การยับยั้งขบวนการผลิตกรดแลกติกและโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ โดยสารสกัดจากใบชา

เกรียงไกร คุ้มไพโรจน์ ท.บ.[1]
มาลี แซ่ก๊วย วท.บ., วท.ม.[1]
วิธูวรรณ แผ้วชนะ[2]
อโนชา ซื่อสุวรรณ[2]
อมรรัตน์ อิงคเศรษฐ์[2]

[1] ภาควิชาชีวเคมี คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[2] นิสิต คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากใบชาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการสร้างโพลีแซคคาไรด์และกรดแลกติกของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ KPSK-2 ในหลอดทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เพื่อนำข้อมูลนี้ไปเป็นแนวทางหนึ่งในการป้องกันโรคฟันผุ

วัสดุและวิธีการ การทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มทดสอบเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทอด ฮีเวต (Todd Hewitt) ที่เติม 4% กลูโคส และมีสารสกัดจากใบชา (4.5 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร) ความเข้มข้น 50.0, 33.3, 25.0, 20.0, 16.7 และ 14.2% โดยปริมาตร กลุ่มควบคุมเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทอด ฮีเวต ที่เติมน้ำกลั่นแทนสารสกัดจากใบชา นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสใน 5% คาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บเชื้อโดยนำไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที นำส่วนใสมาตรวจหาปริมาณโพลีแซคคาไรด์และปริมาณกรดแลกติก

ผลการศึกษา โดยการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยอะโนวา (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าสารสกัดจากใบชาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถยับยั้งการสร้างโพลีแซคคาไรด์และกรดแลกติกของแบคทีเรียได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ยกเว้นสารสกัดจากใบชาที่ความเข้มข้น 14.2% ที่ไม่สามารถยับยั้งการสร้างกรดแลกติกได้ แต่สารสกัดจากใบชาทุกความเข้มข้นที่ได้ทำในการทดลองนี้ ยับยั้งการสร้างโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียได้อย่างไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนผลต่อการสร้างกรดแลกติกพบว่ามีความแตกต่างกันในทุกความเข้มข้นโดยเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น การสร้างกรดแลกติกจะค่อย ๆ ลดลง

สรุป สารสกัดจากใบชาที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมสามารถยับยั้งการสร้างโพลีแซคคาไรด์และกรดแลกติกของแบคทีเรียจากเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ในหลอดทดลองได้

(ว ทันต จุฬาฯ 2544;24:195-202)

บทนำ

ปัจจุบันมีการนำเอาสมุนไพรพื้นบ้านมาใช้ในการรักษาโรคเหงือกและฟันมากขึ้น เนื่องจากมีการศึกษาผลของการต้านเชื้อแบคทีเรียของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ สมุนไพรหลายชนิดได้ถูกนำมาผสมในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในช่องปาก คือ ยารักษาแผลในปาก ยาสีฟันและยาบ้วนปาก ชาจัดว่าเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้เป็นเครื่องดื่มที่นิยมแพร่หลายกันมานานและนิยมไปทั่วโลก ชามีชื่อทางพฤกษศาสตร์ ว่า Theasinensis Linn. ชาเป็นเครื่องดื่มชนิดหนึ่ง ชาวจีนเป็นชาติแรกที่นิยมดื่มชา[1] ต้นชาเป็นไม้พุ่มที่เจริญได้ดีในที่สูงซึ่งมีฝนตกชุก ใบมีลักษณะรูปไข่ ดอกสีขาวคล้ายดอกสารภีมีกลิ่นหอม ต้นชามีถิ่นกำเนิดในอินเดียและจีน ปัจจุบันปลูกกันที่ศรีลังกา จีน ญี่ปุ่น อินเดีย อินโดนีเซียและไทย ใบชาที่ขายในท้องตลาดมีอยู่ 3 ชนิด คือชาเขียว (Green tea), ชาดำ (Black tea) และชาอูลอง (Oolong tea)[1] ชาแต่ละชนิดดังกล่าวจะแตกต่างกันที่ขั้นตอนการผลิต ส่วนประกอบที่สำคัญของชา ได้แก่เธอีน (Theeine) เป็นอัลคะลอยด์ชนิดหนึ่งโดยมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง มีสารอเดนีน (Adenine) ทีโอโบรมีน (Theobromine) แซนธีน (Xanthine) และทีโอฟิลลีน (Theophylline) สารเหล่านี้ทำหน้าที่ขยายหลอดลม ใช้รักษาโรคหืดและขับปัสสาวะ

ชาเป็นพืชที่ได้รับการวิจัยอย่างกว้างขวางในการป้องกันโรคฟันผุ เช่นในประเทศญี่ปุ่นมีการศึกษาพบว่าเด็กที่ดื่มชาจะเป็นโรคฟันผุน้อยมากเมื่อเทียบกับเด็กทั่วไป[2] Rosen[3] ได้ทำการทดลอง โดยให้หนูดื่มชาเปรียบเทียบกับดื่มน้ำเปล่าเป็นกลุ่มควบคุมโดยได้ให้เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคฟันผุเข้าไป ผลการทดลองพบว่าหนูที่ดื่มชาฟันผุน้อยกว่าหนูที่ดื่มน้ำเปล่าอย่างมีนัยสำคัญ ได้มีการทดลองในหนูพบว่าชาลดการสะสมของคราบจุลินทรีย์[4] บนตัวฟันและลดการเกิดโรคฟันผุ ยับยั้งการผลิตกลูแคนชนิดไม่ละลายน้ำของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์[5] Ramsey และคณะ[6] และ Osani และคณะ[7] รายงานว่าคนที่ดื่มน้ำชาเป็นประจำจะลดอัตราการเกิดโรคฟันผุได้ แสดงให้เห็นว่ามีปริมาณสารฟลูออไรด์ในใบชาสูงพอ[2,4] โดยฟลูออไรด์สามารถเปลี่ยนเป็นฟลูออโรอะปาไทต์ (fluoroapatite) ทำให้เคลือบฟันทนทานต่อการละลายด้วยกรด[8] จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าชามีผลลดอัตราการเกิดฟันผุซึ่งนอกจากเป็นผลจากฟลูออไรด์ในส่วนประกอบของใบชาแล้วยังพบว่าชาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์[9,10] ชาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยลดการทำงานของเอ็นไซม์อีนอลเลส (enolase) ในวิถีไกลโคไลซีส Kashket และคณะ[11] ได้ศึกษาสารสกัดจากชาพบว่ามีสารที่ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ กลูโคซิล ทรานสเฟอเรส จากเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ซึ่งมีผลต่อการผลิตกลูแคนชนิดไม่ละลายน้ำและลดอัตราการสร้างกรด[4,12,13] Elvin-Levis และ Steelman[14] รายงานว่าสารสะกัดจากใบชาสามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์-กลูแคน ซินทีเตส (glucan synthetase), เด็กซ์แทรน ซูเครส (dextran sucrase) และกลูโคซิล ทรานสเฟอเรส ทำให้มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิดและยับยั้งการสะสมของโพลีแซคคาไรด์ นอกจากฟลูออไรด์ที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (bacteriostatic) แล้วยังมีสารอื่น ๆ ที่สะกัดได้จากในใบชาได้แก่แทนนิน (Tannin) เป็นสารประกอบโพลีฟีนอลิก (polyphenolic compound) ทำให้เกิดรสขมและฝาด เป็นสารที่มีกลิ่นหอมซึ่งเกิดในขณะที่หมักชา[5,15,16] สารสะกัดแทนนินจากใบชาลดอัตราการเกิดโรคฟันผุ (anticariogenic) ได้ทั้งในสัตว์ทดลองและในคน[3,14,17,18] และยับยั้งการสังเคราะห์สารกลูแคนที่ละลายในน้ำ (water soluble glucan) จากน้ำตาลซูโครส

ฟลูออไรด์ความเข้มข้นต่ำให้ผลในการลดการละลายของแคลเซียมและฟอสเฟตโดยกรด ทั้งฟลูออไรด์ความเข้มข้นสูงและฟลูออไรด์ความเข้มข้นต่ำจะทำปฏิกิริยากับผลึกไฮดรอกซิอะปาไทต์ที่ผิวเคลือบฟันได้เป็นฟลูออโรอะปาไทต์ ฟลูออโรอะปาไทต์นี้จะทนต่อการละลายด้วยกรดได้มากกว่าไฮดรอกซิอะปาไทต์[12,13] นอกจากนี้แล้วฟลูออไรด์ยังมีผลกับแบคทีเรียคือลดกระบวนการไกลโคไลซิส โดยไปยับยั้งเอ็นไซม์อีนอเลส (enolase) เป็นผลให้ลดปริมาณการสร้างกรดแลกติก

ฟันผุเป็นโรคในช่องปากมีสาเหตุสำคัญมาจากแบคทีเรียสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์[19,20] และแลกโตแบคซีลัส *(Lactobacillus)*[21] ทำให้เกิดการสูญเสียแร่ธาตุของเคลือบฟันโดยกรดแลคติกที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้นจากน้ำตาลกลูโคส กรดแลกติกกัดกร่อนผิวฟันโดยทำให้เกิดการละลายของแร่ธาตุที่ประกอบกันขึ้นเป็นเนื้อเยื่อฟัน แร่ธาตุที่สำคัญในเคลือบฟันได้แก่อนินทรียสารพวกแคลเซียมและฟอสฟอรัส เมื่อฟันถูกทิ้งไว้ในสภาพความเป็นกรดนาน ๆ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นบนตัวฟันโดยเห็นเป็นจุดสีขาว[19] ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของโรคฟันผุที่เกิดบนเคลือบฟัน

สเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์มีความสามารถสูงในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติกและทนต่อสภาวะความเป็นกรดได้ดี[22] มีการทดลองพบว่าเชื้อทำให้กรดสะสมในแผ่น

คราบจุลินทรีย์[23] เชื้อกลุ่มมิวแทนส์ สเตร็พโตคอคไคชนิดที่พบมากที่สุดในคราบจุลินทรีย์ คือ ซีโรไทป์ ซี (serotype c)[24] เชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ใช้เอ็นไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรสในการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นฟรุคแทนและน้ำตาลกลูโคส และใช้เอ็นไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็นเอ็กตร้า เซลล์ลูลาร์ โพลีแซคคาไรด์ ได้แก่ กลูแคน (glucans) และฟรุคแทน (fructans) นอกจากนี้เอ็นไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสมีบทบาทต่อการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกับผิวฟันและการยึดเกาะระหว่างเชื้อแบคทีเรียด้วยกันเองด้วย

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของสารสกัดจากใบชาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการสร้างโพลีแซคคาไรด์และกรดแลคติกของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เพื่อนำข้อมูลนี้ไปเป็นแนวทางหนึ่งในการป้องกันโรคฟันผุ

วัสดุและวิธีการ

การเลี้ยงเชื้อ

เชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ สายพันธุ์ KPSK2 จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลี้ยงในอาหารเหลว (tryptic soy broth) (Diffco Lab, USA) ในก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลานาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับความขุ่นให้ได้ค่าการดูดคลื่นแสง (Optical Density) ที่ 550 นาโนเมตร เท่ากับ 0.6 โดยใช้เครื่องสเป็คโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 (Bausch and Lomb, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

เตรียมหลอดทดลอง 7 หลอด เตรียมชาโดยต้มใบชา 4.5 กรัม ในน้ำเดือด 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที นำมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อทอด ฮีเวต (Todd-Hewitt media) ที่มีน้ำตาลซูโครส 4% ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดจากชา 50.0, 33.3, 25, 20, 16.7 และ 14.2% โดยปริมาตร (V/V) เติมอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวหลอดละ 6 มิลลิลิตรสำหรับกลุ่มทดสอบและเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำกลั่นแทนชาในหลอดควบคุม นำไปเข้าเครื่องฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมสารแขวนลอยของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ลงไป 35 ไมโครลิตร ทุกหลอดนำไปบ่ม (incubate) ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นคว่ำหลอดขึ้นลง 3 รอบด้วยวิธี inversion ด้วยความแรงเท่า ๆ กันทุกหลอด แล้วนำไปเหวี่ยงที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปทดสอบต่อไป[25]

การหาปริมาณกรดแลกติก[25]

เตรียมหลอดทดลองเติมน้ำกลั่นหลอดละ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานแลกเตด (standard lactate) และสารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองตามลำดับ เติมไกลซีน บัฟเฟอร์ (Glycine buffer) 2 มิลลิลิตร, NAD^+ 0.1 มิลลิลิตร และ LDH 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดดังกล่าวนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำมาวัดค่าการดูดแสงที่ 340 นาโนเมตร[(25)] ด้วยเครื่องยูวี-สเป็คโตรโฟโตมิเตอร์ (UV Spectrophotometer) รุ่น 7800 (Jasco, ประเทศญี่ปุ่น) คำนวณหาปริมาณกรดแลกติกโดยเทียบกับหลอดมาตรฐาน ซึ่งเตรียมด้วยวิธีเดียวกันและเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแลกเตดเป็นค่าต่าง ๆ

การหาปริมาณโพลีแซคคาไรด์

ใช้วิธี Nelson-Somogiyi method[26] โดยนำส่วนน้ำในของสารละลายตัวอย่างเติมลงในหลอดเหวี่ยง 2 มิลลิลิตร แล้วเติมเอททิลแอลกอฮอล (ethanol) 95% (เย็น) 4 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งนาน 30 นาที นำหลอดไปเหวี่ยงที่ 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง แล้วเติมเอททิลแอลกอฮอล 95% (เย็น) 4 มิลลิลิตร เขย่าหลอดประมาณ 30 วินาที นำหลอดไปเหวี่ยงที่ 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นเทน้ำใสส่วนบนทิ้ง แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 6 โมลาร์ 0.2 มิลลิลิตร เขย่าจนตะกอนละลายหมด เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 6 โมลาร์ 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เตรียมหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นลงหลอดละ 0.8 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานกลูโคล (standard glucose) และสารละลายตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตรในหลอดทดลองตามลำดับ เติมอัลคาไลน์คอปเปอร์รีเอเจนต์ (alkaline copper reagent) 1.0 มิลลิลิตร ทุกหลอด นำไปต้ม 10 นาที ปล่อยให้เย็นแล้วเติม อาซีโนโมลิบเดต (Arsenomolybdate) หลอดละ 1.0 มิลลิลิตร ทั้งหมดผสมให้เข้ากัน นำมาวัดค่าการดูดแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเป็คโตรโฟโตมิเตอร์ หาปริมาณโพลีแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้น โดยการคำนวณเทียบกับหลอดสารละลายมาตรฐาน จากนั้นทำการทดลองซ้ำกัน 10 ครั้ง ตามขั้นตอนของการทดลองดังกล่าวขั้นต้น

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS ทดสอบโดยใช้ one-way ANOVA และ LSD เพื่อสรุปหาค่าเฉลี่ย (arithmatic mean) และบอกการกระจายของข้อมูลในรูปส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากใบชาความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการลดปริมาณโพลีแซคคาไรด์และปริมาณกรดแลกติกที่เกิดจากเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการศึกษา

จากการทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบชาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งการสร้างโพลีแซคคาไรด์และกรดแลกติกของแบคทีเรียพบว่าปริมาณฟลูออไรด์ในสารสกัดจากใบชาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 50% (1:1) พบปริมาณฟลูออไรด์ 4 ส่วนในล้านส่วน (ppm)

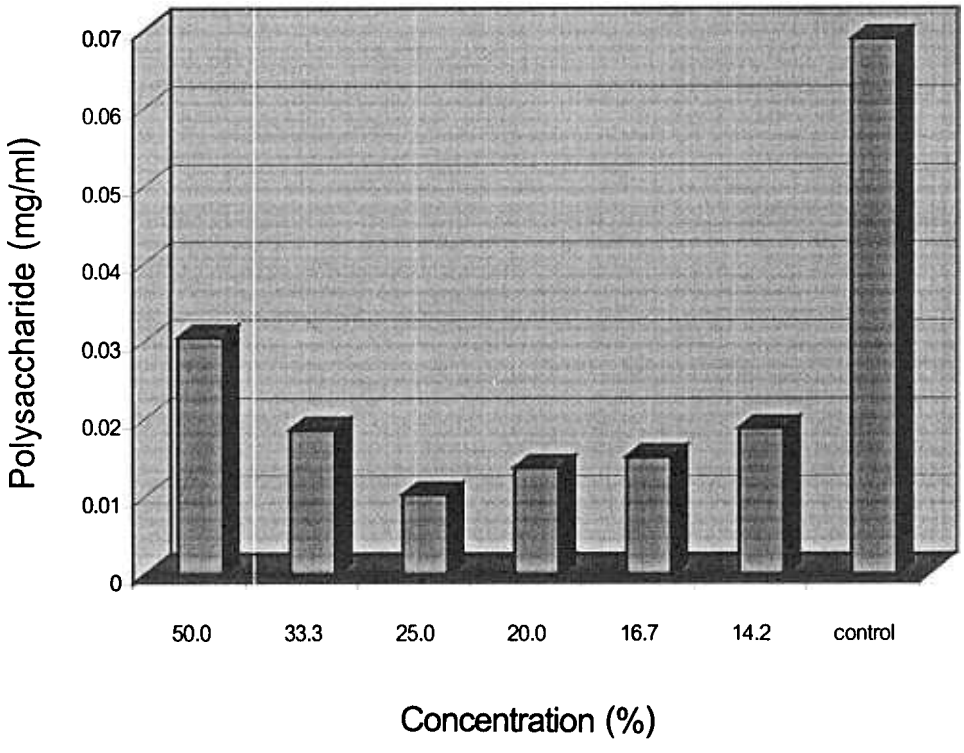
การสร้างโพลีแซคคาไรด์ : เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเติมสารสกัดจากใบชาให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 14.2, 16.7, 20.0, 25.0, 33.3 และ 50.0% V/V พบว่าทุกความเข้มข้นของสารสกัดจากชาที่ทำการทดสอบสามารถลดการสร้างโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยที่ความเข้มข้น 14.2, 16.7, 20.0 และ 25.0% V/V สามารถยับยั้งการสร้างโพลีแซคคาไรด์ได้ใกล้เคียงกัน แต่ที่ความเข้มข้น 33.3 และ 50.0% สามารถยับยั้งได้น้อยลง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1

การสร้างกรดแลกติก : เมื่อเติมสารสกัดจากใบชาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 14.2, 16.7, 20.0, 25.0, 33.3 และ 50.0% v/v พบว่าทุกความเข้มข้นดังกล่าวยกเว้นที่ 14.2% v/v สามารถยับยั้งการสร้างกรดแลกติกได้ โดยเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากใบชาค่อย ๆ เพิ่มขึ้น กรดแลกติกที่เชื้อสร้างจะค่อย ๆ ลดลงตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 2 เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วพบว่าสารสกัดจากชาสามารถยับยั้งการสร้างกรดแลกติกของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 1 แสดงผลของสารสกัดจากใบชาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างโพลีแซคคาไรด์ ของสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์
Table 1 The effect of tea extract on polysaccharide production by Streptococcus mutans.

ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบชา (% โดยปริมาตร)	ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ (mg/ml) (mean ± SD)
0 (กลุ่มควบคุม)	0.069 ± 0.015
14.2	0.019 ± 0.018
16.7	0.015 ± 0.009
20.0	0.014 ± 0.007
50.0	

T แสดงค่าเฉลี่ยที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



รูปที่ 1 แสดงผลของสารสกัดจากใบชาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างโพลีแซคคาไรด์ของสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์

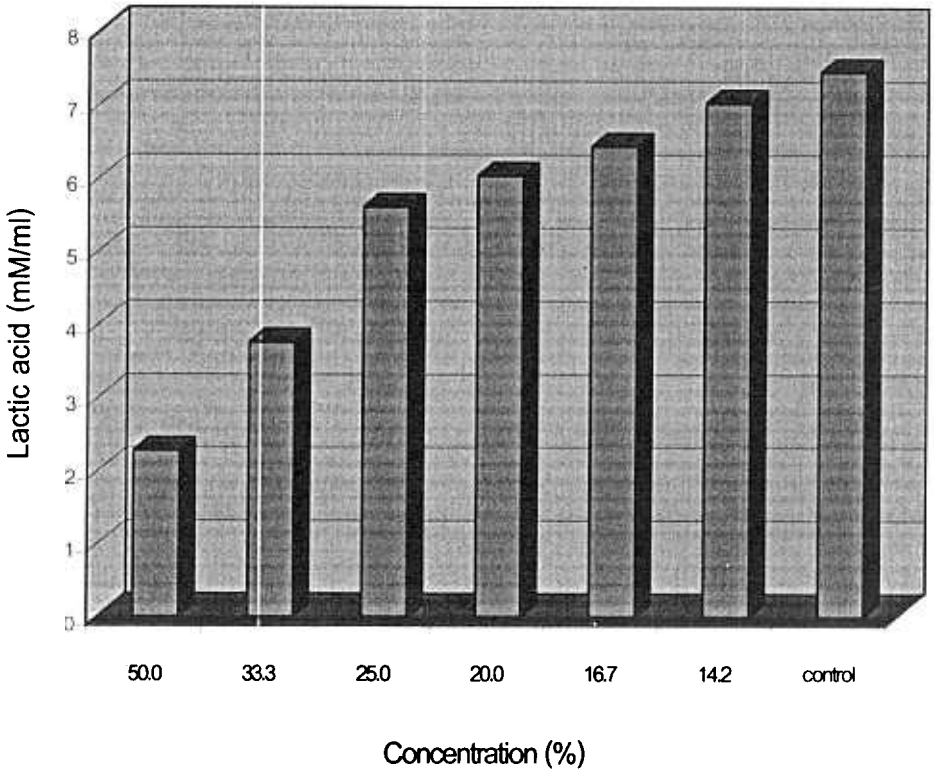
Fig.1 The effects of tea extract on extracellular polysaccharide production by Streptococcus mutans.

ตารางที่ 2 แสดงผลของสารสกัดจากใบชาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างกรดแลกติก ของสเตร็พโตคอคคัสมิวแทนส์

Table 2 The effect of tea extract on lactic acid formation of Streptococcus mutans.

ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบชา (% โดยปริมาตร)	ปริมาณกรดแลกติก (mM/ml) (mM/ml) (mean ± SD)
0 (กลุ่มควบคุม)	7.44 ± 0.330
16.7	6.43 ± 0.426
20.0	
50.0	

I แสดงค่าเฉลี่ยที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



รูปที่ 2 แสดงผลของสารสกัดจากใบชาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างกรดแลกติกของสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์

Fig.2 The effects of tea extract on lactic acid production by Streptococcus mutans.

วิจารณ์

สาเหตุของโรคฟันผุเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าเกิดจากเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ มีอำนาจในการสร้างกรดแลกติกและโพลีแซคคาไรด์จากอาหารพวกน้ำตาลโดยเฉพาะซูโครส เชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ทนต่อสภาวะความเป็นกรดได้ดี ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นจึงทำให้มีการสลายเกลือแร่บนเคลือบฟันทำให้เกิดโรคฟันผุ โดยเฉพาะบริเวณที่ทำความสะอาดได้ยาก จากรายงานการทดลองก่อนหน้านี้พบว่ามีสารฟลูออไรด์และแทนนินในใบชาด้วยปริมาณที่สูงพอที่จะป้องกันฟันผุ [9-13] และนอกจากนั้น แทนนินยังสามารถยับยั้งการสังเคราะห์โพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำด้วย [14-16] สารทั้งสองจะลดอัตราการเกิดโรคฟันผุโดยฟลูออไรด์เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกดูดซึมเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิต และกระจายไปอย่างรวดเร็วด้วยการเข้าไปจับกับกระดูกและฟัน ส่วนที่เหลือถูกขับถ่ายออกจากร่างกายทางไต, ต่อมเหงื่อ และต่อมน้ำลาย พบว่าปริมาณฟลูออไรด์ที่ถูกขับออกมาในน้ำลายมีปริมาณน้อยกว่า 1% แต่อย่างไรก็ตามฟลูออไรด์ที่อยู่ในน้ำลายสามารถเข้าไปจับอยู่ที่ผิวของเคลือบฟัน[21] ส่วนแทนนินเป็นสารที่มีรสฝาด มีประสิทธิภาพฝาดสมาน (astringent) และสามารถลดการสังเคราะห์สารพวกกลูแคน จากเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์[10,11] การทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของชาเพิ่มขึ้น การสร้างกรดแลกติกของเชื้อจะค่อย ๆ ลดลง แต่สำหรับการสร้างโพลีแซคคาไรด์พบว่าในกลุ่มทดสอบ เชื้อสร้างโพลีแซคคาไรด์ได้ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อความเข้มข้นของชาค่อย ๆ เพิ่มปริมาณโพลีแซคคาไรด์กลับเพิ่มขึ้นด้วย อาจเนื่องจากในสารสกัดชามีสารบางตัวซึ่งเป็นอาหารของแบคทีเรีย เมื่อเพิ่มความเข้มข้นระดับหนึ่งจึงกระตุ้นให้มีการสร้างโพลีแซคคาไรด์ได้มากขึ้น

จากการทดลองนี้ ชาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการสร้างโพลีแซคคาไรด์และกรดแลกติกได้ คือ 14.2% V/V ซึ่งมีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นปกติที่นิยมดื่ม ดังนั้นถ้าบริโภคใบชาในชีวิตประจำวันจึงไม่น่าจะมีผลโดยตรงต่อการป้องกันโรคฟันผุ[19] แต่ในชีวิตประจำวันเราได้รับฟลูออไรด์จากอาหารและน้ำดื่ม เมื่อรวมกับปริมาณฟลูออไรด์ที่ได้รับจากการดื่มชาอาจมีปริมาณมากพอที่จะป้องกันฟันผุได้[20] โดยอาจมีความสำคัญในการรักษาสมดุลย์ของฟลูออไรด์ในผิวเคลือบฟัน แต่หากต้องการใช้ชาในการยับยั้งเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์

ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคฟันผุโดยตรง จะต้องเพิ่มความเข้มข้นในการบริโภคให้เท่ากับความเข้มข้นในการทดลองนี้ ซึ่งอาจทำให้เกิดการติดคราบสีบนตัวฟันได้และรับประทานได้ลำบาก เพราะรสชาดอาจจะฝาดจนขม นอกจากนี้ปริมาณฟลูออไรด์ที่ได้รับอาจสูงมาก จนเกิดพยาธิสภาพกับกระดูกและฟันรวมทั้งอวัยวะอื่นๆ ด้วย[27]

สรุป

จากการทดลองนี้ได้ผลสรุปว่า สารสกัดจากใบชาในความเข้มข้นที่พอเหมาะสามารถลดการสร้างโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์ ได้ โดยความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลในการเพิ่มการยับยั้ง แต่ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบชาที่เพิ่มขึ้นจะเพิ่มการยับยั้งการสร้างกรดแลกติกในช่วงที่ทำการทดลอง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ทำวิจัยได้รับเงินสนับสนุนโครงการวิจัยจาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ขอขอบคุณนทพ. สรนันท์ จันทราศุ ที่ช่วยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาช่วยเหลือในเรื่องการเพาะเลี้ยงเชื้อสเตร็พโตคอคคัส มิวแทนส์สำหรับการทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. พยอม ตันติวัฒนะ. สมุนไพร. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์คุรุสภา, 2511:24-6.
2. Chan JT, Koh SH: Fluoride concentration in caffeinated decaffeinated and herbal teas. Caries Res 1996;30:88-92.
3. Rosen S, Elvin-levis M, Beck FM, Beck EX. Anticariogenic effects of tea in rats. J Dent Res 1984;63:658-60.
4. Ooshima T, Minami T, Aono W, Izumitani A, Sobue S, Fugiwara T, et al. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. Caries Res 1993;27: 124-9.
5. Otake S, Makimura M, Kuroki Y, Nishihara Y, Hirasawa M: Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. Caries Res 1991;25:438-43.
6. Ramsey AC, Hardwick JL, Tamacas JC. Fluoride intakes and caries increments in relation of tea in relation of tea consumption of British children. Caries Res 1975;9:312.
7. Osani M, Kosuge M, Yoshino F, Murakimi Y, Tokomusu A. Epidermological evidence about the caries preventive effect of drinking tea. J Prev Dent 1980;6:321-5.
8. Mc Clure FJ, Likin RC. Fluoride in human teeth studies in relation of fluoride in the drinking water. J Dent Res 1951;30:172-6.
9. Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto T. Antibacterial substances in japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. Agric Biol Chem 1989;53:2307-11.
10. Horiba N, Maekawa Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. A pilot study of Japanese green tea as a medicament: antibacterial and bactericidal effects. J Endod 1991;17:122-4.
11. Kashket S, Poalino VJ, Lewis DA, Van Houte J. In vitro inhibitions of glucosyltransferase from the dental plaque bacterium Streptococcus mutans by common beverages and food extracts. Arch Oral Biol 1985;30:812-26.
12. Nakahara K, Kawabata S, Ono H, Oyura K, Tanaka T, Ooshima T, et al. Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glucosyltransferases of mutans streptococci. Appl Environ Microbiol 1993;59: 968-73.
13. Matsumoto M, Minami T, Sasaki H, Sobue S, Hamada S, Ooshima T. INhibitory effect of oolong tea extract on caries-inducing properties of mutans streptococci. Caries Res 1999;33:441-5.
14. Elvin-Levis M, Steelman. Anticariogenic effect of tea drinking among Dallas school children. J Dent Res 1986;65:198.
15. Hara Y, Honda M. The inhibition of alpha-amylase by tea polyphenols. Argic Biol Chem 1990;54:1939-45.
16. Hattori M, Kusumoto IT, Nidhizava T, Ishigami T, Hara Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucantransferase from Streptococcus mutans. Chem Pharm Bull 1990;38:717-20.
17. Shyu K, Meng C, Sun J. The anticariogenic effect of Taiwan tea. Chin Med J 1977;24:55-61.
18. Ooshima T, Minami T, Aono W, Tamura Y, Hamada S. Reduction of dental plaques deposition in humans by oolong tea extract. Caries Res 1994;28:146-9.
19. Krasse BL. Human Streptococci and experimental caries in hamsters. Arch Oral Biol 1966;11:429-35.
20. Hamada S. Dental caries induction in experimental animals by clinical strains of Streptococcus mutans isolated from Japanese children. Microbiol Immunol 1978;22:301-14.
21. Fure S. Romaniec M, Emilson CG and Krasse B. Proportions of streptococcus mutans, Lactobacilli and Actinomyces spp in root surface plaque. Scan J Dent Res 1987;119-23.
22. Freeman BA. Burrows Textbook of Microbiology. 22nd ed. Philadelphia: W.B. Saunder company, 1985:321-3, 713-5.
23. Van Houte J, Uperslaacis HV, Skobe Z and Green DB. Role of sucrose in colonization of Streptococcus mutans in conventional Sprague-Dawley rats. J Dent Res 1976;55:202-15.
24. Loesche, WJ. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. Microbiol Rev 1986;50:353-80.
25. เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย. คู่มือปฏิบัติการชีวเคมี. ภาควิชาชีวเคมี. คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2539;88-92.
26. Nelson N. A photometric adaptation of the somgyi method for the determination. J Biol Chem 1944;153:375.
27. Opinya GN, Vandenburg J, Birkeland JM, Lokkon P. Fluorosis of decidous teeth and frist permanent molars in a rural Kenyan Community. Acta Odontol Scan 1991;49:197-202.

Inhibition of lactic acid and polysaccharide formation of Streptococcus Mutans by tea extract in vitro

Kriengkrai Koompirojn D.D.S.[1]
Malee Guay B.Sc, M.Sc.[1]
Wituwan Peawchana[2]
Anocha Suesuwan[2]
Amonrat Ingkasate[2]

Department of Biochemistry, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University
Dental students, Chulalongkorn University

Abstracts

Objective The objective of this study was to determine the effects of tea extract in different concentrations on the inhibition of polysaccharide and lactic acid production of *Streptococcus mutans* (S. mutans) *KPSK-2* in vitro.

Material and Methods The *Streptococcus mutans* were grown in Todd-Hewitt broth containing 4% sucrose and tea extract (4.5 g of tea leaf boiled in 100 ml of distilled water for 15 minutes was diluted into the following concentrations: 50.0, 33.3, 25.0, 20.0, 16.7 and 14.2% v/v respectively), the samples were incubated under 5% CO_2 at 37°C for 48 hours and centrifuged at 3,000 rpm. The supernatant was analyzed for bacterial polysaccharide and lactic acid production in comparison with the control group.

Results The data were analyzed by ANOVA at 95% confidence. The results showed that the tea extract at different concentrations inhibited polysaccharide and lactic acid production by S. mutans ($p<0.05$), except the 14.2% V/V tea extract could not inhibit lactic acid production.

Conclusion The tea extract at concentrations of 50.0, 33.3, 25.0, 20.0, 16.7 and 14.2% V/V significantly inhibited the polysaccharide production ($p<0.05$) when compared to the control group, but no difference in inhibition of polysaccharide production among each concentration. The tea extract at concentrations of 50.0, 33.3, 25.0, 20.0, 16.7% V/V significantly inhibited ($p<0.05$) the lactic acid production when compared to the control group and there was difference in inhibition among each concentration.

(CU Dent J 2001;24:195-202)

Key words: Fluoride; lactic acid; polysaccharide; Streptococcus mutans; tea extract.