การพัฒนาสารสกัดจากอาโทร์คาปัส ลาคูชา เพื่อใช้กำจัดเชื้อในคลองรากฟัน

Development of *Artocarpus lakoocha* Roxb. for Root Canal Disinfection

พัทรนันท์ เรืองเกียรติกุล

Phattharanan Ruangkiatkul

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Oral Health Sciences
Prince of Songkla University
2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาสารสกัดจากอาโทร์คาปัส ลาคูชา เพื่อใช้กำจัดเชื้อในคลองรากฟัน
ผู้เขียน นางสาวพัทรนันท์ เรืองเกียรติกุล
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.รวี เถียรไพศาล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกวลิน ธรรมสิทธิ์บูรณ์)

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปัทมา ชัยเลิศวณิชกุล)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.รวี เถียรไพศาล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นิมิตร วรกุล

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอแสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนเกี่ยวข้อง

ลงชื่อ.....
(ศาสตราจารย์ ดร.รวี เถียรไพศาล)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางสาวพัทรนันท์ เรืองเกียรติกุล)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวพัทรนันท์ เรืองเกียรติกุล)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาสารสกัดจากอาโทร์คาปัส ลาคูชา เพื่อใช้กำจัดเชื้อในคลองรากฟัน
ผู้เขียน นางสาวพัทรนันท์ เรืองเกียรติกุล
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก
ปีการศึกษา 2555

บทคัดย่อ

สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา จากเปลือก หรือแก่น ต้นมะหาด ถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์ เพื่อเป็นยาต้านเชื้อไวรัส (anti-viral) ยาถ่ายพยาธิ และสารที่ใส่ในครีมบำรุงผิว แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงผลของการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในช่องปาก การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (MBC) *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 ของสารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา และผลของสารดังกล่าวต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาส L929 ของหนู (% cell viability) ที่ 6 ชั่วโมง 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตลอดจนเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน Poloxamer 407 (P407) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อ การฆ่าเชื้อ *E. faecalis* กับ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และคลอร์เฮ็กซิดีน โดยทำการศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อหาความเข้มข้นของสารต่ำที่สุดที่เริ่มเห็นโซนยับยั้ง และทำการศึกษาต่อในฟันมนุษย์รากเดียวที่ถอนออกมา ซึ่งทำการตัดส่วนปลายรากฟัน 4 มิลลิเมตรออก และตัดให้เหลือส่วนรากฟัน 6 มิลลิเมตร ใช้เครื่องมือ Peeso drill เบอร์ 3 กรอภายในคลองรากฟัน ให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.9 มิลลิเมตรที่เท่ากัน กำจัดชั้นสเมียร์ และทำการปราศจากเชื้อ ใส่เชื้อทดสอบ *E. faecalis* บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน แบ่งออกเป็น 10 กลุ่ม กลุ่มละ 12 ซี่ ตามสารที่ใส่ในคลองรากฟัน กลุ่มที่ 1 คือกลุ่มควบคุมบวก ใส่ P407 ความเข้มข้น 20 % w/v กลุ่มที่ 2 UltraCal® XS กลุ่มที่ 3 สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ความเข้มข้น 0.62 % w/v กลุ่มที่ 4 สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ความเข้มข้น 1.25 % w/v กลุ่มที่ 5 สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ความเข้มข้น 4 % w/v กลุ่มที่ 6 สารผสมคลอร์เฮ็กซิดีน ใน P407 ความเข้มข้น 0.0031 % w/v กลุ่มที่ 7 สารผสมคลอร์เฮ็กซิดีน ใน P407 ความเข้มข้น 0.0062 % w/v กลุ่มที่ 8 สารผสมคลอร์เฮ็กซิดีนใน P407 ความเข้มข้น 0.03 % w/v กลุ่มที่ 9 คลอร์เฮ็กซิดีนใน P407 ความเข้มข้น 1% w/v กลุ่มที่ 10 Consepsis® บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และ 5 วัน แล้วใช้เครื่องมือ Peeso drill เบอร์ 4, 5 และ 6 กรอภายในคลองรากฟัน เพื่อเก็บตัวอย่างเนื้อฟันที่ 0.2 มิลลิเมตร 0.4 มิลลิเมตร และ 0.6 มิลลิเมตร บ่มเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แปลผลโดย นับ

จำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. faecalis* ต่อน้ำหนักผงเนื้อฟันที่ชั่งได้ (CFU/mg) จากการศึกษาพบว่า สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา สามารถกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ได้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (MIC) คือ 0.039 % w/v และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (MBC) คือ 0.312 % w/v สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ที่ความเข้มข้น 1.25 % w/v พบลักษณะโซนยับยั้ง และเมื่อใช้สารความเข้มข้นที่มากขึ้น ขนาดของโซนยับยั้งจะเพิ่มขึ้น ในวันที่ 3 และ 5 ของการทดลอง การใช้สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ที่ความเข้มข้น 4 % w/v (100 เท่าของค่า MIC) เป็นความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากกลุ่มแคลเซียมไฮดรอกไซด์สำเร็จรูป (UltraCal® XS) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่การใช้สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ทุกความความเข้มข้น และ UltraCal® XS มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ด้อยกว่าการใช้คลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้น 1 %w/v และ Consepsis® อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 การใช้สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และระยะเวลานานขึ้น จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบบลาส L929 มากขึ้น โดยมีความเป็นพิษน้อยกว่าคลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้น 1 % w/v โดยสรุปสารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ได้ที่ความเข้มข้น 4 % w/v ซึ่งเมื่อใช้ความเข้มข้นที่สูงจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์เช่นกัน จึงจำเป็นต้องใช้ด้วยความระวัง

Thesis Title Development of *Artocarpus lakoocha* Roxb. for Root Canal Disinfection

Author Miss Phattharanan Ruangkiatkul

Major Program Oral Health Sciences

Academic Year 2012

ABSTRACT

Traditionally *Artocarpus lakoocha* Roxb. extract has been used for treatment of antiviral agent, tapeworm infection, and skin whitening cream. However, the knowledge of its antimicrobial activity is limited. The first purpose of this in vitro study was to evaluate the antimicrobial efficacy of *Artocarpus lakoocha* Roxb. extract-poloxamer 407 against *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 and compare with calcium hydroxide (UltraCal® XS) and chlohexidine gluconate. The second purpose was to examine the toxicity of *A. lakoocha* Roxb. using MTT method. The cylindrical dentin block of 6 mm length from extracted single-root teeth were prepared. Standardization of root canal diameters was achieved using Peeso-drill no.3 with 0.9 mm in diameter. These dentin blocks were infected *in vitro* for 21 days with *E. faecalis*. These dentin blocks were randomly divided into 10 groups according to the intracanal medicament used, as follows: Group 1: 20% P407, Group 2: UltraCal® XS, Group 3: *A. lakoocha* Roxb. extract-poloxamer 407 0.62 %w/v, Group 4: *A. lakoocha* Roxb. extract-poloxamer 407 1.25 %w/v, Group 5: *A. lakoocha* Roxb. extract-poloxamer 407 4 %w/v, Group 6: P407 containing chlorhexidine gluconate 0.0031 %w/v, Group 7: P407 containing chlorhexidine gluconate 0.0062 %w/v, Group 8: P407 containing Chlorhexidine gluconate 0.03 %w/v, Group 9: P407 containing chlorhexidine gluconate 1 %w/v and Group 10: Consepsis®. The medicaments were placed into the canal and left there for 3 days and 5 days. After each period, dentine chips were removed with sequential Peeso-drill no.4, 5, and 6 and collected. The amount of bacteria per mg of dentin was determined (CFU/mg). The MIC and MBC of *A. lakoocha* Roxb. extract-poloxamer 407 against *E. faecalis* was 0.039±0 %w/v and 0.312±0 %w/v respectively. At the concentration of 1.25 %w/v produced inhibition zone. There was no significant differences of killing *E. faecalis* between *A. lakoocha* Roxb. extract-Poloxamer 407 4 %w/v compared to UltraCal® XS. Consepsis® showed significantly more effective against *E. faecalis* than both *A. lakoocha* Roxb.

extract-poloxamer 407 4 %w/v and UltraCal® XS. The cytotoxicity of *A. lakoocha* Roxb. was depended on the concentration. The used of high concentration of *A. lakoocha* Roxb. extract-poloxamer 407 should be careful.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ศ.ดร.รวี เถียรไพศาล ผศ.ทพญ.ดร.เกวลิน ธรรมสิทธิ์บูรณ์ ผศ.ดร.จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์ และรศ .ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง ผู้ซึ่งให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ให้คำปรึกษาแนะนำความรู้ต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้ ตลอดจนสละเวลาตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี ขอขอบพระคุณผศ.ดร.ทพญ.สมพิศ คินทรักษ์ ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัยเกี่ยวกับการเลี้ยงเซลล์ ขอขอบพระคุณผศ.ทพญ.เสมอจิต พิธพรชัยกุล ที่ให้คำปรึกษาในเรื่องการเลือกใช้สถิติ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ผู้สนับสนุนทุนอุดหนุนการทำวิจัยครั้งนี้ หน่วยบัณฑิตศึกษา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้การช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในทุก ๆเรื่อง ขอขอบคุณศูนย์วิจัยกลาง คณะทันตแพทยศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยกลางทุกท่านที่อนุเคราะห์เครื่องมือในการทำวิจัย ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการณ์ ภาควิชาโอษฐวิทยา เจ้าหน้าที่ และนักศึกษาหลังปริญญาภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัย และช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ขอขอบคุณเพื่อน และรุ่นพี่นักศึกษาหลังปริญญาสาขาวิทยาเอนโดดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้กำลังใจ และช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ขอขอบพระคุณโรงพยาบาลปากพะยูน จังหวัดพัทลุง โรงพยาบาลต้นสังกัดที่สนับสนุนทุนการลาศึกษาต่อของข้าพเจ้า ขอขอบพระคุณเพื่อนร่วมงานโรงพยาบาลพัทลุงทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือสนับสนุน และแบ่งเบาภาระงานในช่วงการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายขอขอบพระคุณบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัว ที่คอยสนับสนุนในทุกเรื่อง และให้กำลังใจข้าพเจ้าเสมอมา

พัทรนันท์ เรืองเกียรติกุล

สารบาญ

	หน้า
สารบาญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการรูป	(12)
บทที่	
1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การทบทวนวรรณกรรม	2
วัตถุประสงค์	14
2 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	15
3 ผลการวิจัย	26
4 บทวิจารณ์	38
5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก	50
ประวัติผู้เขียน	69

รายการตาราง

ตาราง หน้า

1 พืชในตระกูล *Artocarpus* การใช้ประโยชน์ และแหล่งที่พบ 11

2 ชนิดของ poloxamer 12

3 ลักษณะการใช้ประโยชน์ และความเข้มข้นที่ใช้ของ poloxamer 13

4 รายละเอียด และชนิดสารที่เตรียม 19

5 ความไวของ *E.faecalis* ต่อสารในแต่ละความเข้มข้น 28

6 ค่าเฉลี่ยของ log CFU/mg (±SD) ของกลุ่มทดลอง 29
และค่านัยสำคัญทางสถิติแมนวิทนีย์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

7 ค่านัยสำคัญทางสถิติแมนวิทนีย์ เมื่อเปรียบเทียบ กลุ่มทดลองเป็นคู่ 31

8 ค่าเฉลี่ยของ logCFU/mg (±SD) ของกลุ่มทดลอง และค่านัยสำคัญทางสถิติแมนวิทนีย์ 32
เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แยกตามชั้นเนื้อฟัน

9 ค่านัยสำคัญทางสถิติแมนวิทนีย์ เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มทดลองเป็นคู่ ที่วันที่ 3 34

10 ค่านัยสำคัญทางสถิติแมนวิทนีย์ เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มทดลองเป็นคู่ ที่วันที่ 5 35

11 ผลของสารต่าง ๆ ต่อค่าการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (% cell viability) 36

รายการรูป

รูป		หน้า
1	ลักษณะโครงสร้างของคลอร์เฮ็กซิดีน	6
2	ลักษณะโครงสร้างของ Oxyresveratrol: trans-2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene	8
3	ลักษณะโครงสร้างของ Poloxamer	12
4	เครื่องตัดชิ้นตัวอย่างรุ่น Isomet® 4000 (Buehler Isomet® 4000, Buehler Ltd., USA)	21
5	ภาพชิ้นฟันที่เตรียมเสร็จสมบูรณ์	21
6	ภาพการวางชิ้นฟันลงในจานเพาะเชื้อ	23
7	ภาพโคโลนีของเชื้อ *E. faecalis* บน Blood agar	23
8	ภาพผลการทดสอบความไวของ *E. faecalis* ต่อสารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา	26
9	ภาพผลการทดสอบความไวของ *E. faecalis* ต่อสารต่าง ๆ	27
10	แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ *E. faecalis* ในหน่วย log (CFU/mg) ของแต่ละกลุ่มการศึกษาที่วันที่ 3	30
11	แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ *E. faecalis* ในหน่วย log (CFU/mg) ของแต่ละกลุ่มการศึกษาที่วันที่ 5	30
12	แผนภูมิแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ *E. faecalis* ในหน่วย log (CFU/mg) ของแต่ละกลุ่มการศึกษาแยกตามชั้นเนื้อฟัน ที่วันที่ 3	33
13	แผนภูมิแท่งแสดง ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ *E. faecalis* ในหน่วย log (CFU/mg) ของแต่ละกลุ่มการศึกษาแยกตามชั้นเนื้อฟัน ที่วันที่ 5	33
14	แผนภูมิแท่งแสดง ผลของสารต่าง ๆ ต่อค่าการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์	37
15	ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า CGT (a) และCMT (b) เมื่อ 20% P407 ผสมกับน้ำ และผสม 5% DMSO	39

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การรักษาคลองรากฟัน มีจุดมุ่งหมายเพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียในระบบคลองรากฟัน เพื่อป้องกัน และรักษาการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (calcium hydroxide; $Ca(OH)_2$) เป็นสารที่นิยมใช้เพื่อเป็นยาใส่ในคลองรากฟันระหว่างการรักษาแต่ละครั้ง เมื่อผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์กับน้ำ จะมีค่าความเป็นกรดด่างสูง (pH 12.5-12.8) ส่งผลให้มีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่า การใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมกับน้ำกลั่น ไม่สามารถทำลายเชื้อ *Enterococcus faecalis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นเชื้อที่มักพบในการรักษาคลองรากฟันที่ล้มเหลว[1-4] นอกจากนี้การใส่แคลเซียมไฮดรอกไซด์ในคลองรากฟันเป็นระยะเวลานาน อาจส่งผลลดความแข็งแรงของฟัน ทำให้เสี่ยงต่อการแตกหักอีกด้วย ดังนั้นในปัจจุบันได้มีความพยายามหาสาร และวิธีการต้านเชื้อ แบคทีเรีย ที่จะสามารถนำมาใช้ทดแทนแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เช่น คลอ ร์เฮ็กซิดีน การใช้เลเซอร์ (photodynamic therapy; PDT) เป็นต้น โดยเฉพาะคลอร์เฮ็กซิดีน ที่มีหลายการศึกษาพบว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis*[1, 3, 5, 6] แต่อย่างไรก็ตามคลอร์เฮ็กซิดีน ไม่สามารถละลายส่วนของเนื้อเยื่อที่อาจหลงเหลืออยู่ในคลองรากฟันได้ (tissue dissolution capability)[7] และหากใช้ร่วมกับสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ จะทำเกิดเป็นตะกอนสีส้มน้ำตาลของสารก่อมะเร็งคือ (parachloroaniline; PCA)[8]

ในปัจจุบันทางด้านการแพทย์ และสาธารณสุขของไทย มีการใช้ และพัฒนาสารสกัดจากสมุนไพรกันอย่างแพร่หลาย แต่ในทางทันตกรรมโดยเฉพาะสาขาวิทยาเอนโดดอนต์ ยังมีการศึกษาในเรื่องสารสกัดจากสมุนไพรอยู่น้อยมาก ซึ่งสารสกัดจากสมุนไพรที่น่าสนใจ และมีในประเทศไทยนั้น เช่น สารสกัดจากแก่นไม้ต้นมะหาด หรือปวกหาดนั้น เริ่มนำมาใช้ในทางการแพทย์ เพื่อเป็นยาต้านเชื้อไวรัส (anti-viral) โดยยับยั้งการเจริญเติบโตของ herpes simplex virus (HSV)[9] นอกจากนี้ยังใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ และสารที่ใส่ในครีมบำรุงผิว [10] แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงสารสกัดชนิดนี้ในเรื่องผลของการต้านเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นหากสารสกัดชนิดนี้สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ และสามารถเตรียมให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมต่อการใช้ นับว่าเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจที่จะประยุกต์ใช้ในทางการรักษาทางทันตกรรม

การทบทวนวรรณกรรม

1. การติดเชื้อในคลองรากฟัน

การติดเชื้อในระบบคลองรากฟันสามารถแบ่งตามเวลาที่เชื้อแบคทีเรียเข้าสู่คลองรากฟันได้เป็น

1. **Primary infection** เชื้อแบคทีเรียที่เข้าสู่คลองรากฟันและทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อใน ซึ่งในระยะแรกของโรคมักพบเชื้อในกลุ่ม facultative anaerobe ต่อมาจะพบเชื้อกลุ่ม anaerobe เป็นส่วนใหญ่โดยคิดเป็นร้อยละ 94 โดยเชื้อที่พบคือ กลุ่มแกรมลบ เช่น *Fusobacterium, Dialister, Porphyromonas, Prevotella, Tannerella, Treponema, Campylobacter* และ *Veillonella* กลุ่มแกรมบวก เช่น *Parvimonas, Filifactor, Pseudoramibacter, Actinomyces, Peptostreptococcus, Streptococcus, Pripionibacterium* และ *Eubacterium*[11, 12] ฟันที่มีการตายของเนื้อเยื่อในร่วมกับมีรอยโรคปลายรากฟัน และมีอาการปวด มักจะพบเชื้อ *Bacteroides melaninogenicus* และอาจพบ *Peptostreptococcus anaerobius*, *Campylobacter sputorum*, *Peptostreptococcus micros* และ *Eubacterium*[11]
2. **Secondary infection** เชื้อแบคทีเรียที่พบ ไม่ใช่เชื้อ แบคทีเรียกลุ่มแรกที่เข้ามาตั้งแต่ primary infection โดยเข้ามาภายหลัง หรือระหว่างการรักษาคลองรากฟันที่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย
3. **Persistent infection** เป็นเชื้อแบคทีเรียที่อาจพบใน primary infection หรือ secondary infection ก็ได้ที่ยังคงมีชีวิตอยู่ในคลองรากฟัน ภายหลังจากการรักษาคลองรากฟันแล้ว และสามารถทนต่อสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อที่ใช้ในระหว่างการรักษา

ทั้ง secondary และ persistent infection นั้นเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้การรักษาคลองรากฟันเกิดความล้มเหลว (endodontic treatment failure) ซึ่ง *Enterococcus faecalis* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อยที่สุดในกรณีการรักษาคลองรากฟันความล้มเหลว

Enterococcus faecalis

Enterococcus species เป็นเชื้อกลุ่ม facultative anaerobes แกรมบวก รูปร่างกลมหรือรี (cocci) ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน โดยการเจริญเติบโตจะเป็นแบบออกซิเดชัน และหากขาดออกซิเจนก็สามารถเจริญเติบโตแบบเฟอร์เมนเทชัน (fermentation) ได้

เช่นกัน สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (ดิน น้ำ อาหาร) ในมนุษย์จะพบในระบบทางเดินอาหาร สปีชี่หลัก ๆ ที่พบคือ *E. faecalis* และ *E. faecium* นอกจากนี้ยังสามารถพบในระบบสืบพันธุ์ของเพศหญิง[13]

E. faecalis เป็นเชื้อประจำถิ่น มักพบในรอยโรค persistent periradicular lesions หรือ persistent endodontic infections[14, 15] แต่ในปัจจุบันยังไม่ทราบชัดเจนถึงกระบวนการที่เชื้อชนิดนี้ทำให้รอยโรคปลายรากฟันไม่หาย โดยมีสมมติฐานที่น่าเป็นไปได้[16] คือ

1. *E. faecalis* เป็น primary colonizer ในฟันที่มีการติดเชื้อของระบบคลองรากฟัน และยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้แม้ได้รับการรักษาคลองรากฟันแล้ว เนื่องจากเป็นเชื้อที่สามารถคงชีวิตอยู่ได้ในภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ภาวะเป็นด่างสูง (extrerme alkaline) และ salt concentration
2. *E. faecalis* เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่เข้ามาในคลองรากฟันภายหลังการรักษาคลองรากฟันแล้ว (opportunistic canal invaders) เนื่องจากมีหลายการศึกษาที่พบปริมาณ *E. faecalis* ที่ต่ำในกรณีการติดเชื้อในคลองรากฟันครั้งแรก (primary infection) และแทบไม่พบในรอยโรคฟันผุ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยการเก็บน้ำลายมนุษย์มาทดสอบหา *E. faecalis* พบว่า 21.8% ตรวจพบ *E. faecalis* และไม่พบเลยในผู้ที่มีสุขภาพช่องปากที่ดี (good oral hygiene) ซึ่งหมายความว่า *E. faecalis* ไม่ได้เป็นเชื้อประจำถิ่นที่ปรากฏอยู่ตลอดเวลาในช่องปาก

Survival and virulence factors

E. faecalis มี virulence factors คือ lytic enzyme, cytolysin, aggregation substances และ lipoteichoic acid เป็นต้น

1. *E. faecalis* สามารถคงอยู่ในภาวะที่ขาดอาหาร (starvation) ได้เป็นเวลานาน โดยสามารถคงอยู่ในภาวะที่ขาดอาหาร (glucose-limited และ phosphate-limited media) ได้นานกว่า 4 เดือน นอกจากนี้หากมีซีรัมที่มาจาก alveolar bone และ เอ็นยึดปริทันต์ แม้เพียงร้อยละ 1 ก็สามารถเจริญเติบโตได้ จึงอาจเป็นสาเหตุทำให้ยังเกิดรอยโรครอบปลายรากฟันแม้ทำการรักษาคลองรากฟันไปแล้ว[17]
2. *E. faecalis* สามารถเข้าไปในท่อเนื้อฟัน (dentinal tubule)[1, 4, 6, 14] ซึ่งจะผลิตเอนไซม์ serine protease gelatinase และ collagen-binding protein เพื่อการยึดเกาะกับคอลลาเจนชนิดที่ 1 (type I collagen) ในเนื้อฟันนอกจากนี้การมี tissue fluid ที่มีส่วนประกอบของซีรัม จาก

เนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน ยังช่วยส่งเสริมให้เกิดการยึดเกาะกับ unmineralized collagen ในขณะที่ซีรัมจะยับยั้งการยึดเกาะของ *S. gordonii* และ *S. mutans*[14]

3. *E. faecalis* สามารถสร้างแผ่นคราบจุลินทรีย์ (biofilm) ที่ทำให้สามารถต้านต่อการ phagocytosis ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมนุษย์ ยาหรือสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อได้มากกว่าปกติถึง 1,000 เท่า โดย *E. faecalis* ในคลองรากฟันสามารถสร้างเป็นแผ่นคราบจุลินทรีย์ได้ในระยะเวลาเพียง 2 วันแม้ว่าจะมีการใส่สารต้านเชื้อ (intracanal medication) หรือไม่ก็ตาม และเมื่อเวลาผ่านไป 86 วัน ก็ยังคงสามารถมีชีวิตอยู่ได้[18]
4. *E. faecalis* สามารถทนต่อภาวะเป็นด่างสูงได้ เนื่องจาก *E. faecalis* สามารถคงระดับความเป็นกรดด่างภายในเซล์ที่ทำให้เกิดความสมดุลได้ ด้วยกระบวนการนำโปรตอนเข้าสู่เซลล์ (proton pump) ผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อให้ค่าระดับความเป็นกรดด่างในเซลล์ต่ำลง[19] จึงมีหลายการศึกษาพบว่าแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการกำจัดเชื้อชนิดนี้ นอกจากนี้การศึกษาการเจริญเติบโตของ *E. faecalis* ที่ระดับค่าความเป็นกรดด่างต่าง ๆ กัน พบว่า *E. faecalis* ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ที่ระดับ pH ตั้งแต่ 11.5 ขึ้นไป[18, 20]

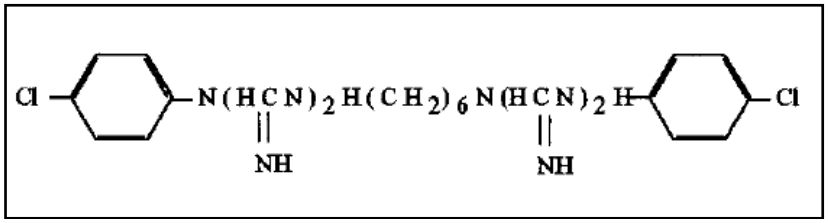
2. การใส่ยาคลองรากฟัน (intracanal medicament)

เมื่อการรักษาคลองรากฟันไม่สามารถทำการรักษาเสร็จภายใน 1 ครั้ง ช่วงเวลาระหว่างก่อนการนัดครั้งต่อไป ควรมีการใส่สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ เพื่อป้องกันการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่อาจหลงเหลืออยู่ในระบบคลองรากฟัน และมีผลกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้เช่นกัน ในปัจจุบันมีการใช้สารหลายชนิด เพื่อใส่ในคลองรากฟัน เช่น สารฟีนอล (phenol) แคลเซียมไฮดรอกไซด์ คลอร์เฮ็กซิดีน (chlorhexidine gluconate) ยาต้านจุลชีพ (antibiotics) เป็นต้น แคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นสารที่นิยมใช้ที่สุด ซึ่งมีสูตรทางเคมีคือ $Ca(OH)_2$ มีลักษณะเป็นผงสีขาว ไม่มีกลิ่น ละลายน้ำได้น้อย (low solubility in water) คือประมาณ 1.2 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และไม่ละลายในแอลกอฮอล์ มีค่า pH ประมาณ 12.5-12.8[21] เมื่อแคลเซียมไฮดรอกไซด์มีการแตกตัวจะได้เป็น แคลเซียม และไฮดรอกซิลอิออน ซึ่งสามารถแพร่ผ่านท่อเนื้อฟันได้ ทำให้ในคลองรากฟัน และท่อเนื้อฟันที่ปกติมีค่า pH อยู่ในช่วง 6.4-7 มีค่า pH ที่สูงขึ้น โดยเมื่อ 4 สัปดาห์พบว่าท่อเนื้อฟันจะมีค่า pH อยู่ในช่วง 7.4-11 โดยท่อเนื้อฟันบริเวณที่ใกล้กับคลองรากฟันจะมีค่า pH อยู่ในช่วง 8-11 ซึ่งสูงกว่าบริเวณที่ไกลออกไปทางด้านผิวฟันซึ่งมีค่า pH อยู่ในช่วง 7.4-9[22] ซึ่งแบคทีเรียโดยส่วนใหญ่ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ที่ pH ตั้งแต่ 11 ขึ้นไป[21] โดยไฮดรอกซิลอิออนจะทำให้เกิดการทำลายฟอสโฟลิพิด (lipid peroxidation) ที่เป็นส่วนประกอบ

ของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย และทำลายพันธะอิออนิก ในโครงสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย ส่งผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์แบคทีเรีย[23] และมีคำแนะนำว่าควรใส่แคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นเวลา 7 วันขึ้นไป จึงจะมีประสิทธิภาพในการ กำจัดเชื้อแบคทีเรียในคลองรากฟัน[24] แต่การใส่แคลซียมไฮดรอกไซด์ในคลองรากฟันเป็นระยะเวลานานจะทำให้เกิดการสูญเสียน้ำ (dehydration) ทำให้ระดับค่า pH ลดลง จึงทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียลดลงด้วยเช่นกัน [5] และหากใส่เป็นระยะเวลานานตั้งแต่ 2 เดือนขึ้นไป อาจส่งผลลดความแข็งแรงของฟัน และทำให้ฟันเสี่ยงต่อการแตกหักได้อีกด้วย เนื่องจากแคลเซียมไฮดรอกไซด์ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในเนื้อฟันมีระดับที่สูงขึ้น ซึ่งในสภาวะที่เป็นด่าง (alkaline) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารอินทรีย์ (denature of organic support) ในเนื้อฟัน ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญต่อการยึดกันของไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite crystal) และคอลลาเจน (collagen network) ทำให้เนื้อฟันมีความแข็งแรงลดลง (fracture strength)[25] มีหลายการศึกษาพบว่า การใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมกับน้ำกลั่น ไม่สามารถ กำจัดเชื้อ *E. faecalis* ได้ [1-4] นอกจากนี้มีการศึกษานำสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นในน้ำกลั่น (Saturated calcium hydroxide solution) มาผสมโดยตรงกับ *E. faecalis* (5×10^7 CFU) ในอัตราส่วนหนึ่งต่อหนึ่ง พบว่าสามารถฆ่าเชื้อได้ในเวลา 5-60 นาที แต่เมื่อผสมผงเนื้อฟันเข้าไปในอัตราส่วนหนึ่งต่อหนึ่งต่อหนึ่ง (แคลเซียมไฮดรอกไซด์ต่อเชื้อต่อผงเนื้อฟัน) จะมีผลลดประสิทธิภาพของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ผงเนื้อฟันไม่มีผลลดประสิทธิภาพของคลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เลย โดยผู้ศึกษาให้เหตุผลว่าผงเนื้อฟันมีผลบัฟเฟอร์ความเป็นกรดเบสของแคลเซียมไฮดรอกไซด์[26]

คลอ ร์เฮ็กซิดีน เป็นสารจำพวก bisguanides โดยมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด (broad spectrum efficacy) มีผลทำลายชั้นฟอสโฟไลพิด (phospholipid bilayer) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย โดยที่ความเข้มข้นต่ำจะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (bacteriostatic effect) เนื่องจากมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane integrity) และที่ความเข้มข้นสูงจะมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (bactericidal effect) เนื่องจากมีผลทำให้เกิดการแตกของเซลล์ และเกิดการตกตะกอนของโปรตีน และกรดนิวคลิอิก (precipitation of protein and nucleic acid)[27] ในทางทันตกรรมคลอ ร์เฮ็กซิดีน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1-0.2 จะนำมาใช้เป็นน้ำยาบ้วนปากเพื่อควบคุณแผ่นคราบจุลินทรีย์ในช่องปาก และที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ใช้เป็นน้ำยาล้างคลองรากฟัน และยาใส่ในคลองรากฟัน [7] โดยหลายการศึกษาพบว่าคลอ ร์เฮ็กซิดีนมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ได้ดีมาก [1, 3, 5, 6] คลอ ร์เฮ็กซิดีนสามารถคงอยู่ในเนื้อฟันและมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้นาน (substantive antimicrobial activity) โดยการศึกษาระยะเวลาการคงอยู่ของคลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ในฟันวัว พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 3

สัปดาห์ 6 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์ ปริมาณคลอร์เฮ็กซิดีนที่พบในผงเนื้อฟัน คือ ร้อยละ 0.0023 ร้อยละ 0.0016 และร้อยละ 0.0010 ตามลำดับ และยังคงมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ประสิทธิภาพก็ลดลงตามระยะเวลาที่นานขึ้นเช่นกัน [28] และการศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ของน้ำยาล้างคลองรากฟันคลอ ร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ทั้งชนิดเจล และสารละลาย ในฟันมนุษย์ที่ถอนออกมาพบว่า คลอ ร์เฮ็กซิดีนมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* และสามารถคงฤทธิ์ในการกำจัดเชื้อได้นานถึง 1 สัปดาห์ โดยผู้ศึกษาให้ความเห็นว่าเนื่องจากมีการดูดซับคลอร์เฮ็กซิดีนเข้าไปในเนื้อฟัน และค่อย ๆ ปล่อยออกมาในช่วงเวลาดังกล่าว[29] อย่างไรก็ตามคลอ ร์เฮ็กซิดีนมีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถละลายส่วนของเนื้อเยื่อที่อาจหลงเหลืออยู่ในคลองรากฟันได้ (tissue dissolution capability)[7] และหากใช้ร่วมกับสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่นิยมใช้เป็นน้ำยาล้างคลองรากฟัน จะเกิดตะกอนสีส้มน้ำตาลของสารก่อมะเร็งคือ Parachloroaniline (PCA)[8]



รูปที่ 1 ลักษณะโครงสร้างของคลอร์เฮ็กซิดีน[27]

การศึกษาความไวของ *E. faecalis* ต่อสารต่างๆ ในโมเดลฟันในการศึกษานี้ ดัดแปลงจากการศึกษาของ Haapasalo และ Ørstavik ในปี 1987 ซึ่งใช้ระยะเวลาในการบ่มฟันกับ *E. faecalis* เป็นเวลา 21 วัน และใช้หัวกรอฟันในการเก็บตัวอย่าง เป็นการเลียนแบบสภาวะแวดล้อมของคลองรากฟัน โดยใช้ฟันมนุษย์ที่ถอนออกมา การศึกษาผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในโมเดลฟันของสาร มีวิธีการเก็บตัวอย่างหลายแบบซึ่งมีข้อดีข้อด้อยที่แตกต่างกัน เช่น

- การใช้แท่งกระดาษรูปกรวย (paper point) มีข้อดีคือ สะดวก แต่สามารถทดสอบได้เฉพาะเชื้อที่อยู่ในคลองรากฟันเท่านั้น ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเชื้อที่อยู่ในท่อเนื้อฟันชั้นในได้
- การใช้ hand file จะสามารถทดสอบเชื้อที่อยู่ในคลองรากฟัน และท่อเนื้อฟันชั้นที่อยู่ติดกับคลองรากฟันบางส่วนได้ แต่ไม่สามารถควบคุมบริเวณ และปริมาณของ เนื้อฟันที่จะเก็บตัวอย่างได้
- การใช้หัวกรอ สามารถทดสอบได้เชื้อที่อยู่ในคลองรากฟัน และท่อเนื้อฟันในแต่ละชั้นที่ต้องการทดสอบได้ โดยการเพิ่มขนาดของหัวกรอตามอัตราส่วนที่ต้องการได้ แต่มีข้อด้อย คือ วิธีการยุ่งยากและต้องใช้เวลา

จากการศึกษาของ Haapasalo และ Ørstavik ในปี 1987 ซึ่งเป็นต้นแบบในการศึกษาทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในท่อเนื้อฟัน (disinfection of dentinal tubules) พบว่าระยะเวลาการในการใส่เชื้อในคลองรากฟันที่แตกต่างกัน จะทำให้ระยะทางที่เชื้อเข้าสู่ท่อเนื้อฟันแตกต่างกัน โดยหากใส่ไป 1 วัน พบว่า *E. faecalis* จะเข้าสู่ท่อเนื้อฟันเป็นระยะทาง 300-400 ไมโครเมตร และหากใส่ไปเป็นเวลา 3 สัปดาห์ *E. faecalis* จะเข้าสู่ท่อเนื้อฟันได้มากขึ้น โดยอาจเข้าไปได้ถึง 800-1,000 ไมโครเมตร นอกจากนี้ระยะเวลาที่ใช้เพื่อให้ *E. faecalis* เข้าสู่ท่อเนื้อฟัน พบว่าเมื่อผ่านไป 3 สัปดาห์ สามารถเข้าสู่ท่อเนื้อฟันได้ในทั้งระยะทาง และปริมาณที่มาก และแม้ว่าจะใช้เวลาเกิน 3 สัปดาห์ระยะทางที่ *E. faecalis* เข้าสู่ท่อเนื้อฟันก็จะเพิ่มเพียงเล็กน้อยเท่านั้น[4] ดังนั้นในการศึกษาฉบับนี้จึงเลือกบ่มฟันกับ *E. faecalis* เป็นเวลา 21 วัน

จากกลไกการทำลายเชื้อของแคลเซียมไฮดรอกไซด์จะขึ้นอยู่กับระดับค่าความเป็นกรดด่างโดยตรง มีศึกษาวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่เนื้อฟันบริเวณด้านนอกคลองรากฟันที่ใส่แคลเซียมไฮดรอกไซด์โดยไม่มีการเปลี่ยนสาร ที่เวลาต่าง ๆ ในสามบริเวณคือ Cervical middle และ apical ของรากฟัน พบว่าระดับค่าความเป็นกรดด่าง จะสูงที่สุด คือมีค่าระหว่าง 9-10 เมื่อใส่สารไป 3 วัน และจะลดลงและเริ่มคงที่ตั้งแต่วันที่ 18 จนจบระยะเวลาที่ศึกษา 120 วัน ดังนั้นช่วงวันที่ 3 น่าจะเป็นระยะเวลาที่สามารถกำจัดเชื้อได้ดีที่สุดของแคลเซียมไฮดรอกไซด์[30] ในการศึกษานี้จึงเลือกเวลาทำการทดลองเริ่มต้นที่ 3 วัน

3. สารสกัดจากอาโทร์คาปัส ลาคูชา หรือสารสกัดจากมะหาด

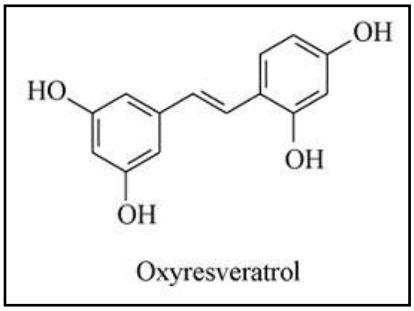
มะหาด เป็นชื่อที่เรียกกันในภาคกลาง และมีชื่ออื่นๆ เช่น กาแย ตาแป ตาแปง (นราธิวาส) มะหาดใบใหญ่ (ตรัง) เป็นต้น และเป็นต้นไม้ประจำจังหวัดกาฬสินธุ์ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Artocarpus lakoocha* Roxb. เป็นไม้ยืนต้นที่อยู่ในสกุล *Artocarpus* พืชสกุลนี้มีหลายชนิดเช่น ขนุน หม่อน และสาเก เป็นต้น ซึ่งมีการนำส่วนต่าง ๆ มาใช้เป็นอาหาร และยาแผนโบราณ เช่น ยาถ่ายพยาธิ ยารักษาแผลอักเสบ แผลพุพอง และโรคมาลาเรีย เป็นต้น มะหาดสามารถพบในบริเวณที่มีอากาศชื้น เช่น Himalayan ในประเทศอินเดีย เนปาล ศรีลังกา ทางตอนใต้ของประเทศจีน และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นต้น ในประเทศไทยมีรายงานพบพืชนี้ จำนวนประมาณ 14-15 ชนิด[10] ชนิดของพืชสกุลนี้ การใช้ประโยชน์ และแหล่งที่พบแสดงดังตารางที่ 1

ส่วนต่างๆของมะหาดที่สามารถนำมาใช้ในทางการแพทย์[10] เช่น

1. ราก ใช้เป็นยาแก้ไข้ ยาถ่ายพยาธิ และยารักษานิ่วในทางเดินปัสสาวะ
2. เปลือกต้น ใช้เป็นยาแก้ไข้

3. เนื้อไม้ ใช้เป็นยาแก้ท้องอืด ยารักษาผื่นผิวหนัง ยารักษาอาการ ผิดปกติของระบบทางเดินอาหารเรื้อรังในเด็ก ซึ่งมีอาการขาดอาหาร น้ำหนักลด เนื่องจากมีพยาธิตัวกลม

สารที่พบจากส่วนต่าง ๆ ของต้นมะหาดมีหลายชนิด อาจแบ่งกลุ่มตามลักษณะโครงสร้างเป็น กลุ่มสารเฟลโวนอยด์ (flavonoids) เช่น artocarpin, norartocarpin, cycloartocarpin และ norcycloartocarpin เป็นต้น กลุ่มสารสติลบินอยด์ (stilbenoids) ที่มีฤทธิ์ชีวภาพหลายอย่าง สารที่พบในปริมาณมากที่สุดในสารสกัดจากมะหาดคือ ออกซิเรสเวอราทรอล (Oxyresveratrol: trans-2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) โดยมีโครงสร้างทางเคมีแสดงดังรูปที่ 2[9, 10, 31] กลุ่มสารไทรเทอร์พินอยด์ (triperpenoids) และสเตียรอยด์ นอกจากนี้ยังพบกลุ่มสารประกอบโพลีฟีโนลิกอื่นๆ เช่น ฟีนอล (phenol) และ แทนนิน (tannins) ที่มีความสำคัญในเรื่อง antioxidant activity[32] ปวกหาดเป็นชื่อที่ใช้เรียกสารสกัดจากแก่นไม้ต้นมะหาด เนื่องจากปวกหาดนั้นมี ออกซิเรสเวอราทรอล เป็นสารหลัก ดังนั้นประโยชน์ที่ใช้จึงมาจากฤทธิ์ของสารนี้



รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของ Oxyresveratrol: trans-2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene

ในปัจจุบันมีการศึกษามากมายถึงคุณสมบัติของสารสกัดออกซิเรสเวอราทรอลนี้เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ ดังนี้

1. ยาถ่ายพยาธิ (anthelmintic effect) โดยเฉพาะพยาธิตัวตืด เช่น ตืดวัว และตืดหมู ซึ่งแพทย์พื้นบ้านจะนำส่วนเนื้อไม้บริเวณแก่นไม้จากต้นมะหาดที่มีอายุตั้งแต่ 5 ปีขึ้นไป มาสับเป็นชิ้น ๆ แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด และนำส่วนตะกอนสีขาวเหลืองมาผึ่งไว้ให้แห้ง ใช้ผงที่ได้ประมาณ 1-2 ช้อนชา ชงกับน้ำเย็น หรือนำผงไปคลุกกับน้ำมะนาวเพื่อปั้นเป็นยาลู กกลอนเพื่อสะดวกในการรับประทาน[10] นอกจากนี้ได้มีการศึกษาผลต่อพยาธิใบไม้ตับที่แยกมาจากวัว พบว่าสารสกัดจากมะหาด มีผลต่อความสมดุลของการดูดซึมของพยาธิ (osmotic imbalance) ทำให้เกิดการบวม ซึ่งจะมีผลลดการเคลื่อนไหว และทำลายพยาธิ[33]
2. ต้านเชื้อไวรัส (anti-viral) โดยยับยั้งการเจริญเติบโตของ herpes simplex virus (HSV) ซึ่งเป็น DNA virus ที่มี 2 ชนิดคือ HSV1 และHSV2 ซึ่งจะยับยั้งกระบวนการ viral replication

ทั้งระยะแรก และระยะหลัง ของ HSV1 และHSV2 โดยที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลยังยับยั้งการผลิตโปรตีนในระยะหลังของ HSV1 (late viral protein synthesis)[9, 34] และการทดลองในหนูพบว่าการทา 10% oxyresveratrol cream จำนวน 3 ครั้งต่อวันให้ผลเหมือนกับการทา 5% acyclovir cream จำนวน 5 ครั้งต่อวัน ในการรักษา cutaneous HSV infection[35]

3. ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) โดยการยับยั้งการผลิต proinflammatory mediators: nitric oxide (NO) ใน lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophage cell ในหนูทดลอง[36] โดยยับยั้งการแสดงออก (expression) ของเอนไซม์ iNOS (inducible nitric oxide synthase)[10]
4. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการผลิตเมลานิน โดยมีการศึกษาในสัตว์ทดลอง และอาสาสมัคร พบว่าสารออกซิเรสเวอราทรอล เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิตเมลานิน จึงใช้เป็นส่วนประกอบในครีมทาผิวเพื่อช่วยให้ผิวขาว (skin-whitening agent) ในตำหรับเครื่องสำอางหลายชนิด[31, 37]
5. เป็นสารยับยั้งการรวมตัวของออกซิเจน หรือสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และเป็น free radical scavenger ซึ่งประสิทธิภาพจะเพิ่มขึ้นหากมีปริมาณกลุ่ม hydroxyl ที่มาก[31, 38]

มีการศึกษาสารสกัดจากมะหาดที่ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียน้อยมาก โดยในปีพ.ศ. 2525 มีรายงานการศึกษาสารสกัดแก่นมะหาดด้วยเอธานอลโดยวิธี agar diffusion-disc method พบว่าสารสกัดขนาด 10,000 ไมโครกรัม/ดิสก์ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Mycobacterium smegmatis* โดยแสดงโซนยับยั้งกว้างกว่า 19 มิลลิเมตร[10] มีการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity) ในพืชชนิดอื่น ๆ ในตระกูลเดียวกันนี้ เช่น สารสกัดจากแก่นไม้ต้นขนุน (*Arto*carpus *heterophyllus*) ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus, Bacillus coagulans, Bacillus megaterium, Bacillus subtilis, Lactobacillus casei, Micrococcus luteus, Micrococcus roseus, Staphylococcus albus, Staphylococcus aurens, Staphylococcus epidermidis Streptococcus faecalis, Streptococcus pneumoniae, Agrobacterium tumaefaciens, Citrobacter freundii, Enterobacter aerogenes, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Neisseria gonorrhoeae, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhi, Salmonella typhimurium, Serratia marcescens, Trichomonas vaginalis*[39] นอกจากนี้ยังยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดฟันผุ (primary cariogenic bacteria) เช่น *Streptococcus mutans* ที่ความเข้มข้น 6.25-12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร *Actinomyces* species ที่ความเข้มข้น 3.13-12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ

Lactobacillus species ที่ความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และยับยั้งการสร้างแผ่นคราบจุลินทรีย์โดยแบคทีเรีย กลุ่ม Streptococci[40]

การทดสอบความเป็นพิษ

ข้อมูลจากสำนักงานสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่าเมื่อให้หนูกินผง ปวกหาดในปริมาณ 100 หรือ 200 มิลลิกรัมต่อครั้ง จำนวน 2 ครั้ง โดยห่างกัน 10 ชั่วโมง พบว่าไม่เป็นพิษต่อตับ ไต และทางเดินอาหาร และขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) คือ 5.74 กรัม/กิโลกรัม และการให้หนูขาวกินยา 1.25 กรัม/กิโลกรัม ไม่เกิดพยาธิสภาพใด ๆ

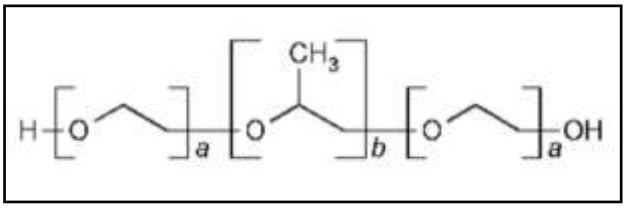
สารออกซิเรสเวอราทรอล (Oxyresveratrol) นั้นไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็ง แต่สารที่ได้จากการเปลี่ยนสภาพ (transformation) เกือบทุกตัวเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (cancer cell line) โดยพบว่าการที่มี methoxy group มาจับกับ aromatic ring จะทำให้เกิดพิษ[37] และการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของลิง (vero cell, ATCC CCL81) พบว่าความเข้มข้นของออกซิเรสเวอราทรอล ที่ทำให้ cell viability ลดลงร้อยละ 50 คือ 237.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร[9]

ตารางที่ 1 พืชในตระกูล *Artocarpus* การใช้ประโยชน์ และแหล่งที่พบ[10, 31]

	Synonyms	**Common names, (ชื่อไทย)**	**Uses**	**Original and geographical distribution**
1. *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg	*Artocarpus camansi* Blanco Artocarpus communis J.R.&G. Forst. *Artocarpus incise*	Breadfruit (สาเก ขนุนสำปะลอ)	Fruit pulp tonic for liver, leaves to treat liver cirrhosis, hypertension and diabetes	Native to pacific and Tropical Asia, Indonesia, Papua New Guinea
2. *Artocarpus chama* Buc.-Ham.	*Artocarpus chaplasha* Roxb. *Artocarpus melinoxylus* Gagnep	Chaplasha (หาดส้าน)	-	India, Burma
3. *Artocarpus elasticus* Reinw. Ex Blume	-	กะออก กะเอาะ	Bark in inflammation and female contraception, latex in dysentery, leaves to treat tuberculosis	South-East Asia, West Malaysia
4. *Artocarpus gomezianus* Wall. Ex Trecul.	*Artocarpus pomiformis* Teijsm & Binn	Tampang burung (หาดหนุน ตำปัง)	-	Western part of Indonesia
5. *Artocarpus heterophyllus* Lam.	*Artocarpus brasiliensis* Gomez *Artocarpus integra, Artocarpus jaca* Lam. *Artocarpus integrifolia* auct. *Artocarpus maxima* Blanco *Artocarpus philippensis* Lamk	Jackfruit (ขนุน)	Fruits edible, roots in diarrhea and fever, leaves as antisyphilic and vermifuge, ulcers and wound healing, leaves and stem barks used to treat anemia, asthma, dermatitis, diarrhea, cough	Native to Western Ghats India, Introduced in South-East Asian region
6. *A integer* (Thunb.) Merr.	*Artocarpus champeden* (Lour.) Stokes *Artocarpus integrifolius* L.f. *Artocarpus polyphema* Persoon	จำปาดะ	Fruits edible	Burma, Peninsular Thailand, Peninsular Malaysia, Sumatra, Archipelago
7. *Artocarpus lacucha* Buch.-Ham.	*Artocarpus lakoocha* Roxb.	Monkeyjack, Lakoocha (มะหาด)	Bark chewed like betel nut used to treat skin ailments	Native to humid sub. Himalayan, Regions of India, South China, South-East Asia

4. Poloxamer[41]

Poloxamer เป็นสารที่มีสีขาว ไม่มีกลิ่นและรส (odorless and tasteless) มีชื่อเรียกได้หลายอย่างเช่น Lutrol, Monolan, Pluronic, Poloxalkol เป็นต้น มีชื่อทางเคมี คือ α-Hydro-ω-hydroxypoly(oxyehtylene)poly(oxypropylene) ซึ่งมีหลายชนิด (grade) โดยแต่ละตัวมีส่วนประกอบที่เหมือนกัน ต่างกันตรงปริมาณของ propylene oxides (PO) และ ethylene oxides (EO) ที่ใส่ในกระบวนการผลิต โดยโครงสร้างจะประกอบด้วยส่วน hydrophilic polyoxyethylene อยู่ด้านนอก และ hydrophobic polyoxypropylene อยู่ตรงกลาง ลักษณะของโครงสร้าง แสดงดังรูปที่ 3 ซึ่ง Poloxamer 407 (P407) จะมี b มากกว่า 14



รูปที่ 3 ลักษณะโครงสร้างของ Poloxamer

การเรียกชื่อ poloxamer จะเรียก poloxamer แล้วตามด้วยตัวเลข 3 ตัว โดย 2 ตัวแรกเมื่อนำมาคูณ 100 จะเป็นน้ำหนักของโมเลกุล polyoxypropylene โดยประมาณ และตัวเลขตัวสุดท้ายเมื่อนำมาคูณ 10 จะได้น้ำหนักโดยเปอร์เซ็นต์ของ polyoxyethylene ชนิดและน้ำหนักแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดของ poloxamer[41]

Poloxamer	Physical form	A	b	Average molecular weight
124	Liquid	12	20	2,090-2,360
188	Solid	80	27	7,680-9,510
237	Solid	64	37	6,840-8,830
338	Solid	141	44	12,700-17,400
407	Solid	101	56	9,840-14,600

poloxamer เป็นสารที่ไม่มีประจุ (nonionic polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymer) และส่วนของ polyoxyethylene เป็นส่วนที่สามารถละลายน้ำ (hydrophilic) ส่วนของ

polyoxypropylene เป็นส่วนที่ไม่สามารถละลายน้ำ (hydrophobic) เมื่อมีอุณหภูมิเปลี่ยนแปลง สามารถเปลี่ยนสถานะระหว่าง ของเหลว และเจลได้ (sol-gel transition) โดยที่อุณหภูมิต่ำจะมีลักษณะเป็น aqueous solution และเมื่อมีอุณหภูมิสูงขึ้นจะเปลี่ยนเป็น hydrogel ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงสถานะ และ อัตราของ drug release จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ poloxamer[42] poloxamer มีการนำมาใช้ประโยชน์หลายอย่างแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะการใช้ประโยชน์ และความเข้มข้นที่ใช้ของ poloxamer[41]

การใช้ประโยชน์	**ความเข้มข้น (%)**
Fat emulsifier	0.3
Flavor solubilizer	0.3
Fluorocarbon emulsifier	2.5
Gelling agent	15-50
Spreading agent	1
Stabilizing agent	1-5
Suppository base	4-6 หรือ 90
Tablet coating	10
Wetting agent	0.01-5

P407 เป็นสารที่นำมาใช้ทางการแพทย์ เพื่อเคลือบยาเม็ด และเพื่อเป็นตัวนำยาเข้าสู่ร่างกาย (drug delivery) เช่น P407 ความเข้มข้น 0.001-0.85% w/v ใช้กับดวงตา (ocular delivery system)[43] หรือ P407 ความเข้มข้นร้อยละ 20 นำมาผสมกับยาชา lidocaine เพื่อเพิ่มระยะเวลาในการออกฤทธิ์[44, 45] หรือผสมยา ibuprofen ซึ่งเป็นยาแก้ปวดที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเพื่อใช้เป็นยาฉีด ซึ่งพบว่าสามารถผ่านส่วนของเยื่อหุ้มสมองชั้นดูรา (dural membrane)ได้[46] นอกจากนี้ยังทำให้สารที่ละลายในน้ำได้ไม่ดี สามารถละลายได้ดีขึ้น เช่น indomethacin และinsulin เป็นต้น P407 มีชื่อทางการค้ามากมายเช่น Pluronic F127® (BASF laboratories, Wyandoote, USA) และ Synperonic F127® (ICI laboratories, Wilton, UK)

Poloxamer ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นชนิด P407 ซึ่งที่ความเข้มข้น 2.5% w/v aqueous solution มีค่าระดับความเป็นกรดด่างที่ 6-7.5 การเลือกใช้ Poloxamer ในการศึกษานี้เนื่องจากมีข้อดีคือ low toxicity และคุณสมบัติที่อุณหภูมิต่ำจะมีลักษณะเป็นของเหลวทำให้สามารถฉีดเข้าสู่คลองรากฟันที่แคบได้ง่าย และที่อุณหภูมิร่างกายจะเปลี่ยนสถานะเป็นเจล (soft gel) ทำให้สามารถคงสภาพอยู่ในคลองรากฟันได้นานขึ้นและช่วยปลดปล่อยสารสกัดออกมาอย่างช้า

การทดสอบความเป็นพิษ

มีการศึกษาในสัตว์ทดลอง (สุนัข และกระต่าย) พบว่าการให้ poloxamer 407 ที่ความเข้มข้น 5% w/v และ 10% w/v ในตา เหงือก และผิวหนัง จะไม่ทำให้เกิดการระคายเคือง (nonirritating) หรือการแพ้ (nonsensitizing) แก่สัตว์ทดลอง[41] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาทำการฉีดสารผสมระหว่าง 20% poloxamer 407 กับ 2% lidocaine hydrochloride เข้าไปบริเวณใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) ของหนู โดยเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ไม่พบการตาย หรือการอักเสบที่รุนแรงของเนื้อเยื่อแต่อย่างใด[45]

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา (*Artocarpus lakoocha* Roxb.) ใน Poloxamer 407 ในการกำจัดเชื้อ *Enterococcus faecalis* ในคลองรากฟัน กับ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และคลอร์เฮ็กซิดีน เป็นการศึกษา *in vitro*
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากอาโทร์คาปัส ลาคูชา ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

สมมติฐาน

การใช้สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน Poloxamer 407 เพื่อเป็นยาใส่ในคลองรากฟัน มีประสิทธิภาพในการจำกัดเชื้อ *E. faecalis* ไม่แตกต่างจากการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และคลอร์เฮ็กซิดีน เป็นการศึกษา *in vitro*

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา ที่ใช้ตลอดการศึกษานี้มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลอ่อนที่เตรียมโดยครั้งเดียวกัน โดยนำเปลือกไม้จากลำต้นมะหาดมาล้างให้สะอาด นำมาสับจนละเอียด แล้วนำไปต้ม ตักฟองที่ได้จากการต้มไปตากให้แห้งแล้วนำมาปั่นเป็นก้อน และบดจนเป็นผง นำผงที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา นี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ .ดร.จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. Poloxamer 407: P407 (ICI plc, Wilton, UK)
3. สารเคมี
   1.1 น้ำกลั่น
   1.2 น้ำเกลือปราศจากเชื้อ
   1.3 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate-buffer saline: PBS)
   1.4 แคลเซียมไฮดรอกไซด์สำเร็จรูป UltraCal® XS (Ultradent Products Inc, South Jordan UT, USA) มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 35 และแบเรียม-ซัลเฟตร้อยละ 2
   1.5 แคลเซียมไฮดรอกไซด์ชนิดผง
   (ฝ่ายเภสัชกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเทศไทย)
   1.6 คลอร์เฮ็กซิดีนสำเร็จรูป Consepsis® (Ultradent Products Inc, South Jordan UT, USA)
   1.7 คลอร์เฮ็กซิดีนชนิดผง (chlorhexidine diacetate monohydrate: Fluka Chemie; Sigma-Aldrich GmbH, Switzerland)
   1.8 น้ำยาอีดีทีเอ (ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA) ความเข้มข้นร้อยละ 17
   (ฝ่ายเภสัชกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเทศไทย)
   1.9 น้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 5.25
   (ฝ่ายเภสัชกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเทศไทย)
   3.10สารละลายไทมอล (thymol) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

(ฝ่ายเภสัชกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเทศไทย)

2. กระบอกใส่น้ำยาล้างคลองรากฟันขนาด 5 มิลลิลิตร พร้อมเข็มขนาด 22
3. ผ้ากอร์ซปราศจากเชื้อ
4. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเบรน ฮาร์ต อินฟิวชัน (Brain heart infusion: Becton, Dickinson & Co, Sparks, MD) 37 กรัมต่อ 1 ลิตร
5. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดผสมเลือด (Blood agar base: RCI Labscan Asia Co., Ltd) 40 กรัมต่อ 1 ลิตร
6. อาหารสำหรับไฟโบรบลาส (GIBCO BRL Products, Invitrogen Co., USA)
   - Fetal bovine serum
   - Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM)
7. หัวกรอพีโซดริล (Peeso drill) เบอร์ 3, 4, 5 และ6
8. เรซินอะคริลิกชนิดบ่มเอง (self-curing acrylic resin: Triplex® Cold; Ivoclar Vivadent AG, FL-9494 Schaan, Liechtenstein)

อุปกรณ์

1. เครื่องสำรวจความขนาน (Surveryor Parallometer System; Dentsply, York, USA)
2. เครื่องกรอฟันชนิดความเร็วช้า
3. เครื่องตัดชิ้นตัวอย่างรุ่น Isomet® 4000 (Buehler Isomet® 4000, Buehler Ltd., USA)
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (microplate reader Expert Plus รุ่น G020151: Asyshitech, Germany)
5. เครื่องชั่งน้ำหนัก ชนิด 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง (Sartorius analytic รุ่น E5500s: Scientific promotion Co., LTD, USA)
6. เครื่องวัดค่า pH รุ่น Cyberscan 1000 (Eutech, Singapore)
7. เครื่องเขย่าสาร (Vortex: New York, USA)
8. ตู้บ่มเพาะเชื้อ ขนาด 400 ลิตร (Binder; Scientific promotion Co., LTD, USA)
9. หม้อนึ่งควบคุมความดันไอน้ำ (Autoclave: Tomy, Tokyo, Japan)
10. ตู้อบความร้อนสูง (Hot air oven: Memmert, Germany)
11. ตู้แช่เย็น -20˚C (Whirlpool, USA)

วิธีการวิจัย

1. การศึกษาความไวของ *Enterococcus faecalis* ต่อสาร

1.1 วิธี Diffusion method

เชื้อ *E. faecalis* ATCC 19433 ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว brain heart infusion broth (BHI) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเปรียบเทียบความขุ่นกับหลอดความขุ่นมาตรฐาน ที่มีความขุ่นเท่ากับ 3 McFaland (มีจำนวนเชื้อประมาณ 9×10^8 CFU/ml)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่ปราศจากเชื้อ จำนวน 20 มิลลิลิตร ต้มให้เหลว และนำมาตั้งให้อุ่น เติมเชื้อ *E. faecalis* ที่เตรียมไว้ข้างต้น จำนวน 500 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่อุ่นแล้วให้เข้ากัน เทลงในจานเพาะเชื้อที่มีวงแหวนโลหะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จำนวน 4 อันวางอยู่ ให้ความหนาของวุ้นสม่ำเสมอกัน รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง นำวงแหวนโลหะออก เขียนหมายเลขกำกับไว้ใต้จานเพาะเชื้อ เติมสารทดสอบแต่ละชนิดปริมาณหลุมละ 80 ไมโครลิตร โดยมีสารทดสอบคือ สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา 10 %w/v ใน DMSO 20 %v/v และหลุมควบคุมลบ BHI broth ทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน candle jar ทำการแปลผล โดยการดูโซนยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น

1.2 วิธี Broth microdilution method

ทดสอบความไวของ *E. faecalis* ATCC 19433 ต่อสารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา คลอร์เฮ็กซิดีน และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ด้วยวิธี broth microdilution method เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC: Minimum inhibitory concentrations) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (MBC: Minimum bactericidal concentration) โดยวิธี microdilution โดยใช้สารที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นดังนี้คือ สาร สกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา 10 %w/v คลอร์เฮ็กซิดีน 0.1 %w/v และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 25 %w/v ทำ 2-fold serial dilution ใน 9 6 well-plate โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของแต่ละสารเลือกจากการทำ pilot study ก่อนหน้าทำให้ได้ค่าประมาณช่วงความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ และ มีหลุมควบคุมลบที่ใส่เฉพาะสารโดยไม่ใส่ *E. faecalis* และหลุมควบคุมบวกที่ใส่เฉพาะ *E. faecalis* ที่มีการปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5

McFaland (มีจำนวนเชื้อประมาณ 1.5×10^{8} CFU/ml) ดังนั้นในแต่ละหลุมจะมีปริมาตรสุดท้าย คือ 200 ไมโครลิตร ทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง microplate reader ที่ค่าดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร เพื่อหาค่า MIC และทำการหาค่า MBC โดยดูดสารละลายในแต่ละหลุมจำนวน 10 ไมโครลิตร ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar และทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูผลโดย MBC คือค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยในแต่ละสารจะทำ 3 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ยในหน่วย %w/v

2. ขั้นตอนการเตรียมสาร

2.1 การเตรียม poloxamer 407 (P407)

ชั่ง P407 ด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักชนิด 4 ตำแหน่ง และผสมในน้ำกลั่นเย็นที่มีอุณหภูมิประมาณ 12 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันดังนี้คือ ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 %w/v ในขวดแก้วใสที่มีฝาปิดปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วพิจารณาเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสม (โดยลองฉีดสารละลายในหลอดพลาสติกใสขนาดเล็กใกล้เคียงกับคลองรากฟัน และสังเกตการไหลของสารในหลอดพลาสติกใส) พบว่าความเข้มข้นที่เมื่อผสมแล้วได้ความหนืดที่เหมาะสมในอุณหภูมิร่างกาย คือ ความเข้มข้น 20 %w/v

นำ P407 ความเข้มข้น 20 %w/v ใส่ในขวดแก้วที่มีฝาปิด ไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำมาเก็บในตู้เย็นจนกว่าจะนำไปใช้

2.2 การเตรียมสารทดสอบ

นำผง สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา ที่ชั่งน้ำหนัก ตามความเข้มข้นที่ต้องการ ผสมกับ DMSO ในปริมาณที่น้อยที่สุดที่สามารถละลายผง สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา ได้จนเข้ากัน (ความเข้มข้นร้อยละ 10) แล้วผสมกับสารละลาย P407 20 %w/v โดยมีอัตราส่วนการผสมแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงรายละเอียด และชนิดสารที่เตรียม

สาร	ความเข้มข้น	
	mg/ml	**%w/v**
สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา 4 เท่าMIC	1.6	0.16
สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา 6 เท่าMIC	2.3	0.23
สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา 8 เท่าMIC	3.1	0.31
สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา 16 เท่าMIC	6.2	0.62
สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา 32 เท่าMIC	12.5	1.25
สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา 64 เท่าMIC	25	2.5
สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา 100 เท่าMIC	40	4
คลอร์เฮ็กซิดีน 4 เท่าMIC	0.008	0.0008
คลอร์เฮ็กซิดีน 6 เท่าMIC	0.012	0.0012
คลอร์เฮ็กซิดีน 8 เท่าMIC	0.016	0.0016
คลอร์เฮ็กซิดีน 16 เท่าMIC	0.031	0.0031
คลอร์เฮ็กซิดีน 32 เท่าMIC	0.062	0.0062
คลอร์เฮ็กซิดีน 64 เท่าMIC	0.125	0.0125
คลอร์เฮ็กซิดีน 150 เท่าMIC	0.3	0.03
คลอร์เฮ็กซิดีน 5,000 เท่าMIC	10	1

3. การศึกษาความไวของ *E. faecalis* ต่อสารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407

3.1 วิธี Diffusion method

เชื้อ *E. faecalis* ATCC 19433 ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว brain heart infusion broth (BHI) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเปรียบเทียบความขุ่นกับ หลอดความขุ่นมาตรฐาน ที่มีความขุ่นเท่ากับ 3 McFaland (มีจำนวนเชื้อประมาณ 9×10^8 CFU/ml)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่ปราศจากเชื้อ จำนวน 20 มิลลิลิตร ต้มให้เหลว และนำมาตั้งให้อุ่น เติมเชื้อ *E. faecalis* ที่เตรียมไว้ข้างต้น จำนวน 500 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่อุ่นแล้วให้เข้ากัน เทลงในจานเพาะเชื้อที่มีวงแหวนโลหะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

6 มิลลิเมตรจำนวน 4 อันวางอยู่ให้ความหนาของวุ้นสม่ำเสมอกัน รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แล้วนำวงแหวนโลหะออก เขียนหมายเลขกำกับไว้ใต้จานเพาะเชื้อ โดยมีสารทดสอบทั้งหมดดังนี้

1. Negative control (DMSO 10%v/v ใน P407 20 %w/v)
2. แคลเซียมไฮดรอกไซด์สำเร็จรูป UltraCal® XS
3. สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ความเข้มข้น 0.16 %w/v
4. สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ความเข้มข้น 0.23 %w/v
5. สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ความเข้มข้น 0.31 %w/v
6. สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ความเข้มข้น 0.62 %w/v
7. สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ความเข้มข้น 1.25 %w/v
8. สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ความเข้มข้น 2.5 %w/v
9. คลอร์เฮ็กซิดีน ใน P407 ความเข้มข้น 0.0008 %w/v
10. คลอร์เฮ็กซิดีน ใน P407 ความเข้มข้น 0.0012 %w/v
11. คลอร์เฮ็กซิดีน ใน P407 ความเข้มข้น 0.0016 %w/v
12. คลอร์เฮ็กซิดีน ใน P407 ความเข้มข้น 0.0031 %w/v
13. คลอร์เฮ็กซิดีน ใน P407 ความเข้มข้น 0.0062 %w/v
14. คลอร์เฮ็กซิดีน ใน P407 ความเข้มข้น 0.0125 %w/v

เติมสารทดสอบแต่ละชนิดปริมาณหลุมละ 80 ไมโครลิตร ทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน candle jar ทำการแปลผล โดยการดูโซนยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น

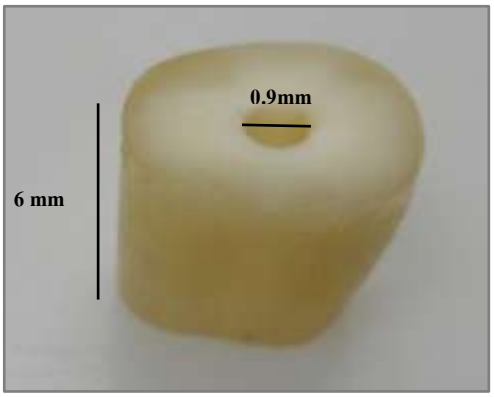
1.2 การศึกษา ในโมเดลฟัน (ดัดแปลงจากการศึกษาของ Haapasalo และ Ørstavik[1])

3.2.1 การเตรียมฟัน

ฟันมนุษย์ที่มีส่วนตัวฟัน และรากฟันที่สมบูรณ์ มีการสร้างรากฟันเสร็จสมบูรณ์ โดยมี 1 คลองรากฟัน และ1 รากฟันที่ตรง จำนวน 120 ซี่ แช่ในสารละลาย thymol ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จนกว่าจะใช้ กำจัดส่วนเนื้อเยื่อปริทันต์ออกโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5.25 เป็นเวลา 15 นาที ทำการตัดส่วนปลายรากฟัน 4 มิลลิเมตรออก และตัดส่วนตัวฟันที่ใต้ต่อระดับรอยต่อเคลือบฟันกับเคลือบรากฟัน (CEJ: cementoenamel junction) โดยให้เหลือส่วนรากฟัน 6 มิลลิเมตร โดยใช้เครื่องตัดชิ้นตัวอย่างรุ่น Isomet® 4000 ตามรูปที่ 4 และใช้

เครื่องมือ Peeso drill เบอร์ 3 กรอภายในคลองรากฟัน เพื่อให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากัน คือ 0.9 มิลลิเมตร ตามรูปที่ 5 กำจัดชั้นสเมียร์ (smear layer) โดยนำชิ้นฟันทั้งหมดใส่ในเครื่อง ultrasonic bath ที่มีสาร EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 17 เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นร้อยละ 5.25 เป็นเวลา 4 นาที หลังจากนั้นแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดสารที่อาจหลงเหลืออยู่ ทำการปราศจากเชื้อโดยนำชิ้นฟันใส่ในขวดแก้ว ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth จำนวน 20 มิลลิลิตรแล้วนำไป autocalve ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที นำออกมาบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทดสอบความปราศจากเชื้อของชิ้นฟัน

รูปที่ 4 เครื่องตัดชิ้นตัวอย่างรุ่น Isomet® 4000 (Buehler Isomet® 4000, Buehler Ltd., USA)



รูปที่ 5 แสดงชิ้นฟันที่เตรียมเสร็จสมบูรณ์

3.2.2 การใส่เชื้อ *E. faecalis*

เชื้อทดสอบ *E. faecalis* ATCC 19433 ที่ถูกเตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth วิธี

การเดียวกับข้างต้น ซึ่งทำการเปรียบเทียบความขุ่นกับ หลอดความขุ่นมาตราฐาน ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFaland (ซึ่งมีจำนวนเชื้อประมาณ 1.5×10^{8}CFU/ml) จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะแก้วที่มีชิ้นฟัน 20 ชิ้น ต่อขวด บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth จำนวน 5 มิลลิลิตร ทุกๆ 2 วัน และทำการดูดสารละลายมาบ่มเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อทดสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลา นำชิ้นฟันแต่ละชิ้นที่ได้ ล้างด้วย 10 มิลลิลิตรของ sterile saline ทำให้แห้งโดยวางชิ้นฟันบนผ้ากอร์ซที่ปราศจากเชื้อในภาชนะมีฝาปิด

3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ในโมเดลฟัน

นำชิ้นฟันที่เตรียมไว้มาแบ่งออกเป็น 10 กลุ่ม กลุ่มละ 12 ซี่ ตามสารที่ใช้ทดสอบดังนี้

กลุ่มที่ 1 positive control ใส่ P407 20 %w/v

กลุ่มที่ 2 ใส่แคลเซียมไฮดรอกไซด์สำเร็จรูป UltraCal® XS

กลุ่มที่ 3 ใส่สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ความเข้มข้น 0.62 %w/v

กลุ่มที่ 4 ใส่สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ความเข้มข้น 1.25 %w/v

กลุ่มที่ 5 ใส่สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ความเข้มข้น 4 %w/v

กลุ่มที่ 6 ใส่คลอร์เฮ็กซิดีน ใน P407 ความเข้มข้น 0.0031 %w/v

กลุ่มที่ 7 ใส่คลอร์เฮ็กซิดีน ใน P407 ความเข้มข้น 0.0062 %w/v

กลุ่มที่ 8 ใส่คลอร์เฮ็กซิดีน ใน P407 ความเข้มข้น 0.03 %w/v

กลุ่มที่ 9 ใส่คลอร์เฮ็กซิดีน ใน P407 ความเข้มข้น 1 %w/v

กลุ่มที่ 10 ใส่ 2% คลอร์เฮ็กซิดีนสำเร็จรูป Consepsis®

วางชิ้นฟันลงในจานเพาะเชื้อ 6 ชิ้นต่อจาน ยึดส่วนล่างกับ periphery wax ที่ปราศจากเชื้อ ใส่สารทดลองในคลองรากฟันด้วย micropipette ตามกลุ่มที่กำหนด ปิดส่วนบนด้วย periphery wax ที่ปราศจากเชื้อ วางสำลีที่ปราศจากเชื้อที่ชุบน้ำกลั่นพอหมาดลงในจานเพาะเชื้อ และปิดด้วย parafilm เพื่อให้ภายในมีความชื้น 100% ทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามรูปที่ 6 เมื่อครบ 3 และ 5 วัน นำชิ้นฟัน 6 ชิ้น ล้างสารที่ใส่ด้วย sterile saline 5 มิลลิลิตร ทำให้แห้งโดยวางบนผ้ากอร์ซที่ปราศจากเชื้อใช้เครื่องมือ Peeso drill เบอร์ 4, 5 และ 6 กรอภายในคลองรากฟัน เพื่อเป็นการเก็บตัวอย่างเนื้อฟันที่ 0.2, 0.4 และ 0.6 มิลลิเมตร นำส่วนผงเนื้อฟัน (dentin chip) แต่ละชั้นที่ได้มาชั่งน้ำหนัก และบันทึกไว้ ผสมกับ PBS ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ทำ 10-fold serial dilution 4

ครั้งแล้วนำแต่ละความเข้มข้นที่ได้จำนวน 10 ไมโครลิตร ไปบ่มเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar ด้วยวิธี dot plate ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ดังรูปที่ 7 แปลผลโดยการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. faecalis* ต่อน้ำหนักที่ชั่งได้ (CFU/mg)

รูปที่ 6 แสดงการวางชิ้นฟันลงในจานเพาะเชื้อ

รูปที่ 7 แสดงโคโลนีของเชื้อ *E. faecalis* บน Blood agar

4. การศึกษาผลของสารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชาต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบคือ เซลล์ไฟโบรบลาส L929 ซึ่งเป็นเซลล์ของหนู ถูกเลี้ยงในภาชนะสำหรับเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร ด้วยอาหารสำหรับไฟโบรบลาส (fibroblast growth medium) ซึ่งในอาหารปริมาณ 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

1. DMEM (90%) จำนวน 450 มิลลิลิตร
2. Foetal Bovine serum (10%) จำนวน 50 มิลลิลิตร

3. Medium supplement: 100 IU/ml penicillin และ 100 µg/ml streptomycin ปริมาณ 5 ml
   2.5 µg/ml fungizone ปริมาณ 5 ml

ทำการบ่มเซลล์ในตู้บ่มที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำเซลล์ออกจากภาชนะเลี้ยงเมื่อเซลล์มีปริมาณร้อยละ 80-90 ของภาชนะโดยมีขั้นตอน ดังนี้

1. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก และใส่ PBS จำนวน 5 มิลลิลิตร แล้วดูดออก ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง เพื่อล้างอาหารซึ่งมีซีรัมในภาชนะออก
2. ใส่ 0.25% trypsinizing solution จำนวน 1 มิลลิลิตร
3. บ่มในตู้ประมาณ 8-10นาที
4. ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ในภาชนะเลี้ยงปริมาณ 5 มิลลิลิตร ล้างเซลล์ให้หลุดจากภาชนะ และใช้ pipette ดูดขึ้นลง เพื่อให้เซลล์ไม่เกาะกันเท่าที่จำเป็น
5. นำ cell suspension ไปใส่ในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร และปั่นที่ 1,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
6. ดูดส่วน supernatant ทิ้งเหลือส่วนตะกอนของเซลล์ที่ก้นประมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ จำนวน 1 มิลลิลิตร

นับเซลล์ที่เลี้ยงได้ และทำการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาส L929 จำนวน 1×10^4 เซลล์ต่อหลุมในภาชนะเลี้ยงเชื้อชนิด 96 หลุม ภายในตู้บ่มเซลล์เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 ครั้ง ก่อนที่จะใส่สารทดสอบหลุมละ 200 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 3 หลุมโดยมีสารทดสอบ (ทำซ้ำ 3ครั้ง) คือ

1. คลอร์เฮ็กซิดีน 1 %v/v (ผสมคลอร์เฮ็กซิดีนสำเร็จรูป Consepsis® V ความเข้มข้นร้อยละ 2 กับอาหารเลี้ยงเซลล์ในสัดส่วน 1:1)
2. สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.005 %w/v, 0.01 %w/v, 0.02 %w/v และ 0.4 %w/v
3. DMSO 10 %v/v
4. แคลเซียมไฮดรอกไซด์ 5 %w/v

วัดปริมาณเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 6, 12 และ 24 ชั่วโมง โดยวัดการเกิด bioreduction ของสีสังเคราะห์ tetrazolium 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) เป็น formazan product และใช้สารละลาย DMSO เป็นตัวทำละลาย formazan product และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader และหาค่า % cell viability ตามสูตร

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{OD of sample}}{\text{OD of control}} \times 100$$

เพื่อหาความเข้มข้นที่สูงที่สุดของสารที่ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาส L929 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

สถิติทั้งหมดที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลในการศึกษานี้ ใช้สถิตินอนพาราเมตริก ที่ระดับความเชื่อมั่นเดียวกัน คือ ร้อยละ 95 โดยแบ่งการวิเคราะห์ ดังนี้

1. การวิเคราะห์เปรียบเทียบความไวของ *E. faecalis* ต่อสารในโมเดลฟันมนุษย์ โดยใช้สถิติครัสคัลวอลิส (Kruskal-Wallis test) เพื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างของกลุ่มการศึกษา หากพบความแตกต่างทางสถิติ จะทำการเปรียบเทียบกลุ่มการศึกษาต่อเป็นคู่โดยสถิติแมนวิทนีย์ (Mann-Whitney U test)
2. การวิเคราะห์เปรียบเทียบผลของสาร ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ไฟโบรบลาส L929 นำค่าที่ได้มาใช้สถิติครัสคัล-วอลิส (Kruskal-Wallis test) เพื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างของกลุ่มการศึกษา และหากพบความแตกต่างทางสถิติจะทำการเปรียบเทียบกลุ่มการศึกษาเป็นคู่โดยสถิติแมนวิทนีย์ (Mann-Whitney U test)

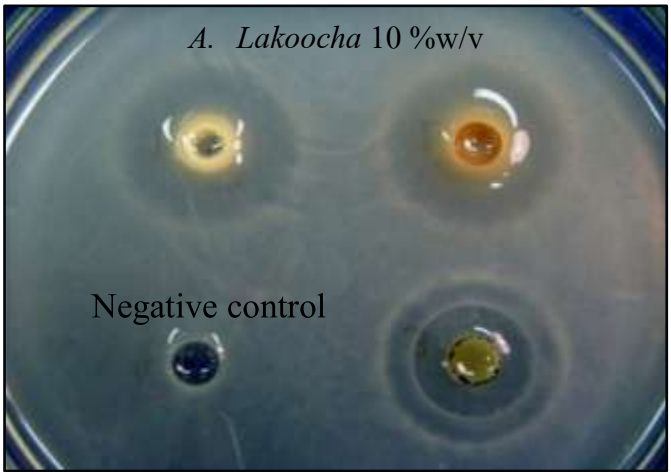
บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาความไวของ *E. faecalis* ต่อสาร

1.1 วิธี Diffusion method

การทดสอบความไวของ *E. faecalis* ต่อสารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา 10 %w/v พบโซนยับยั้งขนาดประมาณ 2 เซนติเมตรตามรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงผลการทดสอบความไวของ *E. faecalis* ต่อสารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา

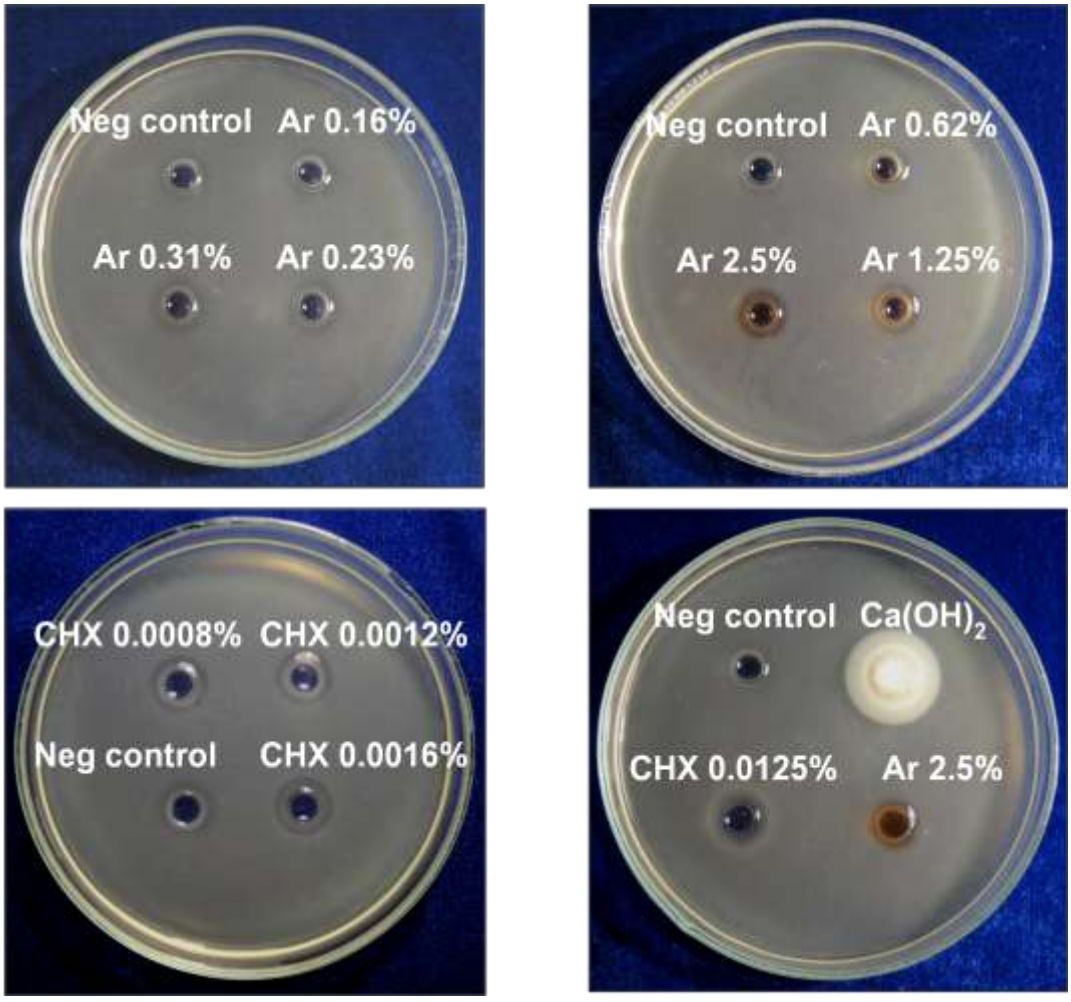
1.2 วิธี Broth microdilution method

การทดสอบความไวของ *E. faecalis* ต่อสารต่าง ๆ พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา และคลอร์เฮ็กซิดีน คือ 0.039 %w/v และ 0.000195 %w/v ตามลำดับ โดยไม่สามารถหาค่า MIC ของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ได้ เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่น จากสารแคลเซียมไฮดรอกไซด์ในทุกความเข้มข้น ส่วนค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ฆ่าเชื้อ (MBC) ของสารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา คลอร์เฮ็กซิดีน และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ คือ 0.312 %w/v 0.00039 %w/v และ 3.125 %w/v ตามลำดับ

2. ผลการศึกษาความไวของ *E. faecalis* ต่อสารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407

2.1 วิธี Diffusion method

การทดสอบความไวของ *E. faecalis* ต่อสารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และคลอ ร์เฮ็กซิดีน พบว่าต้องใช้สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ที่ความเข้มข้น 1.25 %w/v (32 เท่าของค่า MIC) และใช้คลอร์เฮ็กซิดีน 0.0008 %w/v (4 เท่าของค่า MIC) จึงเริ่มเห็นโซนยับยั้ง และเมื่อใช้สารความเข้มข้นที่มากขึ้น ขนาดของโซนยับยั้งจะเพิ่มขึ้น ส่วนแคลเซียมไฮดรอกไซด์นั้น จะมีการแพร่ของแคลเซียมไฮดรอกไซด์เข้าไปในเนื้ออาหารจนเห็นลักษณะขาวขุ่นเป็นวงกว้าง ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 9 และตารางที่ 5



รูปที่ 9 แสดงผลการทดสอบความไวของ *E. faecalis* ต่อสารต่าง ๆ

ตารางที่ 5 แสดงความไวของ *E.faecalis* ต่อสารในแต่ละความเข้มข้น

สาร	การปรากฏของโซนยับยั้ง
สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 (0.16 %w/v, 0.23 %w/v)	Negative
สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 (0.31 %w/v, 0.62 %w/v)	Negative
สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 (1.25 %w/v, 2.5 %w/v)	Positive
คลอร์เฮ็กซิดีน ใน P407 (0.0008 %w/v, 0.0012 %w/v, 0.0016 %w/v, 0.0031 %w/v)	Positive
คลอร์เฮ็กซิดีน ใน P407 (0.0062 %w/v, 0.0125 %w/v)	Positive
แคลเซียมไฮดรอกไซด์[†]	-
กลุ่มควบคุม (P407+ DMSO)	Negative

[†] ไม่สามารถพิจารณาลักษณะของโซนยับยั้ง (inhibition zone) ได้ เนื่องจากมีการแพร่ของ สารแคลเซียมไฮดรอกไซด์ซึ่งมีสีขาวขุ่นออกมาเป็นวงกว้าง

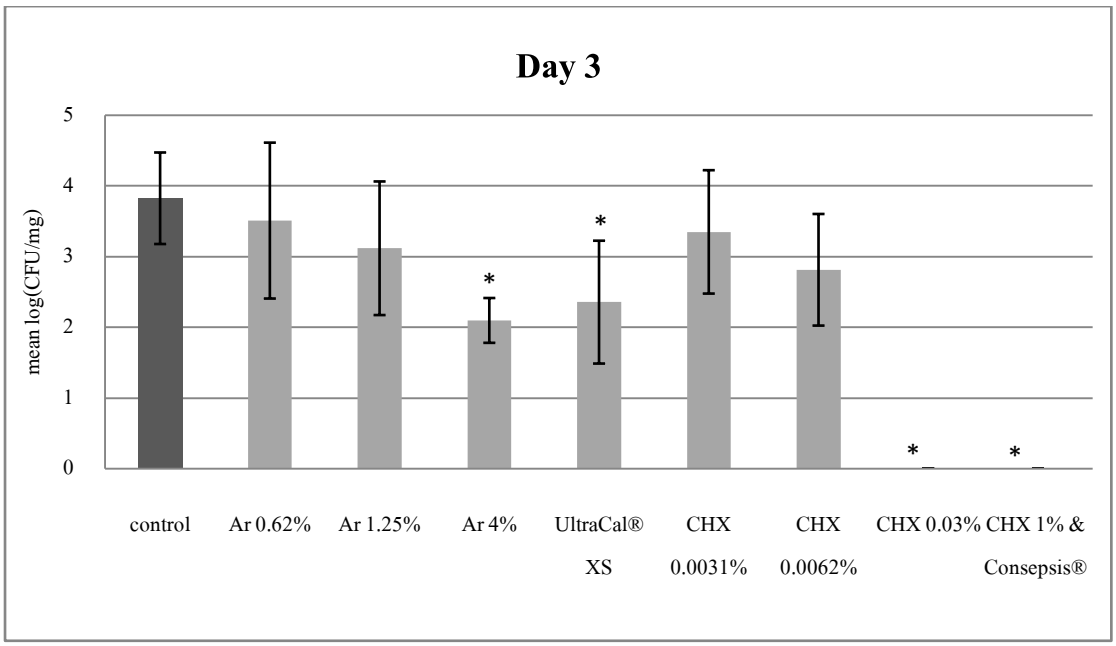
2.2 ผลการศึกษาในโมเดลฟันมนุษย์ *in vitro*

เมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติครัสคัล-วอลิส (Kruskal-Wallis test) พบความแตกต่างของการเจริญเติบโตของ *E. faecalis* ของแต่ละกลุ่มสารทดสอบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งที่ 3 วัน และ 5 วัน ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยมีค่า $p < 0.001$ เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของ log CFU/mg สารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ UltraCal® XS สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 4 %w/v คลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้น 0.006 %w/v, 0.03 %w/v และ Consepsis® ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้นของสารทดสอบ และชนิดของสารทดสอบ กล่าวคือ เมื่อใช้สารที่ความเข้มข้นมากขึ้นจะยิ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อที่มากขึ้น ด้วยแสดงดังตารางที่ 6 รูปที่ 10 และ 11

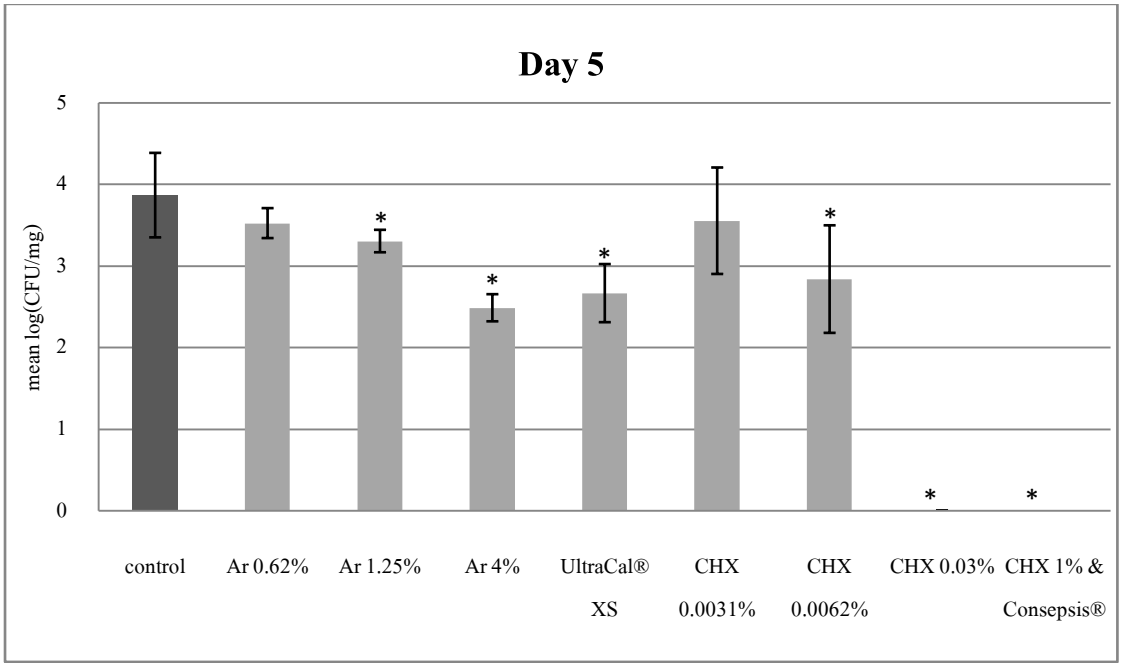
ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยในหน่วยของ log CFU/mg (±SD) ของกลุ่มทดลอง และค่านัยสำคัญทางสถิติแมนวิทนีย์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยของ log CFU/mg (±SD)		ค่านัยสำคัญทางสถิติแมนวิทนีย์	
	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 3	วันที่ 5
UltraCal® XS	2.36 (0.76)	2.67 (0.36)	<0.001*	<0.001*
สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 0.62 %w/v	3.51 (1.10)	3.52 (0.18)	0.589	0.699
สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 1.25 %w/v	3.12 (0.95)	3.31 (0.14)	0.394	0.041*
สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 4 %w/v	2.1 (0.32)	2.49 (0.17)	0.002*	0.002*
คลอร์เฮ็กซิดีน ใน P407 0.0031 %w/v	3.35 (0.87)	3.55 (0.65)	0.24	0.485
คลอร์เฮ็กซิดีน ใน P407 0.0062 %w/v	2.81 (0.79)	2.84 (0.66)	0.132	0.009*
คลอร์เฮ็กซิดีน ใน P407 0.03 %w/v, 1 %w/v	0 (0)	0 (0)	<0.001*	<0.001*
Consepsis®	0 (0)	0 (0)	<0.001*	<0.001*
กลุ่มควบคุม P407	3.83 (0.65)	3.87 (0.52)	-	-

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (significant) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 10 แผนภาพแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ *E. faecalis* ในหน่วย log (CFU/mg) ของแต่ละกลุ่มการศึกษาที่วันที่ 3 (*) มีความแตกต่างกันกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 11 แผนภาพแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ *E. faecalis* ในหน่วย log (CFU/mg) ของแต่ละกลุ่มการศึกษาที่วันที่ 5 (*) มีความแตกต่างกันกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่ม สารทดสอบแต่ละกลุ่มเป็นคู่ในวันที่ 3 และ 5 โดยใช้สถิติแมนวิทนีย์ได้ผลตามตารางที่ 7 นั่นคือ สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 4 %w/v มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ไม่ต่างกับ UltraCal® XS แต่ยังด้อยกว่าคลอร์เฮ็กซิดีน 0.3 %w/v และ Consepsis®

ตารางที่ 7 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติแมนวิทนีย์ เมื่อเปรียบเทียบ กลุ่มทดลองเป็นคู่

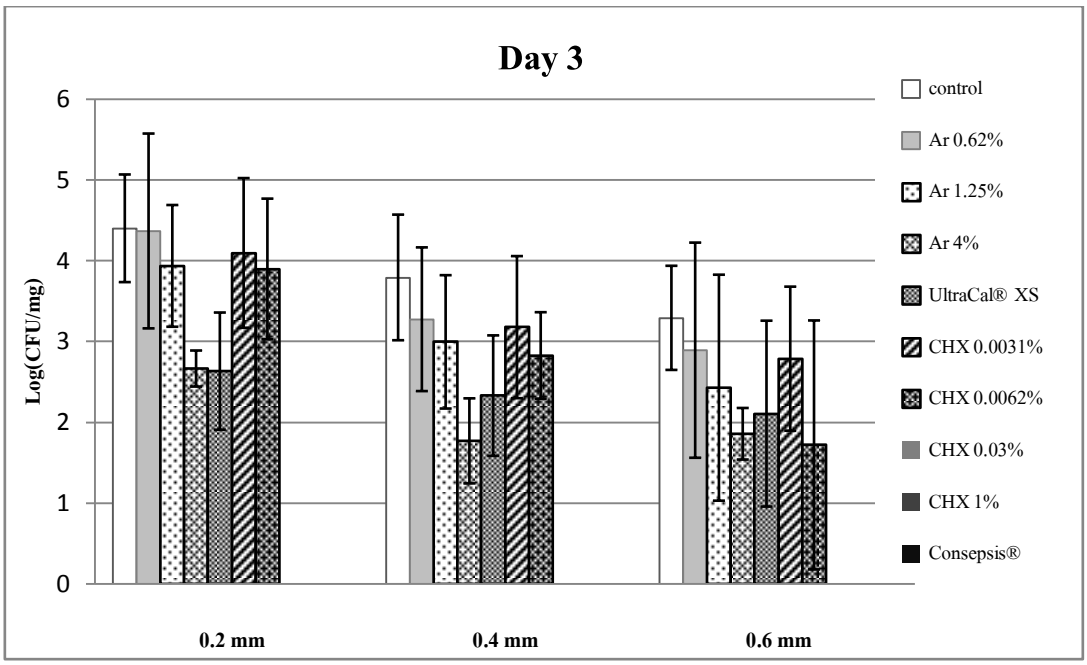
กลุ่มที่เปรียบเทียบกัน	ค่านัยสำคัญทางสถิติแมนวิทนีย์	
	วันที่ 3	วันที่ 5
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 0.62 % w/v กับ 1.25 % w/v	0.589	0.026*
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 0.62 % w/v กับ 4 % w/v	0.026*	0.002*
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 1.25 % w/v กับ 4 % w/v	0.065	0.002*
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 0.62 % w/v กับ คลอร์เฮ็กซิดีน 0.0031 % w/v	0.937	0.394
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 1.25 % w/v กับ คลอร์เฮ็กซิดีน 0.0062 % w/v	0.394	0.394
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 4 %w/v กับ คลอร์เฮ็กซิดีน 0.0031 % w/v	0.015*	0.009*
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 4 %w/v กับ คลอร์เฮ็กซิดีน 0.0062 % w/v	0.18	0.132
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 4 %w/v กับ คลอร์เฮ็กซิดีน 0.03 % w/v	0.002*	0.002*
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 4 %w/v กับ Consepsis®	0.01*	0.01*
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 0.62 % w/v กับ UltraCal® XS	0.132	0.004*
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 1.25 % w/v กับ UltraCal® XS	0.18	0.009*
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 4 %w/v กับ UltraCal® XS	0.589	0.31
คลอร์เฮ็กซิดีน 0.0031 % w/v กับ คลอร์เฮ็กซิดีน 0.0062 %w/v	0.31	0.132

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (significant)

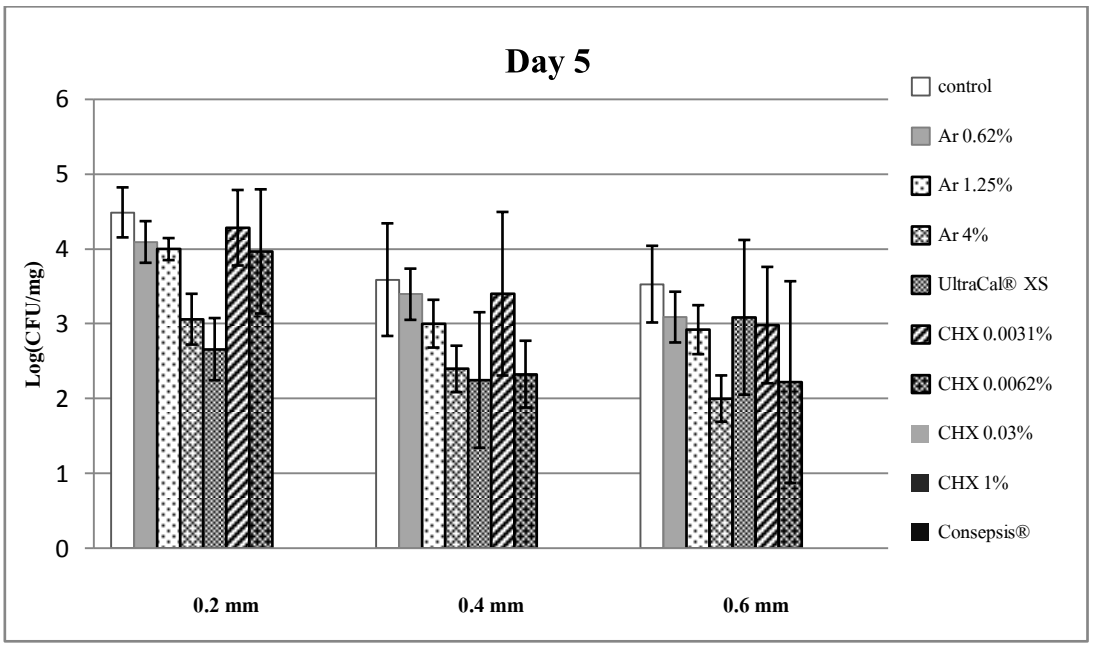
เมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ ในแต่ละชั้นของเนื้อฟัน ซึ่งแบ่งเป็น 3 ชั้น จากชั้นที่อยู่ติดกับคลองรากฟัน 0.2 มิลลิเมตร 0.4 มิลลิเมตร และ 0.6 มิลลิเมตร พบว่าวันที่ 3 สารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 4 %w/v คลอร์เฮ็กซิดีนใน P407 (0.03 %w/v, 1%w/v) Consepsis® และ UltraCal® XS ส่วนวันที่ 5 สารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. faecalis* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 4 %w/v คลอร์เฮ็กซิดีนใน P407 (0.03 %w/v, 1%w/v) Consepsis® แสดงตามตารางที่ 8 โดยมีค่าเฉลี่ยแสดงตามรูปที่ 12 และ13

ตารางที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยของ logCFU/mg (±SD) ของกลุ่มทดลอง และค่านัยสำคัญทางสถิติแมนวิทนีย์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แยกตามชั้นเนื้อฟัน

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยของ logCFU/mg (±SD) วันที่ 3			ค่านัยสำคัญทางสถิติ แมนวิทนีย์			ค่าเฉลี่ยของ logCFU/mg (±SD) วันที่ 5			ค่านัยสำคัญทางสถิติ แมนวิทนีย์		
	0.2 mm	0.4 mm	0.6 mm	0.2 mm	0.4 mm	0.6 mm	0.2 mm	0.4 mm	0.6 mm	0.2 mm	0.4 mm	0.6 mm
UltraCal® XS	2.633 (0.725)	2.33 (0.745)	2.107 (1.15)	0.002*	0.002*	0.026*	2.662 (0.415)	2.25 (0.905)	3.087 (1.033)	0.002*	0.026*	0.394
สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา 0.62 % w/v	4.367 (1.205)	3.275 (0.889)	2.892 (1.331)	1	0.485	0.818	4.093 (0.278)	3.395 (0.342)	3.09 (0.339)	0.065	0.699	0.18
สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา 1.25 % w/v	3.935 (0.753)	2.995 (0.825)	2.428 (1.398)	0.485	0.31	0.394	3.998 (0.147)	3.002 (0.319)	2.922 (0.327)	0.009*	0.18	0.065
สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา 4 %w/v	2.665 (0.223)	1.77 (0.526)	1.858 (0.319)	0.002*	0.002*	0.002*	3.062 (0.339)	2.398 (0.31)	2.002 (0.309)	0.002*	0.009*	0.002*
คลอร์เฮ็กซิดีน 0.0031 % w/v	4.095 (0.926)	3.177 (0.879)	2.787 (0.891)	0.699	0.180	0.394	4.283 (0.504)	3.402 (1.092)	2.983 (0.777)	0.485	0.937	0.394
คลอร์เฮ็กซิดีน 0.0062 % w/v	3.897 (0.870)	2.827 (0.535)	1.72 (1.540)	0.485	0.015*	0.093	3.967 (0.829)	2.328 (0.446)	2.222 (1.347)	0.24	0.009*	0.041*
คลอเฮกซิดีน 0.03 %w/v	0(0)	0(0)	0(0)	0.002*	0.002*	0.002*	0(0)	0(0)	0(0)	0.002*	0.002*	0.002*
Consepsis®	0(0)	0(0)	0(0)	0.01*	0.01*	0.01*	0(0)	0(0)	0(0)	0.01*	0.01*	0.01*
กลุ่มควบคุม P407	4.4 (0.666)	3.792 (0.777)	3.292 (0.644)	-	-	-	4.488 (0.334)	3.59 (0.752)	3.53 (0.512)	-	-	-



รูปที่ 12 แผนภาพแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ *E. faecalis* ในหน่วย log (CFU/mg) ของแต่ละกลุ่มการศึกษาแยกตามชั้นเนื้อฟัน ที่วันที่ 3



รูปที่ 13 แผนภาพแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ *E. faecalis* ในหน่วย log (CFU/mg) ของแต่ละกลุ่มการศึกษาแยกตามชั้นเนื้อฟัน ที่วันที่ 5

เมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. faecalis* โดยพิจารณาเปรียบเทียบความแตกต่างกันของสารแต่ละชนิดเป็นคู่โดยใช้สถิติแมนวิทนีย์ แสดงตามตารางที่ 9-10

ตารางที่ 9 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติแมนวิทนีย์ เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มทดลองเป็นคู่ ที่วันที่ 3

กลุ่มที่เปรียบเทียบกัน	ค่านัยสำคัญทางสถิติแมนวิทนีย์			หมายเหตุ
	0.2 mm	**0.4 mm**	**0.6 mm**	
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 0.62 % w/v กับ 1.25 % w/v	0.699	0.485	0.818	
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 0.62 % w/v กับ 4 % w/v	0.002*	0.002*	0.394	อาโทร์คาปัส 4 % w/v ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 1.25 % w/v กับ 4 % w/v	0.002*	0.065	0.240	อาโทร์คาปัส 4 % w/v ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 0.62 % w/v กับ คลอร์เฮ็กซิดีน 0.0031 %w/v	0.589	1	0.937	
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 1.25 % w/v กับ คลอร์เฮ็กซิดีน 0.0062 %w/v	0.818	0.589	0.310	
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 4 %w/v กับ คลอร์เฮ็กซิดีน 0.0031 %w/v	0.041*	0.004*	0.041*	อาโทร์คาปัส 4 % w/v ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 4 %w/v กับ คลอร์เฮ็กซิดีน 0.0062 %w/v	0.041*	0.026*	1	อาโทร์คาปัส 4 % w/v ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 4 %w/v กับ คลอร์เฮ็กซิดีน 0.03 %w/v	0.002*	0.002*	0.002*	คลอร์เฮ็กซิดีน ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 0.62 % w/v กับ Consepsis®	0.01*	0.01*	0.01*	Consepsis® ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 1.25 % w/v กับ Consepsis®	0.01*	0.01*	0.038*	Consepsis® ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 4 %w/v กับ Consepsis®	0.01*	0.01*	0.01*	คลอร์เฮ็กซิดีน ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 0.62 % w/v กับ UltraCal® XS	0.015*	0.132	0.485	UltraCal® XS ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 1.25 % w/v กับ UltraCal® XS	0.026*	0.065	0.485	UltraCal® XS ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 4 %w/v กับ UltraCal® XS	1	0.24	0.310	

ตารางที่ 10 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติแมนวิทนีย์ เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มทดลองเป็นคู่ ที่วันที่ 5

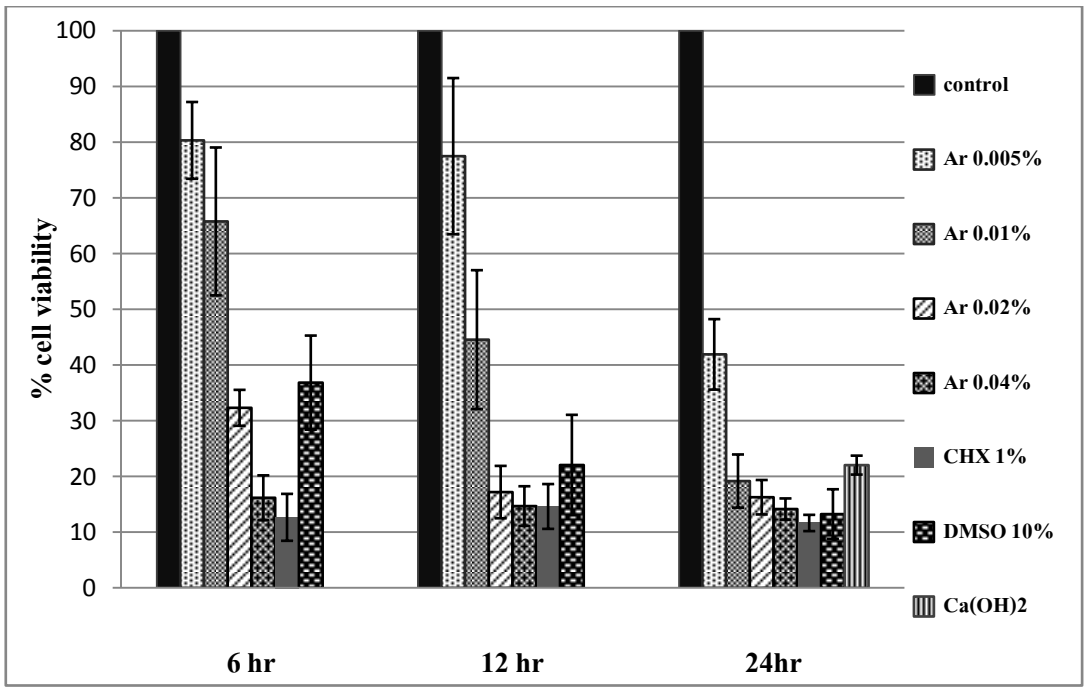
กลุ่มที่เปรียบเทียบกัน	ค่านัยสำคัญทางสถิติแมนวิทนีย์			หมายเหตุ
	0.2 mm	**0.4 mm**	**0.6 mm**	
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 0.62 % w/v กับ 1.25 % w/v	0.394	0.132	0.394	
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 1.25 % w/v กับ 4 % w/v	0.002*	0.009*	0.002*	อาโทร์คาปัส 4 % w/v ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 0.62 % w/v กับ คลอร์เฮ็กซิดีน 0.0031 %w/v	0.589	1	0.589	
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 1.25 % w/v กับ คลอร์เฮ็กซิดีน 0.0062 %w/v	0.818	0.026*	0.394	คลอเฮกซิดีน ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 4 %w/v กับ คลอร์เฮ็กซิดีน 0.0031 %w/v	0.002*	0.009*	0.002*	อาโทร์คาปัส 100-MIC ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 4 %w/v กับ คลอร์เฮ็กซิดีน 0.0062 %w/v	0.002*	0.132	0.041*	อาโทร์คาปัส 100-MIC ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 4 %w/v กับ คลอร์เฮ็กซิดีน 0.03 %w/v	0.002*	0.002*	0.002*	คลอร์เฮ็กซิดีน ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 0.62 % w/v กับ Consepsis®	0.01*	0.01*	0.01*	Consepsis® ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 1.25 % w/v กับ Consepsis®	0.01*	0.01*	0.01*	Consepsis® ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 4 %w/v กับ Consepsis®	0.01*	0.01*	0.01*	Consepsis® ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 0.62 % w/v กับ UltraCal® XS	0.002*	0.041*	0.818	UltraCal® XS ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 1.25 % w/v กับ UltraCal® XS	0.002*	0.093	0.937	UltraCal® XS ดีกว่า
อาโทร์คาปัส ลาคูชา 4 %w/v กับ UltraCal® XS	0.026*	0.485	0.041*	ที่ 0.2 mm UltraCal® XS ดีกว่า ที่ 0.6mm อาโทร์คาปัส ดีกว่า

3. ผลการศึกษาผลของสารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชาต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

การศึกษาผลของคลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้น 1 %v/v สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา (ความเข้มข้น 0.005 %w/v, 0.01%w/v, 0.02 %w/v, 0.04 %w/v) และ DMSO ความเข้มข้น 10 %v/v และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 %w/v ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ L929 ของหนู ที่เวลา 6 ชั่วโมง 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง พบว่า สารทดสอบทุกชนิดมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ต่างจากกลุ่มควบคุมในทุกช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่า % cell viability น้อยกว่า 50 % ในทุกสารทดสอบ ความเป็นพิษของ สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา และคลอร์เฮ็กซิดีน ขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้น และระยะเวลา โดยเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น หรือระยะเวลานานขึ้นความเป็นพิษต่อเซลล์จะมากขึ้น โดยค่าการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาส (% cell viability) เมื่อทดสอบกับสาร ทดสอบแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 11 และรูปที่ 14 นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติแมนวิทนีย์ (Mann-Whitney U test) ความเป็นพิษต่อเซลล์ของคลอร์เฮ็กซิดีน 1 %v/v นั้นมากกว่า สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา ในทุกความเข้มข้น และทุกช่วงเวลา อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ยกเว้นที่ 12 ชั่วโมงเท่านั้นที่ไม่พบความแตกต่างทางนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่าง คลอร์เฮ็กซิดีน 1 %v/v กับ สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา 0.04 %w/v

ตารางที่ 11 แสดงผลของสารต่าง ๆ ต่อค่าการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (% cell viability)

สาร	**% cell viability (±SD)**		
	6 ชั่วโมง	**12 ชั่วโมง**	**24 ชั่วโมง**
สารสกัด 0.005 %w/v	80.29 (6.89)	77.46 (14.01)	41.9 (6.32)
สารสกัด 0.01 %w/v	65.75 (13.27)	44.54 (12.46)	19.17 (4.77)
สารสกัด 0.02 %w/v	32.31 (3.22)	17.19 (4.7)	16.27 (3.09)
สารสกัด 0.04 %w/v	16.17 (4.02)	14.68 (3.56)	14.15 (1.9)
DMSO 10 %v/v	36.83 (8.44)	22.05 (9)	13.24 (4.46)
คลอร์เฮ็กซิดีน 1 %v/v	12.66 (4.21)	14.61 (4.02)	11.65 (1.46)
แคลเซียมไฮดรอกไซด์ 5 %w/v	-	-	22.03 (1.70)



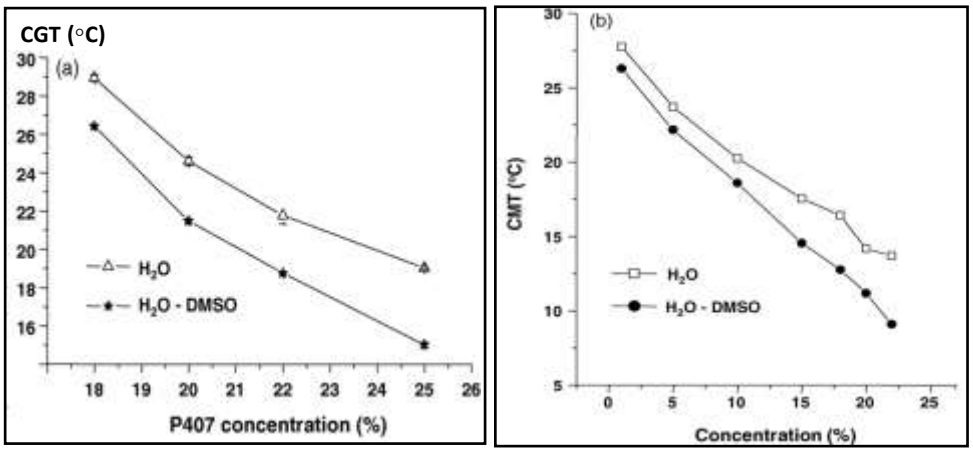
รูปที่ 14 แผนภูมิแสดงผลของสารต่าง ๆ ต่อค่าการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (% cell viability)

บทที่ 4

บทวิจารณ์

สารหลักที่ใช้ในการศึกษาเป็นสารสกัดจากเปลือกไม้ต้นมะหาด (*Artocarpus lakoocha* Roxb.) มีสารประกอบหลักคือ ออกซิเรสเวอราทรอล (oxyresveratrol) ซึ่งสารสกัดที่ใช้ในการศึกษานี้ได้ผ่านการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC (high performance liquid chromatography) เพื่อหาปริมาณออกซิเรสเวอราทรอล พบว่ามีปริมาณเกินกว่าร้อยละ 90 และเนื่องจากยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับผลของสารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา ต่อเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นผู้ศึกษาจึงได้เริ่มทดลองนำสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา ความเข้มข้น 10 %w/v มาทดสอบความไวของ *E. faecalis* ด้วยวิธี diffusion method พบว่าเกิดโซนยับยั้งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร แสดงให้เห็นว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. faecalis* ได้ ปัจจุบันได้มีการนำสารสกัดจากต้นมะหาดมาใช้ในทางการแพทย์ และมีการศึกษามากมายถึงผลของออกซิเรสเวอราทรอล เพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อไวรัส พบว่าออกซิเรสเวอราทรอล ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสที่ก่อโรค ASFV (African swine fever virus) ได้ โดยสามารถทำให้ปริมาณเชื้อไวรัสลดลงได้ถึงร้อยละ 98.5 ในออกซิเรสเวอราทรอลที่ได้จากการสังเคราะห์ และร้อยละ 99.15 สำหรับออกซิเรสเวอราทรอลที่สกัดจากกิ่งไม้ต้นมัลเบอรี่ (mulberry twigs) โดยผู้ศึกษาเชื่อว่าออกซิเรสเวอราทรอลมีผลรบกวนกระบวนการปกติของเซลล์ (disrupting cellular function) และมีผลต่อการแยกสาย DNA (viral DNA replication) โดยลดการผลิตโปรตีน p72[1] และออกซิเรสเวอราทรอลที่สกัดจากอาโทร์คาปัส ลาคูชา (มะหาด) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยังมีผลต่อ viral replication โดยการยับยั้งการสร้างโปรตีน (late protein synthesis) ของเชื้อ herpes simplex virus (HSV) ทั้งชนิด HSV1 และ HSV2 รวมถึง Acyclovir-resistant HSV และช่วยเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) หากใช้ร่วมกับยา Acyclovir[2] แต่สารสกัดจากอาโทร์คาปัส ลาคูชา อยู่ในรูปผงไม่สะดวกต่อการใช้ ผู้ศึกษาจึงได้ นำมาผสมกับ poloxamer 407 (P407) ซึ่งปัจจุบันเป็นสารที่นำมาใช้ผสมกับยาหลายชนิด เช่น การนำมาผสมกับยา ibuprofen พบว่าสามารถทำให้มีการยืดระยะเวลาการออกฤทธิ์จากการค่อย ๆ ปล่อยตัวยาออกมาได้[3] โดยในการศึกษานี้เลือกความเข้มข้น 20 %w/v เพื่อให้สารสกัดมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดที่เหมาะสมต่อการฉีดเข้าสู่คลองรากฟันที่มีขนาดเล็กได้ และมีลักษณะเป็นเจล ที่สามารถยึดเกาะกับผนังคลองรากฟันที่อุณหภูมิร่างกาย และสามารถค่อย ๆ ปล่อยสารสกัดออกมาจาก gel matrix เพื่อให้มีฤทธิ์ในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่อาจหลงเหลืออยู่ในคลองรากฟันได้นานขึ้น ในช่วงระหว่างการรักษาที่มักนานเป็นวัน หรือเป็นสัปดาห์

และในการล้างออกสามารถใช้น้ำยาล้างคลองรากฟัน หรือ sterile saline ที่มีอุณหภูมิต่ำ ๆ ล้างสารผสมนี้ออกได้ง่าย ซึ่งความเข้มข้นของสารทดสอบที่ใช้ในการศึกษานี้ได้เริ่มทดสอบจากความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เป็นเท่ามากกว่าค่า MIC เนื่องจากเมื่อใส่เป็นยาในคลองรากฟันนั้นจะใช้ในปริมาณน้อย และเมื่อผสมใน P407 จะค่อย ๆ ปล่อยสารสกัดออกมาจาก gel matrix จึงจำเป็นที่ต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้น โดยในการศึกษานี้มีการทดสอบความไวของ *E. faecalis* ด้วยวิธี diffusion method ต่อสารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 เพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบในโมเดลฟันต่อไป แต่เนื่องจากสารสกัดจากอาโทร์คาปัส ลาคูชา ไม่สามารถละลายได้ใน P407 จึงจำเป็นต้องใช้ DMSO ซึ่งบางครั้งเรียกว่าเป็น “universal solvent” เพื่อช่วยให้สามารถละลายได้ดีขึ้น โดยมีการศึกษาผลของ DMSO ต่อคุณสมบัติของ P407 พบว่า DMSO จะมีผลลด CMT (Critical micelliazation temperature) และ CGT (Critical gelation temperature) ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ DMSO ดังรูปที่ 14 โดยพบว่า DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 5 มีผลลด CMT ของ 20 % P407 ประมาณ 1.5-3.5 ˚C เนื่องจาก DMSO ส่งผลต่อส่วนโครงสร้างที่เป็นน้ำภายใน Poloxamer (water-water channel) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตรอน และค่าประจุ (increase polarization) นอกจากนี้ยังมีผลเพิ่มการละลายตัว (dissolution) ของเจล ซึ่งถ้าใส่ในปริมาณความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 5 จะมีผลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น[4] นั่นคือการผสม DMSO จะทำให้ P407 เป็นเจลที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่าเดิม จากการทดลองผสมในห้องปฏิบัติการ จึงเลือกใช้ P407 ความเข้มข้น 20 %w/v และใช้ DMSO ร้อยละ 10 โดยผู้ศึกษาเลือกใช้ความเข้มข้นนี้เนื่องจากเป็นปริมาณ DMSO ที่น้อยที่สุดที่สามารถละลายสารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา ที่ต้องการทดสอบ ใน P407 20 %w/v ได้ แต่ในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการทดลองหาค่า CGT หรือ CMT แต่อย่างใด



รูปที่ 15 แผนภูมิแสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า CGT (a) และCMT (b) เมื่อ 20% P407 ผสมกับน้ำและผสม 5% DMSO[4]

ผลการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) ของสารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา และคลอร์เฮ็กซิดีน คือ 0.039 %w/v และ 0.000195 %w/v ตามลำดับ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (MBC) ของสารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา คลอร์เฮ็กซิดีน และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ คือ 0.312 %w/v, 0.00039 %w/v และ 3.125 %w/v ตามลำดับ ซึ่งค่า MIC และ MBC ของสารสกัดค่อนข้างสูงกว่าคลอร์เฮ็กซิดีนมาก แต่อย่างไรก็ตามค่า MBC ของสารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชายังมีค่าต่ำกว่าแคลเซียมไฮดรอกไซด์ประมาณ 10 เท่า

การศึกษาความไวของ *E. faecalis* ต่อสารสกัดด้วยวิธี diffusion method ในการศึกษานี้เพื่อพิจารณาหาความเข้มข้นของสารสกัดที่เริ่มมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ นั่นคือต้องใช้สารสกัดความเข้มข้น 1.25 %w/v หรือ 32 เท่าของค่า MIC จึงจะเกิดโซนยับยั้งขึ้น

การศึกษาความไวของ *E. faecalis* ต่อสารต่าง ๆ ในโมเดลฟันจากห้องปฏิบัติการ พบว่า สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ที่ความเข้มข้น 1.25 %w/v สามารถ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. faecalis* อย่างมีประสิทธิภาพในวันที่ 5 ของการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อาจเนื่องจากความเข้มข้นของสารยังน้อยเกินไป ทำให้ปริมาณสารที่ปล่อยออกมาที่เวลา 3 วัน ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* โดยสารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ที่ความเข้มข้น 4 %w/v หรือ 100 เท่าของค่า MIC เป็นความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. faecalis* ทั้งวันที่ 3 และ 5 ของการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อไม่แตกต่างจากกลุ่มแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (UltraCal® XS) โดยมีค่า logCFU/mg (SD) น้อยกว่า UltraCal® XS เล็กน้อย โดยสารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ความเข้มข้น 4 %w/v และ UltraCal® XS ที่วันที่ 3 คือ 2.1 (±0.32) และ 2.36 (±0.76) ตามลำดับ และที่วันที่ 5 คือ 2.49 (±0.17) และ 2.67 (±0.36) ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับคลอ ร์เฮ็กซิดีน พบว่าสารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ความเข้มข้น 4 %w/v มีค่า logCFU/mg (SD) ที่น้อยกว่า คลอ ร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้น 0.0062 %w/v ที่มีค่า logCFU/mg (SD) ในวันที่ 3 คือ 2.81 (0.79) และวันที่ 5 คือ 2.84 (0.66) แต่ไม่พบความแตกต่างทางนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อของสารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ความเข้มข้น 4 %w/v กับคลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้น 0.0062 %w/v ไม่แตกต่างกัน จากการศึกษานี้จึงสามารถสรุปได้ว่าคลอ ร์เฮ็กซิดีนเป็นสารที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* เมื่อเปรียบเทียบกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ และสารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 เมื่อพิจารณาแยกตามชั้นของเนื้อฟันพบว่า ที่วันที่ 3 และ 5 ของการศึกษา เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมสารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ในทั้ง 3 ชั้นของเนื้อฟัน (0.2, 0.4, 0.6 มิลลิเมตรจากคลอง

รากฟัน) ในขณะที่แคลเซียมไฮดรอกไซด์มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ในทั้ง 3 ชั้นของเนื้อฟันที่วันที่ 3 เท่านั้น ส่วนวันที่ 5 แคลเซียมไฮดรอกไซด์ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ในชั้นเนื้อฟันที่ 0.6 มิลลิเมตรจากคลองรากฟัน อาจเนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไปค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ลดลงทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อลดลงด้วยเช่นกัน โดยมีการศึกษาวัดค่าความเป็นกรดด่าง ที่เนื้อฟันบริเวณด้านใน (1 มิลลิเมตรจากคลองรากฟัน) และนอก (0.5 มิลลิเมตรจากผิวรากฟัน) ที่ใส่แคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่เวลาต่าง ๆ ในสองบริเวณคือ cervical และ apical ของรากฟัน โดยที่เนื้อฟันบริเวณด้านใน ซึ่งน่าจะเป็นบริเวณที่คล้ายกันกับการศึกษานี้ พบว่าระดับค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อใส่แคลเซียมไฮดรอกไซด์ไป 3 วัน จะสูงกว่าที่ 7 วัน และจะเริ่มเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อใส่แคลเซียมไฮดรอกไซด์ไป 2 สัปดาห์[5]

แม้ว่า จากการศึกษานี้ Consepsis® (2% คลอร์เฮ็กซิดีน) นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. faecalis* ที่ดี ที่สุด แต่ความเข้มข้นนี้ เป็นความเข้มข้นที่สูงถึง 10,000 เท่าของค่า MIC และ คลอร์เฮ็กซิดีนยังมีข้อจำกัดในการใช้งานคือ การขาดคุณสมบัติในการละลายเนื้อเยื่อ (tissue solvent activity) การทำให้ฟันเกิดการเปลี่ยนสีได้ และหากใช้ร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่นิยมใช้เป็นน้ำยาล้างคลองรากฟัน จะเกิดเป็นตะกอนของสาร PCA (Parachloroanilene) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งได้ อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันในช่วงระหว่างการรักษาคลองรากฟันแต่ละครั้ง ยังนิยมใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ในการใส่ในคลองรากฟันเป็นมาตรฐานอยู่ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบในการติดเชื้อของคลองรากฟันครั้งแรกยังสามารถกำจัดได้โดยใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์อยู่ มีฤทธิ์สามารถละลายเนื้อเยื่อได้ และสามารถใช้งานได้ง่าย ดังนั้นผลการศึกษานี้ที่พบว่าสารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ที่ 4 %w/v มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ไม่แตกต่างจากแคลเซียมไฮดรอกไซด์ จึงอาจกล่าวได้ว่าภายใต้ข้อจำกัดต่าง ๆ ของการศึกษานี้สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 สามารถเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้ในการกำจัดเชื้อในระหว่างการรักษาคลองรากฟันได้แต่อย่างไรก็ตามยังจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม ในเรื่องกลไกในการออกฤทธิ์ของสารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา ต่อเชื้อแบคทีเรีย การคงตัวของสารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการใช้กำจัดเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคได้

ผลของสารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบบลาส L929 พบว่า ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา (ความเข้มข้น 0.005 %w/v, 0.01 %w/v, 0.02 %w/v, 0.04 %w/v) น้อยกว่า คลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้น 1 %v/v อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีการศึกษาความเป็นพิษของออกซิเรสเวอร์ราทอล ที่ทำการเตรียมโดยการสังเคราะห์ และการสกัดจากกิ่งไม้ต้นมัลเบอรี่ (mulberry twigs) ต่อเซลล์ไตของลิง (vero cell lines) ที่ระยะเวลา 48

ชั่วโมง โดยวิธี MTS reduction assay พบว่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ร้อยละ 50 เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ[1] และอีกการศึกษาความเป็นพิษของออกซิเรสเวอราทรอล ที่สกัดจากแก่นไม้ต้นมะหาด ต่อ เซลล์ไตของลิง (vero cell ATCC CCL81) พบว่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์รอดชีวิตร้อยละ 50 (CC_{50}: 50% cytotoxic concentration) ที่ 48 ชั่วโมงคือ 237.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร[2] แต่การทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นการทดสอบโดยให้เซลล์มาสัมผัสกับสารโดยตรง ซึ่งต่างกับสภาวะจริง ซึ่งสารจะอยู่ในคลองรากฟัน และออกไปสู่เนื้อเยื่อรอบรากฟันในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น

แม้ความเข้มข้นของสารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัด *E. faecalis* ค่อนข้างสูง นั่นคือ ที่ความเข้มข้น 4 %w/v แต่ในระบบคลองรากฟันที่ทำการรักษาคลองรากฟันค่อนข้างเป็นระบบปิด สารในคลองรากฟันสามารถออกไปสู่เนื้อเยื่อรอบรากฟันได้เพียงปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น และปัจจุบันสารที่ใช้กำจัดเชื้อแบคทีเรียในคลองรากฟันในระหว่างการรักษาที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ยังสามารถใช้อย่างระมัดระวังได้อยู่ เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 หรือ 5.25 เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาก็แสดงให้เห็นว่าสารมีความเป็นพิษต่อเซลล์ดังนั้นจึงควรใช้ด้วยความระมัดระวัง

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า

1. สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา สามารถกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ได้โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) คือ 0.039 %w/v และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (MBC) คือ 0.312 %w/v
2. การศึกษาความไวของเชื้อ *E. faecalis* ต่อสารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 พบว่าที่ความเข้มข้น 1.25 %w/v (32 เท่าของค่า MIC) เริ่มพบผลของโซนยับยั้ง และเมื่อใช้สารความเข้มข้นที่มากขึ้น ขนาดของโซนยับยั้งจะเพิ่มขึ้น
3. ในวันที่ 3 และ 5 ของการทดลอง การใช้สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ที่ 4 %w/v หรือ 100 เท่าของค่า MIC เป็นความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อไม่แตกต่างจากกลุ่มแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (UltraCal® XS) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
4. ในวันที่ 3 และ 5 ของการทดลอง การใช้สารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน P407 ทุกความความเข้มข้น และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (UltraCal® XS) มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ด้อยกว่า คลอ ร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้น 1 %w/v และ Consepsis® (ความเข้มข้นร้อยละ 2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
5. ผลการศึกษาผลของสารต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบบลาส L929 ที่เวลา 6 ชั่งโมง 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา ทุกความเข้มข้น (0.005 %w/v, 0.01 %w/v, 0.02 %w/v, 0.04 %w/v) มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า สารคลอ ร์เฮ็กซิดีน 1 %v/v อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นที่เวลา 12 ชั่วโมง สารสกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา 0.04 %w/v มีค่า % cell viability ไม่แตกต่างจาก สารคลอร์เฮ็กซิดีน 1 %v/v

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ เพื่อพัฒนาสาร สกัดอาโทร์คาปัส ลาคูชา ให้เหมาะสมต่อการใช้เป็นยาใส่ในคลองรากฟัน ซึ่งอาจแตกต่างจากสภาวะจริงในช่องปากได้บ้าง เช่น ลักษณะที่ซับซ้อนของระบบคลองรากฟัน การมี tissue fluid จากเนื้อเยื่อรอบ ๆ ปลายรากฟัน เป็นต้น อีกทั้งการศึกษา ความเป็นพิษต่อเซลล์ เป็นการทดสอบโดยให้เซลล์มาสัมผัสกับสารโดยตรง ซึ่งต่างกับสภาวะจริง ซึ่งสารจะอยู่ในคลองรากฟัน และออกไปสู่เนื้อเยื่อรอบรากฟันในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น อีกทั้งการนำไปใช้จริงยังมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม ในเรื่องคุณสมบัติของสารผสมอาโทร์คาปัส ลาคูชา ใน poloxamer 407 เช่น ความคงตัวของสาร เพื่อพิจารณาถึงการเก็บรักษา และอายุการใช้งาน และอุณหภูมิที่สารเปลี่ยนแปลงสถานะจากของเหลวเป็นเจล เป็นต้น และผลของสารสกัดต่อการยึดอยู่ของวัสดุอุดคลองรากฟัน (sealing ability) อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษานี้ ก็สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่น่าสนใจต่อการพัฒนาสารสกัด อาโทร์คาปัส ลาคูชา เพื่อใช้เป็นยาใส่ในคลองรากฟันได้จริงต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Basrani B, Tjaderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, et al. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*** 2003; 96(5): 618-624.
2. Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul S-u, Xia T. Efficacy of Calcium Hydroxide: Chlorhexidine Paste as an Intracanal Medication in Bovine Dentin. ***J Endod*** 2003; 29(5): 338-339.
3. Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. ***Int Endod J*** 2003; 36(4): 267-275.
4. Safavi KE, Spngberg LSW, Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. ***J Endod*** 1990; 16(5): 207-210.
5. Almyroudi A, Mackenzie D, McHugh S, Saunders WP. The Effectiveness of Various Disinfectants Used as Endodontic Intracanal Medications: An In Vitro Study. ***J Endod*** 2002; 28(3): 163-167.
6. Schafer E, Bossmann K. Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Two Calcium Hydroxide Formulations Against *Enterococcus faecalis*. ***J Endod*** 2005; 31(1): 53-56.
7. Zehnder M. Root canal irrigants. ***J Endod*** 2006; 32(5): 389-398.
8. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. ***Int Endod J*** 2009 Apr; 42(4): 288-302.
9. Chuanasa T, Phromjai J, Lipipun V, Likhitwitayawuid K, Suzuki M, Pramyothin P, et al. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: Mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. ***Antivir Res*** 2008; 80(1): 62-70.
10. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ. มะหาด ประโยชน์ทางยา เครื่องสำอาง และการเกษตร. พิมพ์ครั้งที่หนึ่งกรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2551 หน้า 1-113.
11. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps [dissertation]. Sweden: The Department of Oral Microbiology, University of Umea; 1976. p. 1-94.

12. Siqueira JF, Rôcas IN, Racos JN. Microbiology and treatment of endodontic infections. In: Hargreaves KM, Cohen S, Berman LH, editors. Cohen's Pathways of the pulp. 10th ed: Mosby; 2010. p. 559-600.

13. รวี เถียรไพศาล. แบคทีเรียและโรคติดเชื้อ ที่พบบ่อยในช่องปาก. พิมพ์ครั้งที่หนึ่งสงขลา: สำนักพิมพ์ไอคิว มีเดีย; 2552 หน้า 68-70.

14. Love RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. ***Int Endod J*** 2001; 34(5): 399-405.

15. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. ***J Endod*** 2006; 32(2): 93-98.

16. Zehnder M, Guggenheim B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. ***Int Endod J*** 2009; 42(4): 277-287.

17. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of Enterococcus faecalis in human serum. ***Oral Microbiol Immunol*** 2003; 18(4): 234-239.

18. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm Formation in Medicated Root Canals. ***J Endod*** 2002; 28(10): 689-693.

19. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. ***Int Endod J*** 2002; 35(3): 221-228.

20. McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH Required to Kill *Enterococcus faecalis* in Vitro. ***J Endod*** 2004; 30(4): 218-219.

21. Fava LRG, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. ***Int Endod J*** 1999; 32(4): 257-282.

22. Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. ***J Endod*** 1981; 7(1): 17-21.

23. Siqueira JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. ***Int Endod J*** 1999; 32(5): 361-369.

24. SjöGren U, Figdor D, SpÅNgberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. ***Int Endod J*** 1991; 24(3): 119-125.

25. Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. ***Dent Traumatol*** 2002; 18(3): 134-137.

26. Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TMT, Òrstavik D, Haapasalo MPP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. ***Int Endod J*** 2000; 33(2): 126-131.

27. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. ***Clin Microbiol Rev*** 1999; 12(1): 147-179.

28. Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*** 2004; 98(4): 488-492.

29. Dametto FR, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*** 2005; 99(6): 768-772.

30. Esberard RM, Carnes Jr DL, del Rio CE. Changes in pH at the dentin surface in roots obturated with calcium hydroxide pastes. ***J Endod*** 1996; 22(8): 402-405.

31. Jagtap UB, Bapat VA. Artocarpus: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. ***J Ethnopharmacol*** 2010; 129(2): 142-166.

32. Singhatong S, DL, Chaiyasut aC, . Antioxidant and toxicity activities of *Artocarpus lakoocha* Roxb. heartwood extract. ***J Med Plant Res*** 2010; 4(10): 947-953.

33. Saowakon N, Tansatit T, Wanichanon C, Chanakul W, Reutrakul V, Sobhon P. Fasciola gigantica: Anthelmintic effect of the aqueous extract of *Artocarpus lakoocha*. ***Exp Parasitol*** 2009; 122(4): 289-298.

34. Sasivimolphan P, Lipipun V, Likhitwitayawuid K, Takemoto M, Pramyothin P, Hattori M, et al. Inhibitory activity of oxyresveratrol on wild-type and drug-resistant varicella-zoster virus replication in vitro. ***Antivir Res*** 2009; 84(1): 95-97.

35. Lipipun V, Sasivimolphan P, Yoshida Y, Daikoku T, Sritularak B, Ritthidej G, et al. Topical cream-based oxyresveratrol in the treatment of cutaneous HSV-1 infection in mice. ***Antivir Res*** 2011; 91(2): 154-160.

36. Fang S-C, Hsu C-L, Yen G-C. Anti-inflammatory Effects of Phenolic Compounds Isolated from the Fruits of *Artocarpus heterophyllus*. ***J Agric Food Chem*** 2008; 56(12): 4463-4468.

37. Likhitwitayawuid K, Sornsute A, Sritularak B, Ploypradith P. Chemical transformations of oxyresveratrol (trans-2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) into a potent tyrosinase inhibitor and a strong cytotoxic agent. ***Bioorg Med Chem Lett*** 2006; 16(21): 5650-5653.

38. Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, Wolf G, Horn TFW. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. ***Nitric Oxide 9*** 2003; 9(2): 64-76.

39. Khan MR, Omoloso AD, Kihara M. Antibacterial activity of *Artocarpus heterophyllus*. ***Fitoterapia 74*** 2003; 74(5): 501-505.

40. Sato M, Fujiwara S, Tsuchiya H, Fujii T, Iinuma M, Tosa H, et al. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. ***J Ethnopharmacol*** 1996; 54(2-3): 171-176.

41. Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ. Handbook of Phamaceutical excipient. 4th ed. London: Pharmaceutical Press; 2003. p. 447-450.

42. Niu G, Du F, Song L, Zhang H, Yang J, Cao H, et al. Synthesis and characterization of reactive poloxamer 407s for biomedical applications. ***J Control Release 138*** 2009; 138(1): 49-56.

43. Bochot A, Fattal E, Grossiord JL, Puisieux F, Couvreur P. Characterization of a new ocular delivery system based on a dispersion of liposomes in a thermosensitive gel. ***I J Pharm*** 1998; 162(1-2): 119-127.

44. Ricci EJ, Bentley MVLB, Farah M, Bretas RES, Marchetti JM. Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. ***Eur J Pharm Sci*** 2002; 17(3): 161-167.

45. Ricci EJ, Lunardi LO, Nanclares DM, Marchetti JM. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. ***Int J Pharm*** 2005; 288(2): 235-244.

46. Paavola A, Kilpel[illegible]inen I, Yliruusi J, Rosenberg P. Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesia. ***I J Pharm*** 2000; 199(1): 85-93.

47. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. ***J Dent Res*** 1987; 66(8): 1375-1379.

48. Galindo I, HernÃ¡ez B, BernÃ¡ J, Fenoll J, Cenis JL, Escribano JM, et al. Comparative inhibitory activity of the stilbenes resveratrol and oxyresveratrol on African swine fever virus replication. ***Antivir Res*** 2011; 91(1): 57-63.

49. Ur-Rehman T, Tavelin S, GrÖbner G. Effect of DMSO on micellization, gelation and drug release profile of Poloxamer 407. ***I J Pharm*** 2010; 394: 92-98.

50. Nerwich A, Figdor D, Messer HH. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. ***J Endod*** 1993; 19(6): 302-306.

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

หนังสือรับรองผ่านการพิจารณาและได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย

ที่ ศธ 0521.1.03/ 1115

คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ตู้ไปรษณีย์เลขที่ 17
ที่ทำการไปรษณีย์โครงการคอหงส์
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

หนังสือฉบับนี้ให้ไว้เพื่อรับรองว่า

โครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาสารสกัดป่วกหาด เพื่อใช้กำจัดเชื้อในคลองรากฟัน"

หัวหน้าโครงการ ทันตแพทย์หญิงพัทธนันท์ เรืองเกียรติกุล

สังกัดหน่วยงาน นักศึกษาหลังปริญญา ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้ผ่านการพิจารณาและได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย (Ethics Committee) ซึ่งเป็นคณะกรรมการพิจารณาศึกษาการวิจัยในคนของคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ แล้ว ในคราวประชุมครั้งที่ 6/2554 เมื่อวันที่ 25 พฤศจิกายน 2554

ให้ไว้ ณ วันที่ 15 ธ.ค. 2554

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทพญ.ศรีสุรางค์ สุทธปริยาศรี)
รักษาการในตำแหน่งรองคณบดีฝ่ายวิจัย
ประธานกรรมการ

.....กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพ.นพ.สุรพงษ์ วงศ์วัธรานนท์)

.....กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพญ.สวียา ศรีสินทร)

.....กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทพญ.อังคณา เอียรมณศรี)

.....กรรมการ (รองศาสตราจารย์ นพ.พรชัย สถิรปัญญา)

.....กรรมการ (อาจารย์บังคิน สุวรรณวัฒน์)

.....กรรมการ (อาจารย์ ทพญ.สุพัชรินทร์ พิวัฒน์)

.....กรรมการ (อาจารย์ ทพ.กมลพันธ์ เนื่องศรี)

ภาคผนวก 2

ใบเชิญชวน

ขอเชิญเข้าร่วมโครงการวิจัยเรื่อง **การพัฒนาสารสกัดปวกหาด เพื่อใช้กำจัดเชื้อในคลองรากฟัน**

เรียน ท่านผู้อ่านที่นับถือ

ข้าพเจ้า……**ทพญ. พัทรนันท์ เรืองเกียรติกุล** .....ใคร่ขอเล่าถึงโครงการวิจัยที่กำลังทำอยู่ และขอเชิญชวนท่านเข้าร่วมโครงการนี้ กล่าวคือ โครงการนี้เป็นโครงที่ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้สารสกัดปวกหาดในการฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ในคลองรากฟัน โดยเป็นการศึกษาทางห้องปฏิบัติการ….

ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะขอใช้เฉพาะฟันที่ถูกถอนแล้วของผู้ป่วยที่มารับการถอนฟัน **ในงานวิจัยนี้เท่านั้น โดยฟันดังกล่าวเป็นฟัน** ที่ถูกถอนเนื่องจากโรคปริทันต์หรือเพื่อการจัดฟันในคลินิกทันตกรรม โดยไม่ได้กระทำการใดๆกับร่างกายผู้ป่วย จึงไม่ได้เพิ่มความเสี่ยงต่อผู้ป่วยแต่อย่างใด โดยฟันจะถูกนำมาใช้เพื่อการทดลองประสิทธิภาพของยาที่เป็นสารสกัดจากสมุนไพรต่อการกำจัดเชื้อแบคทีเรียทางห้องปฏิบัติการ เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคติดเชื้อในคลองรากฟัน เมื่อเสร็จสิ้นโครงการวิจัยนี้แล้ว ฟันที่ถูกถอนมาใช้ในงานวิจัยนี้จะถูกทำลายตามมาตรฐานของโรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

หากท่านมีข้อสงสัยประการใดเกี่ยวกับโครงการวิจัยนี้ กรุณาติดต่อข้าพเจ้า **ทพญ. พัทรนันท์ เรืองเกียรติกุล** สาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ โทรศัพท์ 074-429877 , 081-5411184

ไม่ว่าท่านจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้หรือไม่ ท่านจะยังคงได้รับการรักษาที่ดีเช่นเดียวกับผู้ป่วยคนอื่น ๆ และถ้าท่านต้องการที่จะถอนตัวออกจากการศึกษานี้เมื่อใด ท่านก็สามารถกระทำได้อย่างอิสระ

หากท่านมีคำถามใดๆก่อนที่จะตัดสินใจเข้าร่วมในโครงการนี้ โปรดซักถามคณะวิจัยได้อย่างเต็มที่

ขอขอบคุณเป็นอย่างสูง

ลงชื่อ …..……...……นักศึกษาผู้วิจัย

(ทพญ. พัทรนันท์ เรืองเกียรติกุล)

ลงชื่อ …...……..……อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

(ศ.ดร.รวี เถียรไพศาล)

หมายเหตุ :- กรุณาอ่านข้อความให้เข้าใจก่อนเซ็นชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการ

แบบยินยอมเข้าร่วมการศึกษา (ในกรณีผู้ถูกทดลองบรรลุนิติภาวะ)

โครงการวิจัยเรื่อง...**การพัฒนาสารสกัดปวกหาด เพื่อใช้กำจัดเชื้อในคลองรากฟัน**

วันที่……..เดือน……พ.ศ…….

ข้าพเจ้า……...……....อายุ…….ปี อาศัยอยู่บ้านเลขที่…… ถนน……...……..……ตำบล……....อำเภอ……..จังหวัด……...…… ได้อ่าน/ได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียดและมีความเข้าใจดีแล้ว โดยผู้รับผิดชอบโครงการคือ **ทพญ. พัทรนันท์ เรืองเกียรติกุล สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ โทรศัพท์ 074-429877 , 081-5411184** หรือหากเมื่อมีปัญหาใด ๆ เกิดขึ้นอันเนื่องจากการทำวิจัยในเรื่องนี้ข้าพเจ้าสามารถร้องเรียนไปที่คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112 โทรศัพท์ 074-28-7510

หากผู้วิจัยมีข้อมูลเพิ่มเติมทั้งด้านประโยชน์และโทษที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะแจ้งให้ข้าพเจ้าทราบอย่างรวดเร็ว โดยไม่ปิดบัง

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะของดการเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยมิต้องแจ้งให้ทราบล่วงหน้าโดยการงดการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลกระทบต่อการได้รับบริการหรือการรักษาที่ข้าพเจ้าจะได้รับแต่ประการใด

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะที่เกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับ จะไม่เปิดเผยข้อมูลหรือผลการวิจัยของข้าพเจ้าเป็นรายบุคคลต่อสาธารณชน จะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย หรือการเปิดเผยข้อมูลต่อผู้มีหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการสนับสนุนและกำกับดูแลการวิจัย

ข้าพเจ้าได้อ่าน/ได้รับการอธิบายข้อความข้างต้นแล้ว และมีความเข้าใจดีทุกประการ จึงได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจโดยนักวิจัยได้ให้สำเนาแบบยินยอมที่ลงนามแล้วกับข้าพเจ้าเพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐาน จำนวน 1 ชุด

ลงชื่อ……..……ผู้ยินยอม

ลงชื่อ.....นักศึกษาผู้วิจัย

(ทพญ. พัทรนันท์ เรืองเกียรติกุล)

ลงชื่อ .....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

(ศ.ดร.รวี เถียรไพศาล)

ลงชื่อ.....พยาน

ลงชื่อ.....พยาน

แบบยินยอมเข้าร่วมการศึกษา (ในกรณีผู้ถูกทดลองบรรลุนิติภาวะ)

โครงการวิจัยเรื่อง **การพัฒนาสารสกัดปวกหาด เพื่อใช้กำจัดเชื้อในคลองรากฟัน**

วันที่……..เดือน……พ.ศ…….

ข้าพเจ้า…….……....อายุ…….ปี อาศัยอยู่บ้านเลขที่……

ถนน……ตำบล……....อำเภอ……..…..

จังหวัด……

ได้อ่าน/ได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียดและมีความเข้าใจดีแล้ว โดยผู้รับผิดชอบโครงการคือ **ทพญ. พัทรนันท์ เรืองเกียรติกุล สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาวิทยาเอ็นโดดอนต์ ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ โทรศัพท์ 074-429877 , 081-5411184** หรือหากเมื่อมีปัญหาใด ๆ เกิดขึ้นอันเนื่องจากการทำวิจัยในเรื่องนี้ข้าพเจ้าสามารถร้องเรียนไปที่คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112 โทรศัพท์ 074-28-7510

หากผู้วิจัยมีข้อมูลเพิ่มเติมทั้งด้านประโยชน์และโทษที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะแจ้งให้ข้าพเจ้าทราบอย่างรวดเร็ว โดยไม่ปิดบัง

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะของดการเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยมิต้องแจ้งให้ทราบล่วงหน้าโดยการงดการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลกระทบต่อการได้รับบริการหรือการรักษาที่ข้าพเจ้าจะได้รับแต่ประการใด

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะที่เกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับ จะไม่เปิดเผยข้อมูลหรือผลการวิจัยของข้าพเจ้าเป็นรายบุคคลต่อสาธารณชน จะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย หรือการเปิดเผยข้อมูลต่อผู้มีหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการสนับสนุนและกำกับดูแลการวิจัย

ข้าพเจ้าได้อ่าน/ได้รับการอธิบายข้อความข้างต้นแล้ว และมีความเข้าใจดีทุกประการ จึงได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจโดยนักวิจัยได้ให้สำเนาแบบยินยอมที่ลงนามแล้วกับข้าพเจ้าเพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐาน จำนวน 1 ชุด

ลงชื่อ.....ผู้ยินยอม

ลงชื่อ .....บิดา/ผู้ใช้อำนาจปกครอง

ลงชื่อ.....มารดา

ลงชื่อ.....นักศึกษาผู้วิจัย
(ทพญ. พัทรนันท์ เรืองเกียรติกุล)

ลงชื่อ .....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(ศ.ดร.รวี เถียรไพศาล)

ลงชื่อ.....พยาน

ลงชื่อ.....พยาน

ภาคผนวก 3

ผลข้อมูลในการศึกษา

ตาราง ก. ผลการศึกษาความไวของ *E. faecalis* ต่อสารสกัดในโมเดลฟัน ในวันที่ 3

กลุ่ม	ตัวอย่างที่	ชั้นเนื้อฟัน	CFU/mg	logCFU/mg	ค่าเฉลี่ย logCFU/mg
CHX 16-MIC	1	1	189000	5.28	4.71
		2	48300	4.68	
		3	14700	4.17	
	2	1	39000	4.59	3.363333
		2	556	2.75	
		3	556	2.75	
	3	1	5950	3.77	3.056667
		2	714	2.85	
		3	357	2.55	
	4	1	29600	4.47	3.823333
		2	5190	3.72	
		3	1920	3.28	
	5	1	7900	3.9	3.066667
		2	682	2.83	
		3	295	2.47	
	6	1	364	2.56	2.096667
		2	170	2.23	
		3	31.9	1.5	
CHX 32-MIC	7	1	25200	4.4	3.69
		2	2320	3.37	
		3	2010	3.3	
	8	1	40600	4.61	2.323333
		2	227	2.36	
		3	0	0	
	9	1	3540	3.55	3.036667
		2	1440	3.16	
		3	254	2.4	

กลุ่ม	ตัวอย่างที่	ชั้นเนื้อฟัน	CFU/mg	logCFU/mg	ค่าเฉลี่ย logCFU/mg
CHX 32-MIC	10	1	9070	3.96	2.236667
		2	556	2.75	
		3	0	0	
	11	1	208	2.32	1.87
		2	111	2.05	
		3	17.54	1.24	
	12	1	34300	4.54	3.73
		2	1880	3.27	
		3	2380	3.38	
A. lakoocha 16-MIC	13	1	576000	5.76	4.623333
		2	4190	3.62	
		3	31000	4.49	
	14	1	386000	5.59	4.796667
		2	40300	4.61	
		3	15600	4.19	
	15	1	862	2.94	2.386667
		2	625	2.8	
		3	26.3	1.42	
	16	1	10600	4.03	2.926667
		2	263	2.42	
		3	213	2.33	
	17	1	1350	3.13	2.343333
		2	242	2.38	
		3	33.33	1.52	
	18	1	55600	4.75	3.99
		2	6630	3.82	
		3	2500	3.4	
A. lakoocha 32-MIC	19	1	17500	4.24	3.906667
		2	6360	3.8	
		3	4840	3.68	
	20	1	32100	4.51	3.796667
		2	2970	3.47	
		3	2550	3.41	

กลุ่ม	ตัวอย่างที่	ชั้นเนื้อฟัน	logCFU	logCFU/mg	ค่าเฉลี่ย logCFU/mg
A. lakoocha 32-MIC	21	1	1040	3.02	1.673333
		2	97.2	2	
		3	0	0	
	22	1	93800	4.97	3.986667
		2	3800	3.58	
		3	2580	3.41	
	23	1	2810	3.45	2.96
		2	1580	3.2	
		3	170	2.23	
	24	1	2650	3.42	2.393333
		2	83.33	1.92	
		3	68.6	1.84	
UltraCal® XS	25	1	1250	3.1	3.15
		2	1500	3.18	
		3	1470	3.17	
	26	1	405	2.61	2.796667
		2	556	2.75	
		3	1060	3.03	
	27	1	3750	3.57	2.99
		2	1100	3.04	
		3	230	2.36	
	28	1	30.3	1.48	1.58
		2	28.85	1.46	
		3	62.5	1.8	
	29	1	166.67	2.22	1.326667
		2	57.14	1.76	
		3	0	0	
	30	1	667	2.82	2.296667
		2	61	1.79	
		3	190	2.28	
Control	31	1	318000	5.5	4.933333
		2	206000	5.31	
		3	9820	3.99	

กลุ่ม	ตัวอย่างที่	ชั้นเนื้อฟัน	logCFU	logCFU/mg	ค่าเฉลี่ย logCFU/mg
Control	32	1	78300	4.89	4.27
		2	8330	3.92	
		3	10000	4	
	33	1	12500	4.1	3.596667
		2	2290	3.36	
		3	2120	3.33	
	34	1	9830	4	3.54
		2	2140	3.33	
		3	1940	3.29	
	35	1	15800	4.2	3.416667
		2	2190	3.34	
		3	512	2.71	
	36	1	5150	3.71	3.21
		2	3110	3.49	
		3	267	2.43	
Consepsis®	37	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	38	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	39	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	40	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
A. lakoocha 100-MIC (4 %w/v)	41	1	776	2.89	2.433333
		2	114	2.06	
		3	226	2.35	
	42	1	559	2.75	2.19
		2	167	2.22	
		3	40	1.6	

กลุ่ม	ตัวอย่างที่	ชั้นเนื้อฟัน	logCFU	logCFU/mg	ค่าเฉลี่ย logCFU/mg
A. lakoocha 100-MIC (4 %w/v)	43	1	403	2.61	1.93
		2	22.2	1.35	
		3	67.8	1.83	
	44	1	657.1	2.82	2.393333
		2	236	2.37	
		3	98.04	1.99	
	45	1	180	2.26	1.583333
		2	11.1	1.05	
		3	27.2	1.44	
	46	1	460	2.66	2.056667
		2	37	1.57	
		3	87.5	1.94	
CHX 150-MIC	47	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	48	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	49	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	50	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	51	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	52	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
CHX 1 %w/v	53	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	

กลุ่ม	ตัวอย่างที่	ชั้นเนื้อฟัน	logCFU	logCFU/mg	ค่าเฉลี่ย logCFU/mg
CHX 1 %w/v	54	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	55	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	56	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	

ตาราง ข. ผลการศึกษาความไวของ *E. faecalis* ต่อสารสกัดในโมเดลฟัน ในวันที่ 5

กลุ่ม	ตัวอย่างที่	ชั้นเนื้อฟัน	logCFU	logCFU/mg	ค่าเฉลี่ย logCFU/mg
CHX 16-MIC	57	1	15000	4.18	4.103333
		2	93100	4.97	
		3	1430	3.16	
	58	1	11000	4.04	3.756667
		2	8140	3.91	
		3	2100	3.32	
	59	1	125000	5.1	3.74
		2	1570	3.2	
		3	833	2.92	
	60	1	19200	4.28	3.02
		2	167	2.22	
		3	366	2.56	
	61	1	32400	4.51	4.193333
		2	8640	3.94	
		3	13500	4.13	
	62	1	3890	3.59	2.523333
		2	148	2.17	
		3	648	1.81	
CHX 36-MIC	63	1	94100	4.97	3.406667
		2	154	2.19	

กลุ่ม	ตัวอย่างที่	ชั้นเนื้อฟัน	logCFU	logCFU/mg	ค่าเฉลี่ย logCFU/mg
CHX	63	3	1140	3.06	
36-MIC	64	1	1750	3.24	2.613333
		2	219	2.34	
		3	181	2.26	
	65	1	80800	4.91	2.753333
		2	88.2	1.95	
		3	25	1.4	
	66	1	2210	3.34	3.36
		2	952	2.98	
		3	5820	3.76	
	67	1	1600	3.2	1.67
		2	65.2	1.81	
		3	0	0	
	68	1	13700	4.14	3.23
		2	500	2.7	
		3	702	2.85	
A. lakoocha	69	1	11900	4.08	3.693333
16-MIC		2	4290	3.63	
		3	2360	3.37	
	70	1	13300	4.12	3.586667
		2	9810	3.99	
		3	447	2.65	
	71	1	21700	4.34	3.51
		2	1440	3.16	
		3	1060	3.03	
	72	1	23000	4.36	3.663333
		2	1670	3.22	
		3	2550	3.41	
	73	1	3890	3.59	3.18
		2	1670	3.22	
		3	543	2.73	
	74	1	11800	4.07	3.523333
		2	1410	3.15	

กลุ่ม	ตัวอย่างที่	ชั้นเนื้อฟัน	logCFU	logCFU/mg	ค่าเฉลี่ย logCFU/mg
	74	3	2250	3.35	
A. lakoocha 32-MIC	75	1	13900	4.14	3.47
		2	2250	3.35	
		3	833	2.92	
	76	1	15800	4.2	3.48
		2	1220	3.09	
		3	1400	3.15	
	77	1	8330	3.92	3.273333
		2	375	2.57	
		3	2160	3.33	
	78	1	9380	3.97	3.183333
		2	581	2.76	
		3	667	2.82	
	79	1	6320	3.8	3.173333
		2	2240	3.35	
		3	233	2.37	
	80	1	9090	3.96	3.263333
		2	781	2.89	
		3	873	2.94	
UltraCal® XS	81	1	769	2.89	2.783333
		2	525	2.72	
		3	548	2.74	
	82	1	90.9	1.96	3.226667
		2	6070	3.78	
		3	8800	3.94	
	83	1	217	2.34	2.803333
		2	60	1.78	
		3	19500	4.29	
	84	1	789	2.9	2.606667
		2	20	1.3	
		3	4140	3.62	
	85	1	870	2.94	2.29
		2	203	2.31	

กลุ่ม	ตัวอย่างที่	ชั้นเนื้อฟัน	logCFU	logCFU/mg	ค่าเฉลี่ย logCFU/mg
UltraCal® XS	85	3	41.67	1.62	
	86	1	869.6	2.94	2.286667
		2	40.5	1.61	
		3	204	2.31	
Control	87	1	15400	4.19	3.47
		2	1500	3.18	
		3	1090	3.04	
	88	1	39300	4.59	4.153333
		2	7730	3.89	
		3	9520	3.98	
	89	1	51500	4.71	4.27
		2	13100	4.12	
		3	9570	3.98	
	90	1	100000	5	4.55
		2	41700	4.62	
		3	10800	4.03	
	91	1	18500	4.27	3.313333
		2	375	2.57	
		3	1270	3.1	
	92	1	14800	4.17	3.46
		2	1450	3.16	
		3	1120	3.05	
Consepsis®	93	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	94	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	95	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	96	1	0	0	0
		2	0	0	

กลุ่ม	ตัวอย่างที่	ชั้นเนื้อฟัน	logCFU	logCFU/mg	ค่าเฉลี่ย logCFU/mg
Consepsis®	96	3	0	0	
A. lakoocha 100-MIC (4 %w/v)	97	1	1830	3.26	2.593333
		2	444	2.65	
		3	74.4	1.87	
	98	1	1850	3.27	2.76
		2	523	2.72	
		3	198	2.29	
	99	1	309	2.49	2.406667
		2	306	2.49	
		3	174	2.24	
	100	1	2750	3.44	2.283333
		2	81.4	1.91	
		3	31.9	1.5	
	101	1	909	2.96	2.436667
		2	297	2.47	
		3	75.4	1.88	
	102	1	893	2.95	2.443333
		2	141	2.15	
		3	169	2.23	
CHX 150-MIC	103	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	104	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	105	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	106	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	107	1	0	0	0
		2	0	0	

กลุ่ม	ตัวอย่างที่	ชั้นเนื้อฟัน	logCFU	logCFU/mg	ค่าเฉลี่ย logCFU/mg
CHX	107	3	0	0	
150-MIC	108	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
CHX	109	1	0	0	0
1 %w/v		2	0	0	
		3	0	0	
	110	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	111	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	
	112	1	0	0	0
		2	0	0	
		3	0	0	

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวพัทรนันท์ เรืองเกียรติกุล

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5210820003

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2550

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ โรงพยาบาลปากพะยูน อ.ปากพะยูน จ.พัทลุง ปีการศึกษา 2552-2554

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

ทันตแพทย์ชำนาญการ กลุ่มงานทันตกรรม โรงพยาบาลพัทลุง จ.พัทลุง

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Phattharanan Ruangkiatkul, Rawee Teanpaisan, Kewalin Thammasitboon, Jindaporn Puripattanavong, Damrongsak Faroongsarn. Effect of poloxamer containing *Artocarpus lakoocha* Roxb. against *Enterococcus faecalis*. นำเสนอแบบ Poster presentation (Proceeding หน้า 189-190) ในการประชุมวิชาการ The Second Current Drug Development International Conference (CDD2012) ในวันที่ 2-4 พฤษภาคม 2555 จัดโดย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ณ Phuket Graceland Resort and Spa จังหวัดภูเก็ต ประเทศไทย