในไบโอฟิล์มลดลงด้วย [48]

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยต่อการต้านเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในไบโอฟิล์มในการศึกษานี้กับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยต่อการต้านเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในรูปแบบแพลงโทนิกเซลล์ ในการศึกษาก่อนหน้าพบว่าแม้ใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่าค่า MBC ของแพลงโทนิกเซลล์ก็ยังไม่สามารถทำลายเชื้อที่อยู่ในไบโอฟิล์มได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mah และ O'Toole ในปี ค.ศ. 2001 [49] ที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่อยู่ในไบโอฟิล์มมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะสูงกว่าเชื้อที่อยู่ในรูปแบบแพลงโทนิกเซลล์ ประมาณ 10-1000 เท่า เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในไบโอฟิล์มมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากแพลงโทนิก เซลล์ และยังมีการสื่อสารกัน โดยการหลั่งโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนหลายกลุ่มซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยา

สรุปผลการศึกษา

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบข่อยสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มใต้เหงือกในหลอดทดลองได้ โดยหากใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อย 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตั้งแต่เริ่มต้นเพียงครั้งเดียวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทุกคนได้มากกว่าร้อยละ 80 จนถึงวันที่ 8 รวมทั้งยังสามารถลดปริมาณเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ในไบโอฟิล์มได้แตกต่างกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดจากใบข่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

เอกสารอ้างอิง

[1] Lewis W. Plants used as chewing sticks. J Prevent Dent 1980;6:71-3.

[2] Mukherjee K, Roy L. Chemical examination of *Streblus asper* leaves. Int J Crude Drug Res 1983;21:189-90.

[3] Kapoor S, Kapoor L. Medicinal plant wealth of the karimnaga district of andhra pradesh. Bull Med Ethnobot Res 1980;1:120-44.

[4] Wasuwat S. A list of Thai medical plants. Bangkok. project Research report 1967; 1.

[5] อุทัยวรรณ กาญจนกามล และคณะ "การศึกษาประสิทธิภาพของไม้ข่อยและไม้สีฟันคนทาในโครงการอนามัยช่องปากของเด็กไทยในชนบท" รายงานการวิจัย พ.ศ.2526.

[6] ข่าวสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. เรื่องสมุนไพร 2538;26 : 23.

[7] โสพิศ วงศ์คำ และคณะ "การศึกษาผลของสารสกัดข่อยต่อเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปาก" รายงานการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2538.

[8] บัญญัติ สุขศรีงาม "สมุนไพรเพื่อสุขภาพดีถ้วนหน้าก่อนปี 2543" ใกล้หมอ หน้า 70-2.

[9] Taweechaisupapong S, Leela-aphiradee N, Laoprom P, Khamenkhan P. Effects of Koi (*Streblus asper*) on root canal bacteria. KDJ 2000;3:41-7.

[10] Taweechaisupapong S, Singhara S, Choopan T. Antimicrobial effect of *Streblus asper* leaf extract on selected anaerobic bacteria. J Dent Assoc Thai 2002;52:227-34.

[11] Taweechaisupapong S, Wongkham S, Chareonsuk S, Suparee S, Srilalai P, Chaiyarak S. Selective activity of *Streblus asper* on Mutans streptococci. J Ethnopharmacol 2000;70:73-9.

[12] Triratana T, Thaweboon B. The testing of crude extracts of *Streblus asper* (Koi) against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus salivarius*. J Dent Assoc Thai 1987;37:119-25.

[13] Wongkham S, Laupattarakasaem P, Pienthaweechai K, Areejitranusorn P, Wongkham C, Techanitiswad T. Antimicrobial activity of *Streblus asper* leaf extract. Phytother Res 2001;15:119-21.

[14] สมเกียรติ เหลืองไพรินทร์ และสุรัตน์ ลีนะศิริมากุล. ผลของยาสีฟันผสมสารสกัดจากใบข่อยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็พโตคอกคัส มิวแทนส์ในน้ำลาย รายงานการวิจัยระดับปริญญา ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2534.

[15] Wongkham S, Pienthaweechai K, Laupattarakasaem P, Areejitranusorn P, Wongkham C, Jantamonkol K, et al. Bacterocodal activity of *Streblus asper*. Second Thai-French Symposium on Plant Molecular Biology. 1996:362-74.

[16] Taweechaisupapong S, Wongkham S, Rattanathongkom A, Singhara S, Choopan T, Suparee S. Effect of mouthrinse containing *Streblus asper* leaf extract on gingivitis and plaque formation. J Dent Assoc Thai 2002;52:383-91.

[17] Taweechaisupapong S, Intaranongpai K, Suwannarong W, Pitiphat W, Chatrchaiwiwatana S, Wara-aswapati N. Clinical and microbiological effects of subgingival irrigation with *Streblus asper* leaf extract in chronic periodontitis. J Clin Dent 2006;17:67-71.

[18] อรวรรณ อภินทนาพงศ์ ความปลอดภัยทางคลินิก ผลทางคลินิกและทางจุลชีววิทยาของการใช้เจลผสมสารสกัดจากใบข่อยใส่ลงไปในร่องลึกปริทันต์ร่วมกับการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2550.

[19] Sripanidkulchai B, Junlatat J, Wara-Aswapati N, Hormdee D. Anti-inflammatory effect of *Streblus asper* leaf extract in rats and its modulation on inflammation-associated genes expression in RAW 264.7 macrophage cells. J Ethnopharmacol 2009;124:566-70.

[20] Taweechaisupapong S, Choopan T, Singhara S, Chatrchaiwiwatana S, Wongkham S. In vitro inhibitory effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. J Ethnopharmacol 2005;96:221-6.

[21] Taweechaisupapong S, Klanrit P, Singhara S, Pitiphat W, Wongkham S. Inhibitory effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to denture acrylic. J Ethnopharmacol 2006;106:414-7.

[22] Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. Asaio J 2000;46:S47-52.

[23] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002;15:167-93.

[24] Locshe W. Chemotherapy of dental plaque infections. Oral Sci Rev 1976;9:65.

[25] Nishihara. T, Koseki. T. Microbial etiology of periodontitis. Periodontology 2000 2004;36:14-26.

[26] Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998;25:134-44.

[27] รวี เถียรไพศาล ความรู้เกี่ยวกับแบคทีเรียกลุ่มสร้างสารสีดำและความสำคัญทางคลินิกในปัจจุบัน. J Dent Assoc Thai 1998;48:56-60.

[28] Socransky S, Haffajee A. Dental biofilms:difficult therapeutic targets. Periodontology 2000 2002;28:12-55.

[29] ปณิดา อินนาจันทร์. ประสิทธิภาพการยับยั้งสเตร็ปโตคอกคัส มิวแทนส์ สายพันธ์จีเอส-5 ในห้องปฏิบัติการของยาสีฟันจำหน่ายทั่วไป. วิทยานิพนธ์ประกาศนียบัตร ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2542.

[30] Moran J, Addy M, Newcombe R. Comparison of an herbal toothpaste with a fluoride toothpaste on plaque and gingivitis. Clin Prev Dent 1991;13:12-5.

[31] Mullally BH, James JA, Coulter WA, Linden GJ. The efficacy of a herbal-based toothpaste on the control of plaque and gingivitis. J Clin Periodontol 1995;22:686-9.

[32] เทอดพงษ์ ตรีรัตน์ และ บุญนิตย์ ทวีบูรณ์. ผลของยาสีฟันต่อการเจริญเติบโตของเสตร็ปโตคอกคัส มิวแทนส์. ว.ทันต 2531: 10-4.

[33] การใช้สมุนไพรอิสานเพื่อการสาธารณสุขมูลฐาน. มหาสารคาม: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตมหาสารคาม 2529.

[34] อัญชนา ลุนพรม. การพัฒนาตำรับเจลผสมสารสกัดจากใบข่อย เพื่อใช้ร่วมกับการรักษาโรคปริทันต์อักเสปและการตรวจสอบความปลอดภัยทางคลินิก. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา] ขอนแก่น : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2548.

[35] Sedlacek MJ, Walker C. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. Oral Microbiol Immunol 2007;22:333-9.

[36] Hata S, Hata H, Miyasawa-Hori H, Kudo A, Mayanagi H. Quantitative detection of *Streptococcus mutans* in the dental plaque of Japanese preschool children by real-time PCR. Lett Appl Microbiol 2006;42:127-31.

[37] Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol 1996;11:266-73.

[38] Walker C, Sedlacek MJ. An in vitro biofilm model of subgingival plaque. Oral Microbiol Immunol 2007;22:152-61.

[39] Rukayadi Y, Kim KH, Hwang JK. In vitro anti-biofilm activity of macelignan isolated from Myristica fragrans Houtt. against oral primary colonizer bacteria. Phytother Res 2008;22:308-12.

[40] Morillo J, Lau L, Sanz M, Herrera D, Silva A. Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. J Periodont Res 2003;38:518–24.

[41] Mangala A, Nadkarni F, Elizabeth M, Jacques. NA, Neil H. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. Microbiol 2002;148:257-66.

[42] Abbas F, Degener JE, Harmsen HJM, Winkelhoff van AJ, Mei vander HC, R. G. Bacterial growth. In : Microbial dynamics in subgingival biofilms. Scholma Druk, Bedum, The Netherlands. 2010:18.

[43] Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. J Dent Educ 2001;65:1028-37.

[44] Lowdin E, Odenholt-Tornqvist I, Bengtsson S, Cars O. A new method to determine postantibiotic effect and effects of subinhibitory antibiotic concentrations. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:2200-5.

[45] Scalarone G, Mikami Y, Kurita N, Ichihara Y, Yazawa K, Miyaji M. Turbidometric characterization of the postantifungal effect: comparative studies with amphotericin B, 5-fluorocytosine and miconazole on *Candida albicans*. Mycoses 1991;34:297-302.

[46] Kaplan JB. Antibiotic-induced biofilm formation. Int J Artif Organs 2011;34:737-51.

[47] พรพรรณ ก่อเกียรติ. ความปลอดภัยทางคลินิก ผลทางคลินิกและทางจุลชีววิทยาของการใช้เจลผสมสารสกัดจากใบข่อยใส่ลงในร่องลึกปริทันต์ของฟันกรามร่วมกับการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2551.

[48] Naoko T, Kazuyuki I, Tetsuo K, Katsuji O. Susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to six antibiotics decreases as biofilm matures. J Antimicrob Chemother 2007;59:59-65.

[49] Mah T, O'Toole G. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol 2001;9:34-9.

รายนามและสถานที่ทำงานของคณะผู้วิจัย

1. รศ. ดร. ทพญ. สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์
   ภาควิชาวินิจฉัยโรคช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์
   มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002
2. ผศ. ดร. ทพ. สมเกียรติ เหลืองไพรินทร์
   ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์
   มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002
3. ผศ. ทพญ. วราภรณ์ สุวรรณรงค์
   ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์
   มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002