

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณบุคคลต่อไปนี้ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์และช่วยเหลือให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จ
ลุล่วงตามวัตถุประสงค์

กลุ่มตัวอย่างทุกท่านที่เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาปริทัศน์วิทยาและหน่วยวิจัยคณะทันตแพทยศาสตร์ ผู้ช่วยทันตแพทย์
ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย

คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่

และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้ ทำให้โครงการวิจัยสามารถ
สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

บทคัดย่อ

ไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติโดยในช่องปากมีสภาวะแวดล้อมที่มีการไหลของของเหลวซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของไบโอฟิล์ม การเกิดคราบจุลินทรีย์ได้เหงือกเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ มีรายงานการศึกษาพบว่าสารสกัดจากไบโอยม์ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ และเชื้อก่อโรคปริทันต์ เช่น เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส และแอกกรีเกทีแบกเทอร์ แอกทีโนมัซิทึม โคมิแทนส์ แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจากไบโอยม์ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้เหงือก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากไบโอยม์ต่อการยับยั้งหรือลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรคในช่องปากจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครโดยทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการ รูปแบบการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจะทำโดยเก็บน้ำลายแบบไม่กระตุ้นจากผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบมาใส่ในภาชนะแล้วเติมคราบจุลินทรีย์ที่เก็บจากผู้ป่วยคนเดียวกันลงไป จากนั้นเติมสารสกัดจากไบโอยม์ที่มีความเข้มข้น 60, 90, 120 และ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในภาชนะแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเชื้อ anaerobic chamber ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2, 4 และ 8 วัน จากนั้นทำการวัดปริมาณไบโอฟิล์มด้วยการย้อม คริสตัล ไวโอเลต และศึกษาปริมาณเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส และเชื้อแบคทีเรียโดยรวมในไบโอฟิล์มได้เหงือกในหลอดทดลองด้วยวิธีรีดไทม์ ฟิชอาร์ ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดจากไบโอยม์สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้เหงือกในหลอดทดลองได้ โดยหากใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากไบโอยม์ 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตั้งแต่เริ่มต้นเพียงครั้งเดียวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทุกคนได้มากกว่าร้อยละ 80 จนถึงวันที่ 8 รวมทั้งยังสามารถลดปริมาณเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ในไบโอฟิล์มได้แตกต่างกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้สารสกัดจากไบโอยม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
มหาวิทยาลัยขอนแก่นเรียบร้อยแล้ว (เลขที่โครงการ HE532209)

Abstract

Microbial biofilms are common in nature. Virtually any fluid environment in which microorganisms are subject to stress or flow can create conditions for biofilm growth. The oral cavity is an ideal environment for biofilm development. The importance of subgingival plaque biofilms for periodontal disease was proposed recently. Recent study found that *Streblus asper* leaf extract (SAE) possessed antibacterial activity towards *Streptococcus mutans* and periodontal pathogen such as *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. However there is no report on inhibitory effects of SAE against subgingival biofilm formation. The purpose of this study was to determine the inhibitory effects of SAE on the biofilm formation of oral pathogens using an *in vitro* subgingival biofilm model. Unstimulated saliva obtained from a periodontitis patient was coated on microtiter plates and then subgingival plaque obtained from the same patient was placed in the plates. SAE at concentrations 60, 90, 120 and 150 mg/ml were added in the wells and the plates were incubated in an anaerobic chamber at 37°C for 2, 4 and 8 days. Biofilm formation was indirectly assessed by staining with 1% crystal violet and measuring crystal violet absorbance, using destaining solution. TaqMan-based real-time polymerase chain reaction was used to quantify *P. gingivalis* and total bacteria in subgingival biofilm. The results showed that SAE exhibited more than 80% anti-biofilm activity at 90 mg/ml. The significant reduction in cell numbers of *P. gingivalis* in subgingival biofilm of test groups were observed when compare to untreated control ($P < 0.05$).

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	i
บทคัดย่อ.....	ii
Abstract.....	iii
สารบัญตาราง.....	vi
สารบัญรูป.....	ix
บทนำ.....	1
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	3
พยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบและจุลชีพที่เกี่ยวข้อง	3
ไบโอฟิล์ม	4
การใช้สมุนไพรในการรักษาโรคในช่องปากและโรคปริทันต์.....	5
สมุนไพรข่อย	6
ระเบียบวิธีการวิจัยและอุปกรณ์การวิจัย.....	9
อุปกรณ์การวิจัย.....	9
เคมีภัณฑ์.....	10
ระเบียบวิธีวิจัย.....	10
1. การคัดเลือกอาสาสมัคร	10
2. การวัดค่าทางคลินิก	11
3. การเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์จากอาสาสมัคร.....	11
4. การเก็บน้ำลาย.....	12
5. การตรวจหาปริมาณเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ และ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ในคราบจุลินทรีย์โดยวิธี ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	12
6. การเตรียมสารสกัดจากใบข่อย	13
7. การศึกษาผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ของเชื้อก่อโรคในช่องปาก.....	13
8. การศึกษาผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อปริมาณเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส และแบคทีเรียทั้งหมดที่อยู่ในไบโอฟิล์มโดยวิธีเรียล ไทม์ พีซีอาร์.....	15
9. การวิเคราะห์ข้อมูล.....	16

	หน้า
ผลการวิจัย.....	17
อภิปรายผล.....	32
สรุปผลการศึกษา.....	35
เอกสารอ้างอิง.....	36
รายนามและสถานที่ทำงานของคณะผู้วิจัย.....	40

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 : แสดงคู่มือโปรแกรม และลำดับเบสของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์ และพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส.....	13
ตารางที่ 2 : แสดงคู่มือโปรแกรม และลำดับเบสของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส และแบคทีเรียโดยรวม.....	16
ตารางที่ 3 : ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครทั้งหมด.....	17
ตารางที่ 4 : แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อย (SAE) ระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ในวันที่ 2.....	20
ตารางที่ 5 : แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ในวันที่ 4 ในกรณีที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 2 วัน โดยไม่ได้สารสกัดจากใบข่อย (model 1)	21
ตารางที่ 6 : แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ในวันที่ 4 ในกรณีที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมใส่สารสกัดจากใบข่อยทุก 2 วัน (model 2)	22
ตารางที่ 7 : แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ในวันที่ 8 ในกรณีที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 2 วัน โดยไม่ได้สารสกัดจากใบข่อย (model 1)	23

หน้า

ตารางที่ 8 : แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยระหว่าง ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากคราบจุลินทรีย์ ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ในวันที่ 8 ในกรณีที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ พร้อมใส่สารสกัดจากใบข่อยทุก 2 วัน (model 2)	24
ตารางที่ 9 : แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยที่ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม จากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ระหว่าง model ต่าง ๆ.....	25
ตารางที่ 10 : แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยที่ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม จากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ระหว่าง model ต่าง ๆ.....	25
ตารางที่ 11 : แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยที่ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม จากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ระหว่าง model ต่าง ๆ.....	26
ตารางที่ 12 : แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อย ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม จากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ระหว่าง model ต่าง ๆ.....	26
ตารางที่ 13 : แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยที่ ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม จากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ระหว่าง model ต่าง ๆ.....	27
ตารางที่ 14 : แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยที่ ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม จากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ระหว่าง model ต่าง ๆ.....	27

หน้า

ตารางที่ 15 : แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยที่ ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม จากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ระหว่าง model ต่าง ๆ.....	28
ตารางที่ 16 : แสดงการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ Dunn's Multiple Comparison Test เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อยที่ ความเข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม จากคราบจุลินทรีย์ของอาสาสมัครทั้ง 5 คน ระหว่าง model ต่าง ๆ.....	28
ตารางที่ 17 : ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบข่อยที่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ได้เหนือกว่าในหลอดทดลองได้ร้อยละ 50 ในแต่ละ model (n=5)	29

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 : แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบข่อย (SAE) ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้เหืองในหลอดทดลอง (N=5)	18
รูปที่ 2 : แสดงค่ามัธยฐาน ค่าสูงสุดและต่ำสุดของปริมาณเชื้อ พอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสที่อยู่ในไบโอฟิล์มหลังจากสัมผัสกับ สารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้สารสกัดจากใบข่อย (N=5)	30
รูปที่ 3 : แสดงค่ามัธยฐาน ค่าสูงสุดและต่ำสุดของปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ที่อยู่ในไบโอฟิล์มหลังจากสัมผัสกับสารสกัดจากใบข่อยความเข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในระยะเวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ไม่ได้สารสกัดจากใบข่อย (N=5)	31