

Effectiveness of Root Canal Irrigants from Mangosteen Pericarp Extracts with Papain and Propolis with Papain on Mixture of *Streptococcus Gordonii* and *Enterococcus Faecalis*

Anurak Phankhongsap¹, Pattama Chailertvanitkul², Apa Juntavee³, Jomjai Peerapattana⁴ and Subin Puasiri⁵

¹Dental hospital, Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Amphur Muaeng, Khon Kaen, Thailand

²Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Amphur Muaeng, Khon Kaen Thailand

³Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Amphur Muaeng, Khon Kaen Thailand

⁴Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Khon Kaen University, Amphur Muaeng, Khon Kaen Thailand

⁵Department of Community Dentistry, Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Amphur Muaeng, Khon Kaen Thailand

Correspondence to:

Pattama Chailertvanitkul Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Amphur Muaeng, Khon Kaen 40002 Thailand Tel: 043-202405 ext. 11143-4 Fax: 043-202862 E-mail: patchai@kku.ac.th

Abstract

The purpose of this study was to evaluate effectiveness of root canal irrigants from mangosteen pericarp extracts with papain, propolis extracts with papain compared with 2.5 % sodium hypochlorite on mixture of *Streptococcus gordonii* and *Enterococcus faecalis* in root canals. One hundred and eight extract human single-rooted teeth were sectioned to obtain the root of 12 mm long. The sectioned roots were sterilized by autoclaved then infected with mixture of *S. gordonii* and *E. faecalis*, incubated at 37 °C for 2 weeks. Two teeth were evaluated by bacterial penetration using scanning electron microscope. Canals were instrumented using stepback technique until master apical file was size 35, irrigated with 1 ml of the tested irrigant after each instrumentation. The specimens were randomly distributed into 3 groups according to the irrigation type: Group I: teeth were irrigated with mangosteen pericarp extracts with papain (N = 30), Group II: teeth were irrigated with propolis extracts with papain (N = 30), Group III: teeth were irrigated with 2.5 % sodium hypochlorite (N = 30). Control groups were divided into 5 teeth irrigated with 50 % dimethyl sulfoxide (DMSO), 5 teeth with mixture of 50 % DMSO and papain, 5 teeth with normal saline and 1 neither infected nor irrigated tooth. Specimens were kept in 100 % humidity at 37 °C for 24 hours. The dentine chips from sterilized gates gridded drill were culture for 24 hours to determine the remaining colony forming units. The results demonstrated that one tooth in the mangosteen pericarp extracts with papain had

remaining bacteria, no tooth from propolis extracts with papain and 2.5 % sodium hypochlorite showed no bacterial growth. Chi-square test indicated no statistically significant difference ($p = 0.564$) in eradicating mixture of *S. gordonii* and *E. faecalis* among root canal irrigants from mangosteen pericarp extracts with papain, propolis extracts with papain and 2.5 % sodium hypochlorite. In conclusion there was no difference in irradiating bacteria among three irrigants.

Key words: *Enterococcus faecalis*; Mangosteen pericarp extracts; Propolis extracts; Sodium hypochlorite; *Streptococcus gordonii*

Received Date: Oct 31, 2013 , Accepted Date: Aug 19, 2014

ประสิทธิผลของน้ำยาล้างคลองรากฟันจากสารสกัดเปลือกมังคุดกับปาเปน และจากสารสกัดพรอพอลิสกับปาเปน ต่อเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดไน ผสมกับเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส

อนุรักษ์ พันธุ์คงทรัพย์¹, ปัทมา ชัยเลิศวิชกุล², อาภา จันทรเทวี³, จอมใจ พืชรพัฒนา⁴ และสุบิน พัวศิริ⁵

¹โรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

²ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

³ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

⁴ภาควิชาเทคโนโลยีสารสนเทศ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

⁵ภาควิชาทันตกรรมชุมชน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

ติดต่อเกี่ยวกับบทความ

ปัทมา ชัยเลิศวิชกุล ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002 โทรศัพท์: 043-202405

ต่อ 11143-4 โทรศัพท์: 043-202862 E-mail: patchai@kku.ac.th

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิผลของน้ำยาล้างคลองรากฟันจากสารสกัดเปลือกมังคุดกับปาเปน และจากสารสกัดพรอพอลิสกับปาเปน เปรียบเทียบกับโซเดียม ไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ในการกำจัดเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดไน ผสมกับเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส ในคลองรากฟัน โดยศึกษาในฟันแท้นุษย์รากเดียว 108 ซี่ ตัดส่วนตัวฟันออกให้ได้รากยาว 12 มิลลิเมตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการอบไอน้ำ ความดันสูง แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดไน ผสมกับเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส เป็นเวลา 14 วัน ประเมินการติดเชื้อในท่อเนื้อฟันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดจำนวน 2 ซี่ หลังจากนั้นขยายคลองรากฟันด้วยวิธีสเต็ปแบ็กให้ได้มาสเตอร์เอพิคอลไฟล์ขนาด 35 ล้างด้วยน้ำยาล้างคลองรากฟัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตรทุกครั้งที่เปลี่ยนตะไบ โดยแบ่งน้ำยาล้างเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1: ฟันที่ล้างด้วยน้ำยาล้างคลองรากฟันจากสารสกัดเปลือกมังคุดกับปาเปน (30 ซี่) กลุ่มที่ 2: ฟันที่ล้างด้วยน้ำยาล้างคลองรากฟันจากสารสกัดพรอพอลิสกับปาเปน (30 ซี่) กลุ่มที่ 3: ฟันที่ล้างด้วยน้ำยาล้างคลองรากฟันโซเดียม ไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 (30 ซี่) กลุ่มควบคุมคือ ไดมิล ซัลฟอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 50 (5 ซี่) ไดมิล ซัลฟอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 50 กับปาเปน (5 ซี่) น้ำเกลือ (5 ซี่) และฟันที่ไม่ใส่เชื้อ และไม่ได้ล้างด้วยน้ำยาล้างคลองรากฟัน (1 ซี่) เก็บฟันในตู้อบนาน 24 ชั่วโมง นำผองเนื้อฟันที่ได้จากการกรอพร้อมหัวกรอเกทกริดเดิลดริลล์ ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพาะเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น ผลการศึกษาพบว่า กลุ่มที่ล้างคลองรากฟันด้วยสารสกัดเปลือกมังคุดกับปาเปนมีฟัน 1 ซี่ที่มีแบคทีเรียหลงเหลืออยู่ กลุ่มที่ล้างคลองรากฟันด้วยสารสกัดพรอพอลิสกับปาเปน ไม่มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเช่นเดียวกับกลุ่มที่ล้างคลองรากฟันด้วยโซเดียม ไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีแบคทีเรียหลงเหลืออยู่ทุกซี่ เมื่อทดสอบด้วยสถิติไคสแควร์พบว่า ไม่แตก-

ต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.564$) ในการกำจัดเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดไน ผสมกับเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิสในคลองรากฟัน ระหว่างกลุ่มที่ล้างคลองรากฟันจากสารสกัดเปลือกมังคุดกับปาเปน จากสารสกัดพอร์พอลิสกับปาเปน และจากโซเดียม ไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยสรุป น้ำยาล้างคลองรากฟันทั้ง 3 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันในการกำจัดเชื้อโรคในคลองรากฟัน

คำสำคัญ: เอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส; สารสกัดเปลือกมังคุด; สารสกัดพอร์พอลิส; โซเดียม ไฮโปคลอไรต์; สเตรปโตค็อกคัส กอร์โดไน

บทนำ

แบคทีเรียเป็นสาเหตุสำคัญ ทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อใน และเนื้อเยื่อรอบรากฟัน การติดเชื้อในคลองรากฟันเป็นระยะเวลานานทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตตลอดทั่วระบบคลองรากฟัน ซึ่งแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่ในคลองรากฟันจะเป็นกลุ่มที่ไม่ใช้ก๊าซออกซิเจนในการดำรงชีวิต เชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดไน (*Streptococcus gordonii*) และเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส (*Enterococcus faecalis*) พบได้ทั้งในคลองรากฟันน้ำนม และคลองรากฟันแท้¹ โดยเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิสมักพบในการรักษาคอนกรูเมนต์ที่ล้มเหลว ซึ่งพบได้ร้อยละ 29 การทดลองในฟันลิงพบว่า เชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิสสามารถทำให้เกิดรอยโรครอบรากฟันได้² ส่วนเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดไน มีบทบาทสำคัญเนื่องจากเป็นแบคทีเรียตั้งต้นในการสร้างไบโอฟิล์มสำหรับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในการยึดเกาะหลายการศึกษาพบว่า การอักเสบที่คงอยู่ (persistent infection) ในคลองรากฟันมักพบสปีชีส์ สเตรปโตค็อกคัส โดยพบสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดไนมากที่สุด³ และสปีชีส์เอ็นเทอโรค็อกคัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส⁴ การศึกษาของ Sedgley และคณะ⁵ พบว่า แบคทีเรียทั้งสองชนิดอยู่ร่วมกันโดยแลกเปลี่ยนยีนกัน อาจส่งผลให้ปรับตัวเพิ่มความอยู่รอดจากน้ำยาล้างและยาฆ่าเชื้อที่ใส่ในคลองรากฟัน

การทำความสะอาด และตกแต่งคลองรากฟัน เป็นกระบวนการสำคัญในการรักษาคอนกรูเมนต์ มีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดแบคทีเรีย และตกแต่งรูปร่างของคลองรากฟันให้พร้อมสำหรับการอุดคลองรากฟัน โดยมีขั้นตอนคือ การขยายคลองรากฟัน การล้างคลองรากฟัน และการใส่ยาฆ่าเชื้อโรคในคลองรากฟัน น้ำยาล้างคลองรากฟันมีหลายชนิดที่นิยมใช้คือ โซเดียม ไฮโปคลอไรต์ เพราะมีคุณสมบัติฆ่าจุลชีพ ละลายเนื้อเยื่อ และช่วยหล่อลื่นเครื่องมือ แต่มีข้อด้อยคือ กลิ่นฉุน ไม่คงตัว ยิ่งความเข้มข้นมากขึ้น ความคงตัวยิ่งน้อยลง มีความสามารถกำจัดเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิสได้น้อย⁶ และถ้าน้ำยาเกินออกนอกปลายรากฟัน จะระคาย-

เคืองต่อเนื้อเยื่ออ่อนบริเวณปลายรากฟัน ได้มีการปรับปรุงและพัฒนา น้ำยาล้างคลองรากฟัน ที่ไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อ แต่ยังคงคุณสมบัติด้านแบคทีเรีย และด้านอื่น ๆ ของน้ำยาล้างคลองรากฟันไว้ สารสกัดจากวัสดุธรรมชาติหลายชนิดได้ถูกนำมาใช้ในทางทันตกรรม เช่น สารสกัดจากเปลือกมังคุด และจากพอร์พอลิส มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย Torrungruang และคณะ⁷ ศึกษาพบว่า สารสกัดจากเปลือกมังคุดมีประสิทธิภาพต้านเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) โดยความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ยับยั้งเชื้อ และความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ฆ่าเชื้อคือ 0.625 และ 1.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีฤทธิ์มากกว่าคลอร์เฮกซิดีนในการกำจัดเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ การศึกษาในปี ค.ศ. 2012 ของ Samaksamarn และคณะ⁸ พบว่า สารสกัดพอร์พอลิส สามารถยับยั้งเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดไน และเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส โดยมีขอบเขตยับยั้งเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดไน และเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส เท่ากับ 11.80 ± 0.42 มิลลิเมตร และ 10.69 ± 0.61 มิลลิเมตร ตามลำดับ ปาเปนที่สกัดได้จากมะละกอ เป็นเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzyme) มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ และละลายเนื้อเยื่อที่เน่าตาย การศึกษาของ Couto De Oliveira และคณะ⁹ แสดงให้เห็นว่า เมื่อผสมปาเปนกับคลอร์เฮกซิดีน จะช่วยเพิ่มการละลายของเนื้อเยื่อในที่เน่าตายได้ถึงร้อยละ 55 ในขณะที่น้ำยาล้างคลองรากฟันคลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ละลายเนื้อเยื่อในได้เพียงร้อยละ 3 เท่านั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงผสมปาเปนในน้ำยาล้างคลองรากฟัน เนื่องจากการผลการย่อยสลายเนื้อเยื่อของปาเปน ร่วมกับผลการฆ่าเชื้อของสารสกัดทั้งสองชนิด

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อของน้ำยาล้างคลองรากฟันจากสารสกัดเปลือกมังคุดกับปาเปน และจากสารสกัดพอร์พอลิสกับปาเปน เปรียบเทียบกับน้ำยาล้างคลองรากฟันโซเดียม ไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ในคลองรากฟันที่ติดเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดไน ผสมกับเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมสารสกัด

เตรียมน้ำยาล้างคลองรากฟันจากสารสกัดเปลือกมังคุดกับปาเปน โดยใช้ผงสารสกัดเปลือกมังคุด 100 มิลลิกรัม จากแคปซูล แอลฟาแมงโกสติน บริษัท คลับเนเจอร์ ประเทศสหรัฐอเมริกา ใช้ไคเมธิล ซัลโฟนิกไซด์ (บริษัท แอมเรสโก้ ประเทศสหรัฐอเมริกา) ความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นตัวทำละลาย ผสมกับปาเปนสำเร็จรูป (บริษัท โลท์ เอ็กเทนชัน ประเทศสหรัฐอเมริกา) 150 มิลลิกรัม กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman™ No. 1 บรรจุในภาชนะขวดแก้วผกฉา ปิดดัดเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เตรียมน้ำยาล้างคลองรากฟันจากสารสกัดพรอพอลิสกับปาเปน โดยใช้สารสกัดพรอพอลิส 100 มิลลิกรัม (บริษัท เวลชี-เฮลท์ ประเทศออสเตรเลีย) ใช้ไคเมธิล ซัลโฟนิกไซด์ (บริษัท แอมเรสโก้ ประเทศสหรัฐอเมริกา) ความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นตัวทำละลาย ผสมกับปาเปนสำเร็จรูป (บริษัท โลท์ เอ็กเทนชัน ประเทศสหรัฐอเมริกา) 150 มิลลิกรัม กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman™ No. 1 บรรจุในภาชนะขวดแก้วผกฉา ปิดดัดเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา คือ สเตรปโตค็อกคัส กอร์โดโน (DMST 20560) และเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส (DMST 4736) เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ไมทิส ซาลิวาเรียส (Mitis salivarius agar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 (CO₂ incubator, Delta laboratory, France) ถ่ายเชื้อทุกสัปดาห์เพื่อให้ได้เชื้อที่ใหม่อยู่เสมอ แยกเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 10 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อแต่ละชนิดที่ได้มาเลี้ยงอีกครั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์ เป็นเวลา 8 - 12 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ให้เท่ากับ 0.1 ด้วยเครื่อง UV Visible Recording Spectrophotometer (DU 730, USA) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพน้ำยาล้างคลองรากฟันจากสารสกัดเปลือกมังคุดกับปาเปน และจากสารสกัดพรอพอลิสกับปาเปน ต่อการทำลายเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดโน ผสมกับเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส ในคลองรากฟัน

ฟันแทมมนุษย์จำนวน 108 ซี่ โดยเกณฑ์คัดฟันเข้าคือ ฟันหน้า หรือฟันกรามน้อยที่มีคลองรากเดียว รูปร่างตรง ปลายรากปิด ขนากรูเปิดปลายรากฟันไม่เกินตะไบขนาด 15 ไม่มีรอยร้าวบริเวณรากฟัน จากการตรวจด้วยตาเปล่า ตัดส่วนตัวฟันด้วยเลื่อยหมุนเพชรที่ความเร็วประมาณ 300 รอบ/นาที มีน้ำเป็นตัวระบายความร้อน ให้ได้ส่วนของรากฟันยาว 12 มิลลิเมตร ใช้กระดาษฟอยล์ห่อบริเวณปลายรากฟัน ฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำฟันใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์ เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อซึมเข้าไปในท่อเนื้อฟัน

เลี้ยงเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดโน และเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส ในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์ ในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นให้ค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.1 ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดโน กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส ในปริมาตรเท่ากันลงในหลอดทดลอง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทั้งสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดโน และเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส ใส่ในฟันที่อยู่ในหลอดทดลอง จำนวน 107 หลอด โดยมี 1 หลอดไม่ใส่เชื้อเพื่อเป็นกลุ่มควบคุมสิ่งแวดล้อม เก็บในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 2 วัน โดยดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าออกครึ่งหนึ่ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ตรวจสอบการปนเปื้อนโดยสูบน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อจากหลอดทดลอง 2 หลอด มาเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะโคโลนีของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดโน ผสมกับเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส ซึ่งมีลักษณะเป็นรูปกลมเรียบ อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ อยู่เป็นคู่หรืออยู่เป็นสายสั้น ๆ เมื่อย้อมสีแกรมจะติดสีม่วง เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อนำเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดโน ผสมกับเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส เพาะเลี้ยงบนอาหารไบล์เอสคูลินอะการ์ (Bile Esculin agar) ผิวอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีดำ และหลอดที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.5 จะขุ่น ฟันซี่ได้มีการปนเปื้อนจะคัดออก และทำซ้ำให้ครบจำนวนเท่าเดิม สุ่มฟันที่เพาะเชื้อแล้ว 2 ซี่ แขนสารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินเป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อ แบ่งฟันตามแนวยาวผ่านกึ่งกลางรากฟัน ตรวจสอบการติดเชื้อในท่อเนื้อฟันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดกำลังขยาย 1,500 เท่า แบ่งฟันที่เหลือด้วยวิธีสุ่มเป็นกลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม ๆ ละ 30 ซี่ กลุ่มควบคุม 16 ซี่

กลุ่มที่ 1 ล้างคลองรากฟันด้วยน้ำยาจากสารสกัดเปลือกมังคุดกับปาเปน โดยใช้ตะไบชนิดเลขขนาด 15 แทงให้ผลปลายรากแล้วลดความยาวลง 1 มิลลิเมตร เป็นความยาวทำงาน ขยายคลองรากฟันด้วยวิธีสตีปแบ็กให้ได้มาสเตอร์เอพิคอลไฟล์ขนาด

35 ขยายคลองรากฟันส่วนบนโดยลดความยาว 1 มิลลิเมตร ทุกครั้งที่เพิ่มขนาดของตะไบจนถึงตะไบขนาด 60 และ recapitulation ด้วยมาสเตอร์เอพิคอลไฟล์ ล้างด้วยน้ำยาล้างคลองรากฟันจากสารสกัดเปลือกมังคุดกับปาเปน ปริมาตร 1 มิลลิเมตร ทุกครั้งที่เปลี่ยนตะไบ โดยใช้เข็มล้างเก็บ 25 ใส่ลงไปคลองรากฟันให้ลึกที่สุด แต่ไม่ติดแน่นในคลองรากฟัน เติมน้ำยาฆ่า ๆ ตะไบแต่ละตัวใช้ขยายคลองรากฟัน 10 คลองรากฟัน

กลุ่มที่ 2 ขยายคลองรากฟันเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 แต่ล้างคลองรากฟันด้วยน้ำยาล้างคลองรากฟันจากสารสกัดพรอพอลิสกับปาเปน

กลุ่มที่ 3 ขยายคลองรากฟันเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 แต่ล้างคลองรากฟันด้วยโซเดียม ไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5

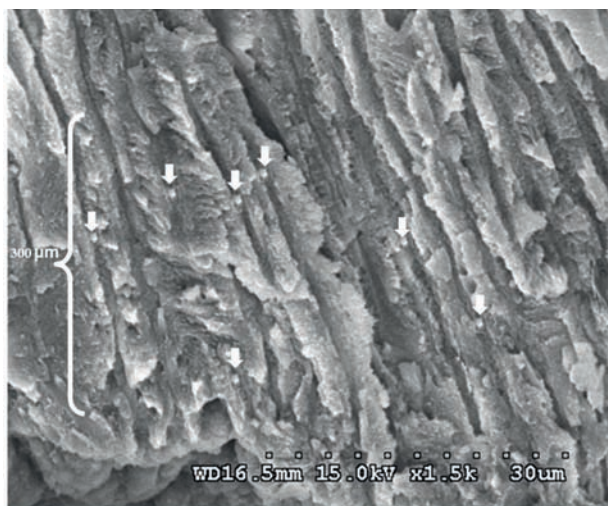
กลุ่มควบคุม ฟัน 1 ซึ่งไม่ใส่เชื้อ และไม่ขยายคลองรากฟัน ส่วนอีก 15 ซึ่งขยายคลองรากฟัน เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 โดยฟัน 5 ซึ่งล้างคลองรากฟันด้วยน้ำเกลือ ฟัน 5 ซึ่งล้างคลองรากฟันด้วยไดเมธิล ซัลฟอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 50 ฟัน 5 ซึ่งล้างคลองรากฟันด้วยไดเมธิล ซัลฟอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 50 ผสมกับปาเปน

ปิดส่วนของรากฟันด้วยกระดาษฟอยล์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำเข้าตูบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้หัวกรอเกทกริดเดิลดริลล์ (Gates gridded drill) เบอร์ 1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วกรอเนื้อฟันที่มีความลึก 10 มิลลิเมตรโดยควบคุมความลึกของหัวกรอด้วยแผ่นยาง (rubber stop) ตัดหัวกรอที่มีผงเนื้อฟันเต็มหัวกรอที่มีความยาว 10 มิลลิเมตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเทรียนท์ นำเข้าเครื่องปั่นเป็นเวลา 1 นาที เพาะเชื้อ

บนอาหารเลี้ยงเชื้อไมทิส ซาลิวาเรียช ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น ระหว่างกลุ่มที่ล้างคลองรากฟันด้วยน้ำยาชนิดต่าง ๆ โดยสถิติไคสแควร์ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผล

ประเมินการติดเชื้อในท่อเนื้อฟันโดยนำฟันไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 1,500 เท่าพบว่า แบคทีเรียสามารถเข้าไปในท่อเนื้อฟันได้ลึก 200 - 300 ไมโครเมตร (รูปที่ 1) การทดสอบประสิทธิภาพน้ำยาล้างคลองรากฟันจากสารสกัดเปลือกมังคุดกับปาเปน และจากสารสกัดพรอพอลิสกับปาเปน ต่อการทำลายเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดไน ผสมกับเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส ในคลองรากฟันพบว่า กลุ่มที่ล้างคลองรากฟันด้วยสารสกัดเปลือกมังคุดกับปาเปนมีฟัน 1 ซึ่งที่ยังคงมีเชื้อแบคทีเรียอยู่ กลุ่มที่ล้างคลองรากฟันด้วยสารสกัดพรอพอลิสกับปาเปน ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เช่นเดียวกับกลุ่มที่ล้างคลองรากฟันด้วยโซเดียม ไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีแบคทีเรียหลงเหลืออยู่ทุกซี่ (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบโดยสถิติไคสแควร์พบว่า ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.564$) ในการกำจัดเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดไน ผสมกับเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส ในคลองรากฟัน ระหว่างกลุ่มที่ล้างคลองรากฟันด้วยสารสกัดเปลือกมังคุดกับปาเปน จากสารสกัดพรอพอลิสกับปาเปน และจากโซเดียม ไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5



รูปที่ 1 การติดเชื้อในท่อเนื้อฟันที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกำลังขยาย 1,500 เท่า
 ลูกศรแสดงแบคทีเรียอยู่ในท่อเนื้อฟันประมาณ 200 - 300 ไมโครเมตร จากคลองรากฟัน

Figure 1 Scanning electron microscope at 1,500X magnification

Arrows show bacteria penetrated into dentinal tubules at the depth of 200 - 300 micrometers.

ตารางที่ 1 ผลการเพาะเชื้อภายหลังการขยายคลองรากฟันร่วมกับการล้างด้วยน้ำยาล้างคลองรากฟันชนิดต่าง ๆ

Table 1 Results of culture after mechanical instrumentation and irrigated with different irrigants

Type of root canal irrigants	N	Positive Cultures	Negative Cultures	Mean of colony forming units/culture positive canal (SD)
- Mangosteen pericarp extracts with papain (50 mg/ml)	30	1	29	1
- Propolis extracts with papain (50 mg/ml)	30	0	30	0
- 2.5 % Sodium hypochlorite	30	0	30	0
- Normal saline	5	5	0	9.8 (4.15)
- 50 % Dimethyl sulfoxide	5	5	0	4.4 (2.51)
- Mixture of 50 % Dimethyl sulfoxide with papain	5	5	0	2.8 (1.79)
- Neither infected nor irrigated tooth	1	0	1	0

บทวิจารณ์

การศึกษานี้เลือกใช้เชื้อ 2 ชนิดผสมกัน เนื่องจากในคลองรากฟันมักมีการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิด เอ็นเทอโรค็อกคัส-ฟิคัลลิส เป็นเชื้อที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ง่าย พบในพื้นที่ได้รับการอุดคลองรากฟัน และมีรอยโรคบริเวณปลายรากฟัน และมีความสามารถในการซึมผ่านเข้าไปในท่อเนื้อฟันได้ดี¹⁰ ส่วนเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดไน พบมากที่สุดในการศึกษาของ Sedgley และคณะ⁵ พบว่า แบคทีเรียทั้งสองชนิดอยู่ร่วมกันโดยแลกเปลี่ยนยีนกัน จึงน่าจะส่งผลให้ปรับตัวเพิ่มความอยู่รอดจากน้ำยาล้าง และยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในคลองรากฟัน

การศึกษานี้พบว่า ประสิทธิภาพของน้ำยาล้างคลองรากฟันจากสารสกัดเปลือกมังคุดกับปาเปน และจากสารสกัดพรอพอลิสกับปาเปน ต่อการกำจัดเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดไน ผสมกับเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟิคัลลิส ในคลองรากฟัน ไม่แตกต่างจากโซเดียม ไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยพบว่า มี 1 ตัวอย่างจากสารสกัดเปลือกมังคุดกับปาเปนมี 1 โคโลนีเกิดขึ้นจากการตรวจด้วยตาเปล่าพบว่า โคโลนีมีลักษณะกลม เรียบ แต่ในการศึกษานี้ไม่ได้ทดสอบโคโลนีที่เกิดขึ้นว่า เป็นเชื้อสเตรปโตค็อกคัส

กอร์โดไน หรือเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟิคัลลิส จึงทำให้ไม่ทราบว่า เป็นเชื้อที่หลงเหลืออยู่ หรือปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้ไม่ว่าจะเป็นโคโลนีของเชื้อชนิดใด ก็แสดงให้เห็นถึงการลดลงของเชื้อแบคทีเรียเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงถึงประสิทธิภาพของน้ำยาล้างคลองรากฟันที่กำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ดี

การศึกษานี้ใช้ระยะเวลาการติดเชื้อในท่อเนื้อฟัน 14 วัน เนื่องจากการศึกษาในปี ค.ศ. 1982 ของ Akpata และ Blechman¹¹ พบว่า แบคทีเรียใช้เวลาอย่างน้อย 14 วัน จึงสามารถเข้าไปในท่อเนื้อฟันได้ และเมื่อตรวจสอบการแทรกซึมของแบคทีเรียเข้าไปในท่อเนื้อฟัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกำลังขยาย 1,500 เท่าพบว่า แบคทีเรียสามารถเข้าไปในท่อเนื้อฟันได้ลึก 200 - 300 ไมโครเมตร ในปี ค.ศ. 1996 Love¹² พบว่า เชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดไน สามารถเข้าไปในท่อเนื้อฟันได้ลึก 200 ไมโครเมตร การขยายคลองรากฟันด้วยตะไบขนาด 35 จะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 350 ไมโครเมตรที่ปลายตะไบ หากคลองรากฟันมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 300 ไมโครเมตร¹³ ทำให้ตะไบทำความสะอาดลึกเข้าไปในผิวคลองรากฟันเพียง 25 ไมโครเมตรเท่านั้น ซึ่งไม่เพียงพอที่จะกำจัดเชื้อแบคทีเรียในท่อเนื้อฟัน ดังนั้นการใช้น้ำยาล้างคลองรากฟัน ร่วมกับการใส่ยาที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในคลองรากฟัน จึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการรักษาคลองรากฟันให้ประสบความสำเร็จ

การกำจัดเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดไน ผสมกับเชื้อ

เอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส ในคลองรากฟันในการศึกษานี้ น่าจะเป็นผลหลักจากสารสกัดเปลือกมังคุด และจากพรอพอลิส เนื่องจากการศึกษานำร่องพบว่า ค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของปาเปนที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดโนผสมกับเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิส คือ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยไม่พบความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ferreira และคณะ¹⁴ ที่ศึกษาการต้านแบคทีเรียของน้ำยาล้างคลองรากฟัน ในฟันรากเดี่ยวที่มีเนื้อเยื่อในเน่าตาย 60 ซี พบว่า น้ำยาล้างคลองรากฟันที่ใช้ปาเปนเจลด ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ เชื้อกลุ่มสเตรปโตค็อกคัส และเชื้อกลุ่มที่ไม่ใช้ก๊าซออกซิเจนได้น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียม ไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และน้ำมันละหุ่งร้อยละ 3.3 แต่ในการศึกษานี้ผสมปาเปนในน้ำยาล้างคลองรากฟันจากสารสกัดเปลือกมังคุด และจากพรอพอลิส เนื่องจากต้องการผลของปาเปนซึ่งเป็นโปรติโอไลติกเอ็นไซม์ ช่วยกำจัดเศษเนื้อเยื่อ¹⁵

การศึกษานี้ใช้สารโดเมธิล ซัลฟอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นตัวทำลาย และเจือจางความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกมังคุด และสารสกัดจากพรอพอลิส เนื่องจากโดเมธิลซัลฟอกไซด์เป็นของเหลวใส ไม่มีสี สามารถเป็นตัวทำลายทั้งสารมีชีวิตและสารไม่มีชีวิต¹⁶ ในปี.ศ. 1993 Rowley และ Anderson¹⁷ พบว่า โดเมธิล ซัลฟอกไซด์ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 10 ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจะจับกันเป็นก้อน (clumping) และที่ความเข้มข้นร้อยละ 40 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตโดยตรง การศึกษาของ Galvao และคณะ¹⁸ แนะนำให้ใช้โดเมธิล ซัลฟอกไซด์ที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดในการทำละลายสารเมื่อใช้กับสิ่งมีชีวิต ดังนั้น ในการศึกษาต่อไปควรศึกษาถึงความเข้มข้นของโดเมธิล ซัลฟอกไซด์ที่น้อยที่สุด ที่ยังคงสามารถละลายสารสกัดจากเปลือกมังคุด และสารสกัดจากพรอพอลิส เพื่อให้ได้น้ำยาล้างคลองรากฟันที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย และมีความปลอดภัยมากที่สุด

ขนาดของท่อเนื้อฟันที่กว้างในฟันที่อายุน้อย อาจทำให้การแทรกซึมของแบคทีเรียในท่อเนื้อฟันเป็นไปได้ง่ายกว่า¹⁹ การศึกษานี้ไม่ได้ควบคุมอายุของฟันที่ถูกถอน แต่ควบคุมขนาดท่อเนื้อฟันทางอ้อม โดยควบคุมขนาดของรูเปิดปลายรากฟันให้มีขนาดไม่เกินตะไบเบอร์ 15 เพื่อให้ขนาดของท่อเนื้อฟันมีขนาดใกล้เคียงกัน และใช้ไมสเตอร์เอพิคอลไฟล์ขนาด 35 เนื่องจากตะไบขนาดใหญ่กว่า 30 ทำให้น้ำยาล้างคลองรากฟันชะล้างถึงปลายรากฟันได้สะดวกขึ้น²⁰ โดยควบคุมความลึกของเข็มน้ำยาล้างคลองรากฟันให้เข็มเข้าไปลึกสุดแล้วถอยออกเพื่อให้ใกล้เคียงกับการทำงานในคลินิก

ข้อจำกัดของการใช้หัวกรอเกทกริดเดลิตรัลในการศึกษานี้ อาจกรอเอาเนื้อฟันที่มีเชื้ออยู่ออกมาได้ไม่หมด เพราะรากฟันยาว 12 มิลลิเมตร ใช้ความยาวทำงาน 11 มิลลิเมตร หัวกรอเกทกริดเดลิตรัล เบอร์ 1 (เท่ากับตะไบขนาด 50) กรอที่ความลึก 10 มิลลิเมตร ส่วนป้องกันที่สุดของหัวกรอเกทกริดเดลิตรัลจะอยู่ที่ตำแหน่ง 9 มิลลิเมตร ซึ่งในคลองรากฟันได้ถูกขยายด้วยตะไบขนาด 35 แล้ว จึงอาจกรอลึกลงไปเพียง 250 ไมโครเมตรเท่านั้น

การศึกษานี้มีหลายปัจจัยที่แตกต่างจากในคลินิก ได้แก่ ความยาวของคลองรากฟัน ซึ่งตัดส่วนของตัวฟันออกเหลือส่วนของรากฟัน 12 มิลลิเมตร เพื่อควบคุมความยาวให้เท่ากัน ไม่มีส่วนของตัวฟันมาขัดขวาง การขยายคลองรากฟัน และการเข้าถึงของน้ำยาล้างคลองรากฟัน ซึ่งความยาวของคลองรากฟันจะสั้นกว่าในทางคลินิก ทำให้น้ำยาล้างคลองรากฟันลงไปได้ลึกกว่า นอกจากนี้ ชนิดของเชื้อที่ใช้ในการศึกษามีเพียง 2 ชนิด ในทางคลินิกเชื้อโรคที่อยู่ในคลองรากฟัน และท่อเนื้อฟันอาจมีมากกว่า 2 ชนิด อยู่ร่วมกันในสถานะแวดล้อมที่ประกอบไปด้วยสารอินทรีย์ เศษเนื้อเยื่อในเลือด และเนื้อฟัน เป็นต้น ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้อาจมีผลต่อประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อโรคของน้ำยาล้างคลองรากฟันได้²¹⁻²²

บทสรุป

ประสิทธิผลของน้ำยาล้างคลองรากฟันจากสารสกัดเปลือกมังคุดกับปาเปน น้ำยาล้างคลองรากฟันจากสารสกัดพรอพอลิสกับปาเปน และโซเดียม ไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ในการกำจัดเชื้อสเตรปโตค็อกคัส กอร์โดโน ผสมกับเชื้อเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคัลลิสในคลองรากฟัน ไม่แตกต่างกัน

เอกสารอ้างอิง

1. Cogulu D, Uzel A, Oncag O, Eronat C. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:443-9.
2. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:86-93.
3. Chavez de Paz I, Svensater G, Dahlen G, Bergenholtz G. Strep-tococci from root canals in teeth with apical periodontitis

- receiving endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100:232-41.
4. Sedgley C, Nagel A, Dahlen G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod* 2006;32:173-7.
 5. Sedgley CM, Lee EH, Martin MJ, Flannagan SE. Antibiotic resistance gene transfer between *Streptococcus gordonii* and *Enterococcus faecalis* in root canals of teeth *ex vivo*. *J Endod* 2008;34:570-4.
 6. Haapasalo M, Ranta H, Ranta KT. Facultative gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. *Acta Odontol Scand* 1983;41:19-22.
 7. Torrungruang K, Vichienroj P, Chutimaworapan S. Antibacterial activity of mangosteen pericarp extract against cariogenic *Streptococcus mutans*. *CU Dent J* 2007;30:1-10.
 8. Samaksamarn T, Chailertvanitkul P, Laopaiboon M, Kaentip P, Yim-art P, Sheewakumnuan N. Antibacterial Properties of Propolis Extracted by Agar Well Diffusion Method. *Khon Kaen Dent J* 2012;15:21-8.
 9. Couto De Oliveira G, Ferraz CS, Andrade Jr CV, Pithon MM. Chlorhexidine gel associated with papain in pulp tissue dissolution. *Restor Dent Endod* 2013;38:210-4.
 10. Plummer C, Douglas CW. Relationship between the ability of oral streptococci to interact with platelet glycoprotein Ibalph and with the salivary low-molecular-weight mucin, MG2. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;48:390-9.
 11. Akpata ES, Blechman H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall *in vitro*. *J Dent Res* 1982;61:435-8.
 12. Love RM. Regional variation in root dentinal tubule infection by *Streptococcus gordonii*. *J Endod* 1996;22:290-3.
 13. Abdulla h, Kanagas S, Luke DA. Frequency, Size and Location of Apical and Lateral Foramina in Anterior Permanent Teeth. *Sains Malaysiana* 2013;42:81-4.
 14. Ferreira CM, Bonifácio KC, Fröner IC, Ito IY. Evaluation of the antimicrobial activity of three irrigating solutions in teeth with pulpal necrosis. *Braz Dent J* 1999;10:15-21.
 15. Flindt M. Health and safety aspects of working with enzymes. *Process Biochem* 1979;13:3-7.
 16. Wadhvani T, Desai K, Patel D, Lawani D, Bahaley P, Joshi P, *et al*. Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials. *The Internet Journal of Microbiology* 2009;7.
 17. Rowley SD, Anderson, GL. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. *Bone marrow transplantation* 1993;11:389-93.
 18. Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cord-eiro MF. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal* 2014;28:1317-30.
 19. Kakoli P, Nandakumar R, Romberg E, Arola D, Fouad AF. The effect of age on bacterial penetration of radicular dentin. *J Endod* 2009;35:78-81.
 20. Khademi A, Yazdizadeh M, Feizianfard M. Determination of the minimum instrumentation size for penetration of irrigants to the apical third of root canal systems. *J Endod* 2006;32:417-20.
 21. Sundqvist G, Johansson E, Sjogren U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endod* 1989;15:13-9.
 22. Siqueira JF, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998;24:414-6.