Original Article

ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดข่าลิงต่อเชื้อ *Enterococcus faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม

สุภารัตน์ จันทร์เหลือง*, สยมพล อาลัย, เวทย์ ศรีละคร และ นพวัฒน์ เพ็งคำศรี

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

* Corresponding author: suparatkha@hotmail.com

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นของสารสกัดข่าลิง (*Alpinia conchigera*) ชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol ต่อเชื้อที่เป็นตัวแทนของเชื้อแกรมบวก แกรมลบ เชื้อที่เจริญโดยไม่ใช้ออกซิเจน เชื้อรา และ *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระและแบบไบโอฟิล์ม รวมถึงศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ **วิธีการศึกษา:** สกัดสารจากเหง้าข่าลิงโดยวิธี percolation ด้วย hexane, ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพเบื้องต้นของสารสกัดด้วย agar disc diffusion assay หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ และฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ด้วย agar dilution assay ศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อและเวลาสัมผัสสารทดสอบของเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม **ผลการศึกษา:** สารสกัดทุกชั้นมีฤทธิ์ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) โดยสารสกัดชั้น hexane มีฤทธิ์แรงที่สุด สารสกัดมีฤทธิ์อ่อนต่อเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) และ *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps. aeruginosa*) แต่ไม่มีฤทธิ์ต่อเชื้อ *Candida albicans* (*C. albicans*) สารสกัดชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. faecalis* โดยมีค่า inhibition zone เท่ากับ 11.52 ± 0.07, 9.87 ± 1.04 และ 7.27 ± 2.57 มม. ตามลำดับ ค่า MIC ต่อเชื้อ *E. faecalis* ของสารสกัดชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol เท่ากับ 25.0, 12.5 และ 50.0 มก./มล. ตามลำดับ ค่า MBC ต่อเชื้อที่เจริญแบบอิสระเท่ากับ 50.0, 50.0 และ 100.0 มก./มล. ตามลำดับ และเพิ่มขึ้นเป็น > 125.0, 125.0 และ 250 มก./มล. ตามลำดับ เมื่อเชื้อมีการเจริญแบบไบโอฟิล์ม นอกจากนี้ ยังพบว่าต้องใช้สารสกัดชั้น ethyl acetate (125.0 มก./มล.) และชั้น methanol (250.0 มก./มล.) เป็นเวลา 4 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ จึงสามารถฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์มได้ **สรุป:** สารสกัดข่าลิงมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระและใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้นเพื่อฆ่าเชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม

ศัพท์สำคัญ: ฤทธิ์ต้านจุลชีพ, ข่าลิง, การเจริญแบบไบโอฟิล์ม, *Enterococcus faecalis*

ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 2553;5(4):279-286[§]

บทนำ

การติดเชื้อในคลองรากฟันเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จในการรักษาคลองรากฟัน วิธีกำจัดเชื้อแบคทีเรียจากคลองรากฟันหลังจากการเอาเนื้อเยื่อ (pulp) ออกแล้ว ที่ใช้ในปัจจุบัน คือ การใช้น้ำยาสวนล้างคลองรากฟัน การขยายคลองรากฟัน และการใส่ยาในคลองรากฟัน ก่อนที่จะอุดฟันด้วยสารเฉื่อย[1,2] น้ำยาสวนล้างคลองรากฟันที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ EDTA 17%, chlorhexidine 2% และ sodium hypochlorite 1.3% อย่างไรก็ตามมีรายงานความล้มเหลวในการรักษาคลองรากฟันที่เกิดจากการติดเชื้อซ้ำสูงถึงร้อยละ 10 - 20[3] พบว่าส่วนใหญ่ยังมีการอักเสบและการติดเชื้อในคลองรากฟัน[4] นอกจากนี้ยังพบว่า 1 ใน 8 ของผู้ป่วยที่ใช้ยาปฏิชีวนะก่อนการรักษาคลองรากยังคงพบเชื้อ *E. faecalis*[5] โดยเชื้อ *E. faecalis* นี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่เจริญในทางเดินอาหารของมนุษย์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่กำจัดยาก[6] การเจริญของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ รวมถึง *E. faecalis* บนผิวรากฟันมีลักษณะแบบยึดเกาะกลุ่มกันเป็นเยื่อบาง หรือ ไบโอฟิล์ม (biofilm) ซึ่งจะเพิ่มการดื้อต่อยารักษาอาการในช่องปากมากขึ้น[7]

พืชในตระกูลข่า (*Alpnia* sp.) เป็นพืชที่คนไทยใช้ประโยชน์แพร่หลายทั้งเป็นอาหารและยาสมุนไพร มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชตระกูลข่าอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะการต้านเชื้อจุลชีพ[8] เช่น การศึกษาของ Rao และคณะพบว่าสารสกัดหยาบจากเหง้าข่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด ดังนี้ *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *S. aureus* และ *E. faecalis* โดยมีค่า MBC เท่ากับ 0.16, 0.04, 0.16 และ 0.32 มก./มล. ตามลำดับ และแบคทีเรียแกรมลบเช่น *E. coli, Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Ps. aeruginosa* และ *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) เป็นต้น โดยมีค่า MBC ตามลำดับดังนี้ 0.01, 0.32, 0.08 และ 1.28 มก./มล.[9] ข่าลิง (*Alpinia conchigera* Griff) เป็นพืชในสกุลเดียวกับข่า มีสรรพคุณรักษาอาการปวดท้อง จุก

[§] 15th year of Srinakharinwirot Journal of Pharmaceutical Science

เสียดแน่นเฟ้อ ท้องผูก แมลงกัดต่อย วิงเวียนศีรษะ ฝีหนอง กลากเกลื้อน ขับพยาธิในลำไส้ สตรีอยู่ไฟใช้กินหลังคลอด[10] และโรคหนองในจากเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*)[11] สารประกอบสำคัญในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากใบข่าลิง ได้แก่ 1'-acetoxychavicol acetate, chavicol, chavicol acetate 1-hydroxy, cinnamyl alcohol, 4-acetoxy acetate, cymene para, heptan-3-one 5-hydroxy-7-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-1-phenyl, heptane-3-5-dione-1-7-diphenyl, kaempferide[12] และจากผลการศึกษาของ Ibraham และคณะ (2009) สารประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากเหง้า คือ 1,8-cineole, β-bisabolene, β-sesquiphellandrene และ β-elemene[8] ผลศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยจากข่าลิงพบว่ามีฤทธิ์ต่อ *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*), *S. typhimurium, E. coli*, *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) และ *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*)[13] และพบว่ามีฤทธิ์ต่อ *Ps. aeruginosa, Ps. cepacia, S. aureus* และ *S. epidermidis*[8]

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานฤทธิ์ของสารสกัดข่าลิงต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์มซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้การรักษาคลองรากฟันล้มเหลว ดังนั้นการศึกษาวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพจากสารสกัดข่าลิงต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญเติบโตแบบยึดเกาะกลุ่มกันเป็นเยื่อบาง ซึ่งเป็นการนำเอาสมุนไพรท้องถิ่นมาใช้ประโยชน์ด้านทันตกรรม และอาจนำไปศึกษาต่อยอดเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางทันตกรรมในอนาคตต่อไป

วิธีการศึกษา

1) วัสดุอุปกรณ์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ คือ *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25927), *Ps. aeruginosa* (ATCC 27853), *C. albicans* (ATCC 10231) และ *E. faecalis* (ATCC 29212) ได้จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี เหง้าข่าลิงสดเก็บจากอำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี ระหว่างเดือนธันวาคม 2551 ถึงมกราคม 2552 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ Tryptic Soy Agar (TSA), Tryptic Soy Broth (TSB), Mueller Hinton Agar (MHA) (บริษัท Merck, สหรัฐอเมริกา) Sabouraud Dextrose Agar: SDA (Merck) สารละลาย EDTA 17%, chlorhexidine 2% และ sodium hypochlorite 5% (ผลิตภัณฑ์ของคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ampicillin disc ความแรง 10 ไมโครกรัม/ดิสก์ (บริษัท Dickinson, ประเทศสหรัฐ อเมริกา) nitrocellulose membrane (เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มม.) (บริษัท Millipore Corp., ประเทศสหรัฐอเมริกา) สารเคมีที่ใช้สำหรับการศึกษานี้สั่งซื้อจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา และเป็นสารเคมีเกรดมาตรฐานสำหรับการทดลอง

2) การเตรียมสารสกัดข่าลิง

ล้างเหง้าข่าลิงให้สะอาดหั่นเป็นชิ้นเล็ก อบที่ 45 °C เป็นเวลา 3 วันจนแห้ง บดละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร ชั่งน้ำหนักผงแห้ง 1 กิโลกรัม ห่อด้วยผ้าขาวบางใส่ลงในคอลัมน์ เติมตัวทำละลาย hexane พอท่วม ปิดฝาทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เก็บสารละลายที่ได้และทำซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมสารสกัดที่ได้ทั้งหมดกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 2 ทำให้แห้งด้วย rotary evaporator (Buchi, สวิตเซอร์แลนด์) จากนั้นชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณปริมาณสารสกัดที่ได้ หลังจากนั้นผึ่งผงสมุนไพรที่เหลือให้แห้ง และสกัดด้วยวิธีเดียวกันแต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ

3) การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้น

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี agar disc diffusion[14] โดยการเตรียมส่วนสกัดหยาบข่าลิงชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol ใน 95% ethanol ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยสารทดสอบมาตรฐานที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ใช้ ได้แก่ chlorhexidine (2% หรือ 20 มก./มล.), EDTA (17% หรือ 170 มก./มล.) และ sodium hypochlorite (2.5% หรือ 25 มก./มล.) กรองสารละลายทั้งหมดด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Millipore Corp., สหรัฐอเมริกา) จากนั้นหยดสารละลายชนิดต่าง ๆ ดังกล่าว ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบน sterile paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. โดยหยด 25 ไมโครลิตรแล้วทิ้งให้แห้ง แล้วหยดอีกด้านด้วย 25 ไมโครลิตรที่เหลือแล้วปล่อยให้แห้ง ใช้ ampicillin disc ความแรง 10 มคก./ดิสก์ เป็น positive control

เตรียมเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อมีความขุ่นใกล้เคียงกับ McFarland No. 0.5 จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มเชื้อและกระจายเชื้อให้ทั่วบน MHA plate แล้ววาง paper disc หรือ disc ตัวทำละลายของสารฆ่าเชื้อมาตรฐานและสารสกัดข่าลิงที่เตรียมได้ลงบน plate จากนั้นเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับเชื้อแบคทีเรีย และที่ 25 °C 48 ชั่วโมงสำหรับเชื้อรา อ่านผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone หรือ inhibition zone) ที่เกิดขึ้น สารทดสอบที่มีบริเวณใสมากกว่า 5 มม. ถือว่ามีฤทธิ์ต้านจุลชีพ[15] คำนวณค่า antimicrobial index (AI) จากสูตร (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone – 5)/5 [16]

การศึกษาค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ E. faecalis โดยวิธี agar dilution assay[17]

เตรียมสารสกัดข่าลิงชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol และสารมาตรฐานทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แบบ two fold dilution ใน MHA slant หยดเชื้อ *E. faecalis* ที่ความขุ่นใกล้เคียงกับ McFarland No. 0.5 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนผิวอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตความเข้มข้นต่ำสุดที่มองไม่เห็นเชื้อขึ้นซึ่งถือเป็นค่า MIC หลังจากนั้นถ่ายเชื้อจากหลอดที่ไม่เห็นการเจริญของเชื้อทั้งหมดโดยใช้ไม้พันสำลีชุบน้ำเกลือป้ายบนผิวอาหาร และนำไปป้ายบน MHA plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นที่ไม่มีการเจริญของเชื้อหรือมีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 5 ถือว่าความเข้มข้นนั้นเป็นค่า MBC[18]

การทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อ E. faecalis ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม[19]

จำลองการเจริญของเชื้อแบบไบโอฟิล์มโดยหยดเชื้อที่ความขุ่นใกล้เคียงกับ McFarland No. 0.5 ลงบน nitrocellulose membrane ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 มม. บน TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อโดยถ่ายเชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์มลงในหลอดที่มีสารสกัดข่าลิงชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol และสารมาตรฐานทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ใน TSB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดทดลองไป sonicate 5 นาที เพื่อให้เชื้อหลุดออกจาก nitrocellulose membrane และกระจายตัวดี จากนั้นเจือจางสารละลาย 10 เท่า กระจายเชื้อบน MHA plate แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีต่อ plate โดย plate ที่มีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 5 ถือว่ามีฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม

การศึกษาเวลาสัมผัสสารที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ E.faecalis ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม[20]

จำลองการเจริญของเชื้อแบบไบโอฟิล์มด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น บ่มเชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์มในหลอดที่มีสารสกัดข่าลิงชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol และสารมาตรฐานทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้นต่ำสุด ที่ฆ่าเชื้อแบบไบโอฟิล์มที่ได้จากข้อ 2.3 แต่ละหลอดบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาแตกต่างกันดังนี้ 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วถ่ายแผ่นไบโอฟิล์มลงในหลอดทดลองที่มีเฉพาะ TSB เพื่อ sonicate แยกกระจายเชื้อ และ spread plate เพื่อนับจำนวนโคโลนีต่อ plate โดย plate ที่มีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 5 และใช้เวลาสั้นที่สุดถือว่าเป็นเวลาที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม

ผลการศึกษา

สกัดสารจากเหง้าข่าลิงด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ hexane, ethyl acetate และ methanol ด้วยวิธี percolation หลังจากระเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator แล้วได้สารสกัดที่มีลักษณะข้นหนืดสีน้ำตาลดำ ปริมาณของสารสกัดชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol คิดเป็นร้อยละ 4.06, 2.17 และ 6.55 ของน้ำหนักผงแห้งตามลำดับ เรียกสารสกัดเหล่านี้ว่า สารสกัดหยาบข่าลิงชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol

ฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้น

ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดข่าลิงทั้ง 3 ชั้นไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* แต่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, *E. coli, Ps. Aeruginosa* และ *E. faecalis* โดยสารสกัดข่าลิงชั้น hexane มีฤทธิ์ต้าน

ตารางที่ 1 Inhibition zone และ antimicrobial index ของสารทดสอบต่อเชื้อต่าง ๆ ใน agar disc diffusion assay

เชื้อทดสอบ	สารทดสอบ	ฤทธิ์ต้านจุลชีพ	
		Diameter of clear zone (มม.)	Antimicrobial index
S. aureus	Ampicillin (10.0 มคก./disc)	42.33 ± 14.25	7.47 ± 0.34
	สารสกัดข่าลิงชั้น		
	- hexane (50.0 มก./มล.)	21.44 ± 11.45	3.29 ± 1.11
	- ethyl acetate (50.0 มก./มล.)	23.96 ± 12.48	3.79 ± 1.05
	- methanol (50.0 มก./มล.)	16.97 ± 8.60	2.39 ± 0.93
E. coli	Ampicillin (10.0 มคก./disc)	21.74 ± 1.14	3.35 ± 0.23
	สารสกัดข่าลิงชั้น		
	- hexane (50.0 มก./มล.)	6.20 ± 0.72	0.24 ± 0.14
	- ethyl acetate (50.0 มก./มล.)	NA	NA
	- methanol (50.0 มก./มล.)	5.14 ± 0.25	0.03 ± 0.05
Ps. aeruginosa	Tetracycline(30.0 มคก./disc)	26.67 ± 1.88	4.33 ± 0.38
	สารสกัดข่าลิงชั้น		
	- hexane (50.0 มก./มล.)	6.53 ± 0.44	0.31 ± 0.09
	- ethyl acetate (50.0 มก./มล.)	7.03 ± 1.84	0.41 ± 0.37
	- methanol (50.0 มก./มล.)	5.12 ± 0.21	0.02 ± 0.04
C. albicans	Amphotericin B (125.0 มคก./disc)	16.43 ± 0.32	2.29 ± 0.06
	สารสกัดข่าลิงชั้น		
	- hexane (50.0 มก./มล.)	NA	NA
	- ethyl acetate (50.0 มก./มล.)	NA	NA
	- methanol (50.0 มก./มล.)	NA	NA
E. faecalis	Ampicillin (10.0 มคก./disc)	30.28 ± 5.85	5.06 ± 1.17
	สารสกัดข่าลิงชั้น		
	- hexane (50.0 มก./มล.)	11.52 ± 0.07	1.30 ± 0.01
	- ethyl acetate (50.0 มก./มล.)	9.87 ± 1.04	0.97 ± 0.21
	- methanol (50.0 มก./มล.)	7.27 ± 0.57	0.45 ± 0.11

หมายเหตุ: ถือว่าสารทดสอบมีฤทธิ์ต้านจุลชีพเมื่อเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone > 5 มม. หรือมี AI > 0; NA = No activity

เชื้อเรียงจากสูงไปต่ำดังนี้ *S. aureus*, *E. faecalis*, *Ps. Aeruginosa* และ *E. coli* สารสกัดข่าลิงชั้น ethyl acetate ให้ผลเช่นเดียวกันแต่ไม่มีฤทธิ์ต่อ *E. coli* ในขณะที่สารสกัดข่าลิงชั้น methanol มีฤทธิ์ต้านเชื้อในลักษณะเดียวกันแต่มีฤทธิ์อ่อนที่สุด (ตารางที่ 1)

ฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. faecalis*

ค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ E. faecalis ที่เจริญแบบอิสระโดยวิธี agar dilution assay

ในการศึกษาค่า MIC และ MBC ของสารทดสอบต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระด้วยวิธี agar dilution assay พบว่าสารสกัดข่าลิงจากชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol สามารถหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อได้ที่ความเข้มข้น 25.0, 12.5 และ 50.0 มก./มล. ตามลำดับ และใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้นเป็น 75.0, 37.5 และ 100.0 มก./มล. ตามลำดับเพื่อฆ่าเชื้อ เช่นเดียวกันกับ EDTA, chlorhexidine และ sodium hypochlorite มีค่า MIC 1.25, 0.625 และ 1.25 มก./มล. ตามลำดับ และมีค่า MBC สูงขึ้นเป็น 2.50, 0.625 และ 5.0 มก./มล. ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ E. faecalis ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม

สารสกัดข่าลิงชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม โดยความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจากสารสกัดชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol คือ > 125.0, 125.0 และ 250.0 มก./มล. ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็น > 1.67, 3.33 และ 2.5 เท่าของค่า MBC ต่อเชื้อที่เจริญแบบอิสระ โดยความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อของสารมาตรฐาน chlorhexidine และ sodium hypochlorite ต่ำกว่าที่พบในสารสกัด คือ 3.125 และ 25 มก./มล. ซึ่งคิดเป็น 5 เท่าของค่า MBC ต่อเชื้อที่เจริญแบบอิสระของ chlorhexidine และ sodium hypochlorite และ > 5 เท่าสำหรับ EDTA (ตารางที่ 3)

เวลาสัมผัสสารที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ E. faecalis ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม

สารสกัดข่าลิงชั้น ethyl acetate (125.0 มก./มล.) และ methanol (250.0 มก./มล.) มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญยึดเกาะกันเป็นกลุ่มบนเยื่อบาง แต่ต้องใช้เวลาในการสัมผัสสารถึง 4 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่ chlorhexidine (3.125 มก./มล.) และ sodium hypochlorite (25.0 มก./มล.) เริ่มออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่เวลา 2 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 2 ค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารทดสอบต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระ

สารทดสอบ	Agar dilution assay	
	MIC (มก./มล.)	**MBC** (มก./มล.)
EDTA	1.25	2.5
Chlorhexidine	0.625	0.625
Sodium hypochlorite	1.25	5.0
สารสกัดข่าลิงชั้นต่าง ๆ		
- hexane	25.0	50.0
- ethyl acetate	12.5	50.0
- methanol	50.0	100.0

ตารางที่ 3 ค่า Minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารทดสอบต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม

สารทดสอบ	**MBC for *E. faecalis* biofilm** (มก./มล.)
EDTA	> 12.5
Chlorhexidine	3.125
Sodium hypochlorite	25.0
สารสกัดข่าลิงชั้น	
- hexane	> 125
- ethyl acetate	125.0
- methanol	250.0

ตารางที่ 4 ค่า Contact time (ชั่วโมง) ของสารทดสอบต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม

สารทดสอบ	**Contact time** (ชั่วโมง)
Chlorhexidine (3.125 มก./มล.)	2
Sodium hypochlorite (25.0 มก./มล.)	4
สารสกัดข่าลิงชั้น	
- ethyl acetate (125.0 มก./มล.)	4
- methanol (250.0 มก./มล.)	6

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การใช้น้ำยาล้างคลองรากฟันหรือใส่ยาในคลองรากฟันเพื่อช่วยกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่เหลือตกค้างหลังจากขยายคลองรากฟัน มีจุดประสงค์เพื่อช่วยลดการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน และช่วยให้คลองรากแห้ง น้ำยาล้างคลองรากฟันที่ดีควรมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีและไม่เป็นพิษ หรือระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน[21] *E. faecalis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกชนิดหนึ่งที่พบว่าเป็นสาเหตุการติดเชื้อซ้ำในการรักษาคลองรากฟัน[22-24] *E. faecalis* อาศัยในคลองรากฟันทั้งแบบอิสระและแบบไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นรูปแบบการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียในสภาวะที่มีอาหารจำกัด ซึ่งการอยู่รวมกันแบบนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อมีความต้านทานต่อ

สารต้านแบคทีเรีย[25,26] ในการศึกษานี้ได้สกัดสารจากเหง้าข่าลิงด้วยวิธี percolation ซึ่งเป็นวิธีสกัดสารแบบต่อเนื่องที่ทำให้สารสำคัญไม่สลายตัวเพราะความร้อน และเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก

ข่าลิงเป็นพืชในสกุลเดียวกับข่า (*Alpinia* sp.) ซึ่งเป็นสกุลที่มีการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพจำนวนมาก แต่การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของข่าลิงยังมีไม่มากนัก มีการศึกษาของ Wannissorn และคณะในปี 2005 พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเหง้าข่าลิงโดยการกลั่นด้วยน้ำ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. typhimurium, S. enteritidis, E. coli, C. perfringens* และ *C. jejuni* เมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion assay[13] แต่ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าเฉพาะสารสกัดข่าลิงในชั้น hexane เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E.coli* อย่างอ่อน ทั้งนี้เนื่องมาจากการใช้วิธีการสกัดต่างกัน ทำให้ได้สารสำคัญที่ต่างกัน และในการศึกษานี้ไม่ได้สกัดน้ำมันหอมระเหย ซึ่งเป็นส่วนที่มีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ ทำให้ฤทธิ์ที่ได้จากการศึกษานี้อ่อนกว่า

น้ำมันหอมระเหยจากข่าลิงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญอย่างอ่อนต่อ *Ps. aeruginosa*, *Ps. cepacia* และ *S. epidermidis* รวมถึงเชื้อราในกลุ่ม dermatophyte ได้แก่ *Microsporum canis, Trichophyton mentagrophytes* และ *Trichophyton rubrum*[8] ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ ที่พบว่าสารสกัดข่าลิงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Ps. aeruginosa* อย่างอ่อน และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* แต่สารสกัดข่าลิงจากสารสกัดทุกชั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. faecalis* ผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่าในเหง้าข่าลิงมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ โดยสารสำคัญในสารสกัดจะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยทำลายเซลล์เมมเบรนของเซลล์แบคทีเรียทำให้ของเหลวไหลเข้าออกเซลล์ได้ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมี outer membrane ปกคลุมชั้นเซลล์เมมเบรนอีกทีองค์ประกอบของ outer membrane ส่วนใหญ่เป็นลิพอพอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิดที่ควบคุมการผ่านเข้าและออกของสารต่าง ๆ เป็นจุดที่ทำให้แบคทีเรียแกรมลบทนต่อการทำลายโดยสารปฏิชีวนะ สารซักฟอก โลหะหนัก สี และเอนไซม์ในทางเดินอาหาร เป็นต้น ซึ่งสารประกอบหลักที่มีในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากใบของข่าลิงคือ 1,8-cineole, β-bisabolene, β-sesquiphellandrene และ β-elemene[8] ซึ่งอาจเป็นสารที่มีผลยับยั้งแบคทีเรีย

สารสกัดข่าลิงทั้งสามส่วนมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระเมื่อทดสอบด้วย disc diffusion assay ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดข่าลิงชั้น hexane มีฤทธิ์แรงกว่า ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ การหาค่า MIC และ MBC ของสารทดสอบต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบอิสระด้วยวิธี agar dilution assay พบว่าสารสกัดข่าลิงชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol มีค่า MIC เท่ากับ 25.0, 12.5 และ 50.0 มก./มล. ตามลำดับ และค่า MBC เท่ากับ 50.0, 50.0 และ 100.0 มก./มล. ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าในการทดลองนี้ สารสกัดข่าลิงจากชั้น ethyl acetate มีฤทธิ์แรงกว่าที่พบในชั้น hexane และ methanol ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษาส่วนนี้ ต่างจากผลที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธี agar disc diffusion ทั้งนี้อาจเนื่องจากความสามารถในการละลายของสารสำคัญในสารสกัดชั้น hexane ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีขั้ว สารสำคัญอาจตกตะกอนเมื่ออยู่ในอาหารเหลว ทำให้ค่า MIC และ MBC ที่ได้สูงกว่าความเป็นจริง แสดงว่าสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพในเหง้าข่าลิงเป็นสารพวกที่มีขั้วเล็กน้อยจนถึงไม่มีขั้ว ส่วนสารที่ใช้ในทางทันตกรรม ซึ่งได้แก่ EDTA, chlorhexidine และ sodium hypochlorite นั้น ผลการศึกษาในครั้งนี้พบค่า MIC เท่ากับ 1.25, 0.625 และ 1.25 มก./มล. ตามลำดับ และค่า MBC เท่ากับ 2.50, 0.625 และ 5.0 มก./มล. ตามลำดับ จะเห็นว่าค่า MBC ของสารดังกล่าวต่ำกว่าความเข้มข้นที่ใช้ในคลินิก แต่สาเหตุที่ยังพบการติดเชื้อหลังการรักษาคลองรากฟันอาจเนื่องมาจากระยะเวลาในการสัมผัสยาของเชื้อยังไม่นานเพียงพอ[27]

การติดเชื้อซ้ำในการรักษาคลองรากฟันที่พบจากการใช้สารเหล่านี้ในการสวนล้างคลองรากฟัน อาจเนื่องจากระยะเวลาในการสัมผัสสารไม่นานพอ หรือเป็นเชื้อ *E. faecalis* สายพันธุ์ดื้อยา หรือการที่เชื้อ *E. faecalis* มีการเจริญแบบไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นลักษณะการเติบโตของ *E. faecalis* ที่พบบ่อย ไบโอฟิล์มทำให้ความสามารถซึมผ่านของยาเข้าไปในเชื้อลดลง และอัตราเมแทบอลิซึมและการเติบโตของเชื้อในไบโอฟิล์มจะต่ำกว่าปกติ เนื่องจากอาหารจำกัด ซึ่งทำให้การออกฤทธิ์ของยาลดลงด้วย[28] การที่ยาไม่สามารถฆ่าเชื้อที่อยู่ชั้นในของไบโอฟิล์มเป็นสาเหตุให้เชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์มทนต่อยาต้านจุลชีพได้ 100 - 1000 เท่า[29] หรือเพิ่มการดื้อต่อยารักษาอาการในช่องปากมากขึ้น[7] สารสกัดข่าลิงชั้น ethyl acetate และ methanol มีค่า MBC ต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์มดังนี้ 125.0 และ 250 มก./มล. ซึ่งคิดเป็น 2.5 เท่าของค่า MBC ของเชื้อที่เจริญแบบอิสระ ส่วนสารสกัดข่าลิงชั้น hexane ที่ความเข้มข้น 125.0 มก./มล. ยังไม่สามารถฆ่าเชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์มได้ เนื่องจากข้อจำกัดในการละลายเช่นเดียวกันกับสารมาตรฐาน chlorhexidine และ sodium hypochlorite ทั้งนี้ ความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อของสารทั้งสอง คือ 3.125 และ 25 มก./มล. ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็น 5 เท่าของค่า MBC ต่อเชื้อที่เจริญแบบอิสระ อธิบายได้ว่าการที่เชื้อเจริญแบบไบโอฟิล์มนั้นเป็นกลไกหนึ่ง ที่เชื้อในธรรมชาติมักใช้ปรับตัวเพื่อการอยู่รอดในสภาวะที่มีอาหารจำกัด หรือเพื่อทนต่อการป้องกันตนเองทางภูมิคุ้มกันของโฮสท์[30]

การสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียต้องอาศัยยีนควบคุมการสร้าง ซึ่งยีนนั้นเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนปกติในสภาวะดังกล่าวข้างต้น ทั้งนี้ แบคทีเรียที่รวมกลุ่มเกาะกันเป็นแบบไบโอฟิล์มหากมีจำนวนมากกว่า 1,000 ตัว จะทำให้เชื้อสามารถดื้อทั้ง

ต่อการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม แอนติบอดี้ และยาปฏิชีวนะ ซึ่งกลไกการดื้อนี้ สัมพันธ์กับการเข้าจับของสารต้านจุลชีพกับโครงข่ายที่เป็นสารจำพวกโพลีแซคคาไรด์ที่ล้อมรอบกลุ่มของแบคทีเรียที่เกิดได้ช้าลง นอกจากนี้ ยังมีการปรับเปลี่ยนของสารอาหารที่อยู่รอบ ๆ เช่น ความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของเกลือ (salinity) และความเข้มข้นของสารออสโมล์ (osmorality) ซึ่งทำให้มีผลต่อการเกาะติดของเชื้อ การเข้าถึงเชื้อของยา เป็นต้น[31] ทำให้ทนต่อสารต้านจุลชีพ และปริมาณสารอาหารที่จำกัดทำให้ลดกระบวนการเมแทบอลิซึมและลดอัตราการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ยาต้านจุลชีพออกฤทธิ์ได้น้อยลง

นอกจากนี้แล้ว แบคทีเรียส่วนที่อยู่ชั้นในของไบโอฟิล์มสามารถสร้างสปอร์ และมีชั้นป้องกันอย่างแข็งแรง ดังนั้นชั้นนอกของไบโอฟิล์มจึงเป็นชั้นที่ป้องกันส่วนที่อยู่ภายในไม่ให้ถูกทำลาย ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการดื้อยา[7,32] ดังนั้น ค่า MBC ของเชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์มจึงสูงกว่าเชื้อที่เจริญแบบอิสระ สารสกัดข่าลิงชั้น ethyl acetate (125.0 มก./มล.) และชั้น methanol (250.0 มก./มล.) มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม แต่ต้องใช้เวลาในการสัมผัสสารนาน 4 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่ chlorhexidine (3.125 มก./มล.) และ sodium hypochlorite (25.0 มก./มล.) มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่เวลา 2 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะการที่ยาต้านจุลชีพจะออกฤทธิ์ได้ต้องใช้เวลามากขึ้นในการแทรกซึมเข้าสู่ชั้นในไบโอฟิล์ม เพื่อทำลายเชื้อที่อยู่ในใจกลางไบโอฟิลม์ ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Abdullah และคณะที่ศึกษาระยะเวลาในการสัมผัสกับน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในคลินิกทันตกรรม คือ chlorhexidine 0.2%, EDTA 17% และ sodium hypochlorite 3% ของเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม เทียบกับเชื้อที่เจริญแบบอิสระโดยให้เวลาสัมผัสสารนานสูงสุด 60 นาที ผลการศึกษาพบว่า chlorhexidine 0.2% และ sodium hypochlorite 3% สามารถฆ่าเชื้อที่เจริญแบบอิสระได้ที่เวลา 15 และ 1 นาที ตามลำดับ chlorhexidine 0.2% และ sodium hypochlorite 3% สามารถลดจำนวนโคโลนีลงอย่างมีนัยสำคัญตามเวลาสัมผัสสารที่เพิ่มขึ้น แต่พบว่าเฉพาะ sodium hypochlorite 3% เท่านั้นที่สามารถฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์มได้เมื่อเวลาสัมผัสสารเท่ากับ 2 นาที[20] โดยการศึกษาของ Abdullah และคณะนั้นแตกต่างจากการศึกษาของ Gomes และคณะ[22] ที่พบว่า chlorhexidine 0.2% และ sodium hypochlorite 4% สามารถฆ่าเชื้อได้เมื่อเวลาสัมผัสสารเท่ากับ 30 วินาที และ 5 นาที ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของ Abdullah และคณะ และ Gomes และคณะกับการศึกษานี้ ก็พบความแตกต่างเช่นกัน โดย chlorhexidine (3.125 มก./มล.) และ sodium hypochlorite (25.0 มก./มล.) มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่เวลา 2 และ 4 ชั่วโมงตามลำดับ เห็นได้ว่าเวลาในการสัมผัสสารแล้วมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์มที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ นานกว่าผลจากการศึกษาทั้งสองดังกล่าวข้างต้น เนื่องจากมีความแตกต่างในหลายด้าน เช่น จำนวนเชื้อเริ่มต้น การเตรียมเชื้อแบบไบโอฟิล์ม ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ขั้นตอนและวิธีการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ และที่สำคัญคือ ในการเตรียมสารทดสอบต่าง ๆ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ TSB เป็นตัวทำละลาย ซึ่งทำให้เชื้อมีแหล่งอาหาร และความหนืดของสารละลายมีผลต่อการแทรกซึมหรือการออกฤทธิ์ของสารทดสอบด้วย ซึ่งต่างจากการทดลองของ Abdullah และคณะ[20] ที่ใช้สารละลายฟอสเฟตเป็นตัวทำละลาย ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรเลือกตัวทำละลายที่สามารถละลายสารได้ดีที่สุดเพื่อลดปัญหาจากปัจจัยดังกล่าว และเนื่องจากสารสกัดข่าลิงที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นสารสกัดหยาบ จึงทำให้ต้องใช้สารในปริมาณสูง ดังนั้นควรแยกสกัดสารสกัดให้ได้ส่วนสกัดที่บริสุทธิ์มากขึ้นในการศึกษาครั้งต่อไป และจากผลการศึกษานี้ยังไม่สามารถที่จะนำสารสกัดจากเหง้าข่าลิงไปใช้ในทางคลินิกได้เนื่องจากยังขาดข้อมูลการศึกษาทางด้านความปลอดภัย สารสำคัญออกฤทธิ์และการทำให้บริสุทธิ์ แต่เป็นข้อมูลพื้นฐานในการสนับสนุนการใช้สมุนไพรและการศึกษาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่สำหรับการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

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

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

3 Bystrom A, Happonen RP, Sjogren U, Sundqvist C. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Endod Dent Traumatol* 1987;3:58–63.

4 Sundqvist G, Fidgor D, Sjogren U. Microbiology analyses of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery Oral Med Oral Pathol* 1998;85:86-93.

5 Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod* 2002;28:304-310.

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

7 Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus* faecalis Biofilms. *J Endod* 2006;32:527-531.

8 Ibrahim H, Aziz AN, Syamsir DR, Mohamad Ali NA, Mohtar M, Mat Ali R. Essential oils of *Alpinia conchigera Griff.* and their *antimicrobial activities. Food Chemistry* 2009;113:575–577.

9 Rao K, Ch B, Narasu LM, Giri A. Antimicrobial activity of *Alpinia galangal* (L) wild crude extracts. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;162: 871-884.

10 นันทวัน บุณยะประภัศร, อรนุช โชคชัยเจริญพร. สมุนไพรพื้นบ้าน (1). พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์ประชาชนจำกัด, 2539.

11 Chomnawang MT, Trinapakul C, Gritsanapan W. *In ivtro* antigonococcal activity of *Coscinium fenestratum* stem extract. *J Ethnopharmacol* 2009;122:445-449.

12 Athamaprasangsa S, Bungtrarongroj U, Dampawan P, et al. A 1,7-diraylheptanoid from *Alpinia conchigera*. *Phytochemistry* 1994;7(3): 871–873.

13 Wannissorn B, Jarikasem S, Siriwangchai T, Thubthimthed S. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants, *Fitoterapia* 2005;76:233–236.

14 Newberry BM, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M. The Antimicrobial effect of biopure MTAD on eight strains of eight stains of *Enterococcus faecalis*: an in vitro investigation. *J Endod* 2007;33(11):1352-1354.

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

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

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

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

19 Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 2007;33(7):852-855.

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

21 สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์, ณัฐยา ลีลาอภิรดี, พรพิศ เหลาพรม, ปัญญา เขมันการ. ผลของสารสกัดจากใบข่อยต่อเชื้อแบคทีเรียในคลองรากฟัน. *วิทยาสารทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น* 2543;3(1):41-46.

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

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

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

25 แสงอุษา เขมาลีลากุล. เอกสารประกอบการบรรยายเรื่อง รู้เรื่องสารพันเชื้อเพื่อรักษารอยโรคและการใช้ยาปฏิชีวนะกับการรักษาคลองรากฟัน. การประชุมวิชาการ. 2550.

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

27 จริยา ชมวารินทร์, ประภาส พาณสวัสดิ์, อัญชลี ตัตตะวะศาสตร์. การศึกษาชนิดของเชื้อแบคทีเรียจากคลองรากฟันก่อนและหลังการรักษาและการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาล้างคลองรากฟัน. *วารสารโรงพยาบาลศรีนครินทร์* 2534;6(4):231-42.

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

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

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

31 Nikolaev YA, Plakunov VK. Review in biofilm-"city of microbes" or an analogue of multicellular organisms?. *Microbiol* 2007;76(2):125–138.

32 Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilm. *Lancet* 2001;69(9):135-138.

Original Article

Antimicrobial Activity of *Alpinia conchigera* Extract on *Enterococcus faecalis* Biofilm

Suparat Chanluang*, Sayomphol Arlai, Wate Srilakorn and Noppawat Pengkumsri

Faculty of Pharmaceutical Science, Ubonratchathani University

* Corresponding author: suparatkha@hotmail.com

ABSTRACT

Objective: To preliminarily study antimicrobial activity of Kha-ling (*Alpinia conchigera*) extract in hexane, ethyl acetate, and methanol against the representative gram positive, gram negative and anaerobe bacteria, fungus and *Enterococcus faecalis* as well as to evaluate its activity on *E. faecalis* growing in a form of either planktonic or biofilm including optimal time for its antimicrobial activity. **Methods:** Rhizomes of Kha-ling were extracted by percolation with hexane, ethyl acetate, and methanol, respectively. The antimicrobial effect of various extracts was first investigated using agar disc diffusion assay. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by agar dilution method. The MBC and contact time of various extracts on *E. faecalis* biofilm were also investigated. **Results:** All extracts inhibited *S. aureus* of which hexane extract has the highest activity. They had weak effects on *E. coli* and *P. aeruginosa*, and no activity on *C. albicans*. All hexane, ethyl acetate, and methanol extracts inhibited *E. faecalis* that grew in a planktonic form with inhibition zones of 11.52 ± 0.07, 9.87 ± 1.04 และ 7.27 ± 2.57 mm, respectively. MICs were 25.0, 12.5 และ 50.0 mg/mL for hexane, ethyl acetate, and methanol extracts, respectively. MBC of hexane, ethyl acetate, and methanol extracts were 50.0, 50.0, and 100.0 mg/mL, which were increased to >125.0, 125.0, and 250.0 mg/mL, respectively in *E. faecalis* biofilms. In addition, ethyl acetate (125.0 mg/mL) and methanol (250.0 mg/mL) extracts showed bactericidal effects when incubated with *E. faecalis* biofilms for 4 and 6 hours, respectively. **Conclusion:** Kha-ling extracts showed bactericidal activity against *E. faecalis* growing in planktonic form as well as biofilm form with higher concentration required.

Keywords: antimicrobial activity, *Alpinia conchogera* Griff., biofilm, *Enterococcus faecalis*

Thai Pharm Health Sci J 2010;5(4):279-286§