ว ทันต จุฬาฯ 2550;30:235-44
CU Dent J. 2007;30:235-44

บทวิทยาการ
Original Article

สารพอลิแซ็กคาไรด์เจลสกัดจากเปลือกทุเรียน: ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์ และแอกกริเกทิแบกเทอร์ แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์

ทัศนี สลัดยะนันท์ ท.บ., วท.ม.[1]
นวลฉวี หงษ์ประสงค์ ท.บ., M.D.S., อ.ท. (ปริทันตวิทยา)[2]
สุนันท์ พงษ์สามารถ ภ.บ., Ph.D.[3]
วันดี อภิณหสมิต ท.บ., ปร.ด.[4]
พสุธา ธัญญะกิจไพศาล ท.บ., Ph.D.[4]

[1]นิสิตปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[2]ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[3]ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[4]ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนต่อเชื้อสเตร็ปโต-ค็อกคัสมิวแทนส์ และเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ ซึ่งมีส่วนในการก่อโรคฟันผุ และโรคปริทันต์อักเสบ ตามลำดับ

วัสดุและวิธีการ ทำการศึกษาโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์ สายพันธุ์ ATCC 25175 และเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ สายพันธุ์ ATCC 43718 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดน้ำที่มีสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียน ความเข้มข้นต่าง ๆ (50 100 และ 150 มก./มล.) เป็นเวลา 1 5 10 20 30 และ 60 นาที นำไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิต เปรียบเทียบกับคลอร์เฮกซิดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่สารสกัด

ผลการศึกษา ในเวลา 1 นาที สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่ความเข้มข้น 150 มก./มล. และคลอร์เฮกซิดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์ และเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ ในขณะที่สารสกัดที่ความเข้มข้น 100 มก./มล. มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์

และยับยั้งเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่ความเข้มข้น 50 มก./มล. มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิด ในเวลา 60 นาที

สรุป ในเวลา 1 นาที สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนที่ความเข้มข้น 100 และ 150 มก./มล. สามารถฆ่าเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์ และเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดชนิดนี้อาจพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์หลักในผลิตภัณฑ์ทางทันตกรรมเพื่อควบคุมโรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบ

(ว ทันต จุฬาฯ 2550;30:235-44)

คำสำคัญ: *เปลือกทุเรียน; ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย; สเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์; สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจล; แอกกริเกทิแบกเทอร์แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์*

บทนำ

การกำจัดและการยับยั้งการก่อตัวใหม่ของคราบจุลินทรีย์ (dental plaque) เพื่อช่วยป้องกันการเกิดโรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบที่มีประสิทธิภาพทำได้ดีโดยวิธีทางกล คือ การแปรงฟันอย่างถูกวิธี ร่วมกับการใช้อุปกรณ์เสริมในการทำความสะอาด เช่น แปรงซอกฟัน เส้นใยขัดฟัน (dental floss) และอื่น ๆ ตามความเหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละราย แต่ในประชากรบางกลุ่มที่มีข้อจำกัดคือไม่สามารถแปรงฟันได้อย่างมีประสิทธิภาพ หรือมีความเสี่ยงในการเกิดโรคสูงกว่าประชากรทั่วไป ได้แก่ ผู้ป่วยที่มีปัญหาในการควบคุมกล้ามเนื้อและข้อมือ ผู้สูงอายุ ผู้ป่วยที่พักฟื้นในโรงพยาบาล ผู้ป่วยที่ไม่สามารถช่วยเหลือตนเองได้ ผู้ที่มีปัญหาสภาวะทางจิต หรือผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันได้มีการแนะนำให้ใช้สารเคมีเสริมวิธีทางกลในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียและต่อต้านการสะสมใหม่ของคราบจุลินทรีย์ สารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้โดยทั่วไปได้แก่ น้ำยาบ้วนปากที่ผสมสารกลุ่มคลอร์เฮกซิดีน (chlorhexidine)[1] หรือกลุ่มฟีนอล ยาสีฟันที่ผสมสารสกัดกลุ่มไซลิทอล (xylitol)[2] หรือไตรโคลซาน (triclosan)[3] รวมถึงการใช้ยาปฏิชีวนะทางระบบเสริมในการรักษาโรคปริทันต์อักเสบด้วย[4] แต่การใช้สารเคมีสังเคราะห์ในระยะยาวอาจเกิดผลข้างเคียงและการดื้อยาได้ รวมทั้งมีราคาสูงและส่วนใหญ่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จึงเป็นที่มาของโครงการวิจัยในประเทศไทยที่ริเริ่มการศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรท้องถิ่นหลากหลายชนิด ในแง่การต่อต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และการศึกษาความปลอดภัยในการนำมาใช้ในทางการแพทย์และทางทันตกรรม สมุนไพรเหล่านี้ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร[5-7] ใบข่อย[8] ใบฝรั่ง[9,10] เปลือกมังคุด[11,12] เปลือกทุเรียน[13-16] เป็นต้น

ทุเรียน (*Durio zibethinus* Linn.) เป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทยที่ได้รับความสนใจในการนำมาศึกษาวิจัย โดยพบว่าคุณสมบัติของสารสกัดจากส่วนเปลือกซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด[15] โดยสารสกัดที่ความเข้มข้น 20 และ 15 มก./มล. มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) และเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) ตามลำดับ ในเวลา 24 ชั่วโมง แต่ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นเป็น 35 มก./มล. มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดในเวลาเพียง 4 ชั่วโมง[16] อีกทั้งไม่มีความเป็นพิษเมื่อทดสอบกับหนูทดลองโดยให้กินสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ในครั้งเดียวในปริมาณสูงถึง 2 ก. ต่อน้ำหนักของหนู 1 กก. หรือให้กินติดต่อกันในขนาด 0.5 ก. ต่อน้ำหนักของหนู 1 กก. ต่อวัน เป็นระยะเวลา 100 วัน[13,14]

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจล (polysaccharide gel extract) จากเปลือกทุเรียนมีคุณสมบัติในการทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์ และเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบ ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ดี ยังไม่มีการศึกษาหาความเข้มข้นของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนที่มีความสามารถในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อทั้งสองที่ใกล้เคียงกับเวลาที่แนะนำให้ใช้ของผลิตภัณฑ์ป้องกันโรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์

เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียน ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์และเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ ปริมาณ 10^6 คอโลนี/มล. และหาระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลต่อเชื้อแบคทีเรีย โดยทำการทดสอบที่ระยะเวลา ซึ่งใกล้เคียงกับเวลาที่ใช้ของผลิตภัณฑ์ป้องกันโรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบที่มีอยู่ในท้องตลาด นั่นคือทดสอบที่เวลา 1 5 10 20 30 และ 60 นาที เปรียบเทียบกับสารเคมีคลอร์เฮกซิดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในห้องปฏิบัติการ

วัสดุและวิธีการ

การสกัดแยกและเตรียมสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียน

สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียน (*Durio zibethinus* L.) ทำการเตรียมตามวิธีที่รายงานมาก่อนหน้านี้[17] โดยนำเปลือกด้านในส่วนที่เป็นสีขาวมาหั่นเป็นชิ้นขนาดประมาณ 2x2 ซม. จากนั้นนำไปต้มและกรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนที่กรองได้ไประเหยน้ำจนได้สารละลายข้นและเหนียว แล้วจึงนำสารละลายไปตกตะกอนในเอทานอล (ethanol) ร้อยละ 75 จนได้ตะกอนวุ้น นำไปอบให้แห้ง ร่อนผ่านตะแกรงเพื่อให้ได้ผงละเอียด และอบซ้ำที่อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส

นำสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่ได้มาทำละลาย โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย ให้มีความเข้มข้น 100 200 และ 300 มก./มล. เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเมื่อเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วน 1 : 1 เป็น 50 100 และ 150 มก./มล. ตามลำดับ จากนั้นนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

การศึกษานี้ใช้เชื้อสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์ สายพันธุ์ ATCC 25175 และเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์แอกทิโนไมซีเทม-คอมิแทนส์ สายพันธุ์ ATCC 43718 ทำการเตรียมเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดตามวิธีที่รายงานมาก่อนหน้านี้[16] โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในจานเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้คอโลนีเดี่ยว (single colony) จากนั้นถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดน้ำทริปติเคสซอย (Trypticase soy broth; Difco®, Becton Dickinson and Company, France) และเบรนฮาร์ทอินฟิวชัน (Brain Heart Infusion; Difco ®, Becton Dickinson and Company, France) ตามลำดับ และนำไปเลี้ยงต่อในตู้เพาะเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำมาใช้เป็นเชื้อตั้งต้นโดยนำไปวัดความขุ่นด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.5 แมคฟาแลนด์ (McFarland)

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดพอลิ-แซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียน

ใช้วิธีการทดสอบแบบไทม์คิล (Time-kill assay)[18] กล่าวโดยสรุปได้ดังนี้ เตรียมเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น $1x10^6$ คอโลนี/มล. นำมาทดสอบด้วยสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลที่ความเข้มข้น 50 100 และ 150 มก./มล. เป็นเวลา 1 5 10 20 30 และ 60 นาที ตามลำดับ เมื่อครบแต่ละช่วงเวลาที่กำหนด ทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียด้วยการเติมน้ำเกลือปราศจากเชื้อ (0.9% sterile normal saline solution) ให้เจือจางเป็น 10 100 และ 1,000 เท่า แล้วดูดเชื้อแบคทีเรียมาเกลี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นทริปติเคสซอย (Trypticase soy agar; Difco®, Becton Dickinson and Company, France) นำไปเพาะเลี้ยงต่อในตู้ปรับอุณหภูมิและก๊าซเฉพาะอย่าง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ทำให้เชื้อเจริญเติบโตเพียงพอที่จะสังเกตคอโลนีได้ จากนั้นนับจำนวนคอโลนีที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบซึ่งใช้น้ำเกลือปราศจากเชื้อแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ และกลุ่มควบคุมบวกซึ่งใช้สารละลายคลอร์เฮกซิดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

สถิติ

ใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ การวัดค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของข้อมูลในการเปรียบเทียบระหว่างปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตภายหลังจากสัมผัสกับสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นต่างๆ ในเวลาที่กำหนด กับกลุ่มควบคุมลบและกลุ่มควบคุมบวก

ผลการศึกษา

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนต่อเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนต่อการทำลายเชื้อแบคทีเรียสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์ ที่จำนวนเชื้อเริ่มต้น 10^6 คอโลนี/มล. (ตารางที่ 1) ปรากฏว่า ในเวลา 1 นาที สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลที่ความเข้มข้น 100 และ 150 มก./มล. และคลอร์เฮกซิดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ร้อยละ 100 ในขณะที่สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 50 มก./มล. ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ร้อยละ 26.20 และฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ร้อยละ 100 เมื่อเชื้อแบคทีเรียสัมผัสกับสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์นาน 30 และ 60 นาที ตามลำดับ

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนต่อเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนต่อการทำลายเชื้อแบคทีเรียแอกกริเกทิ-แบกเทอร์แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ ที่จำนวนเชื้อเริ่มต้น 10^6 คอโลนี/มล. (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่าในเวลา 1 นาที สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลที่ความเข้มข้น 150 มก./มล. และคลอร์เฮกซิดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ร้อยละ 100 ในขณะที่สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลที่ความเข้มข้น 100 มก./มล. ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ร้อยละ 57.86 และฆ่าเชื้อได้ร้อยละ 100 เมื่อสัมผัสนาน 5 นาที ส่วนสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลที่ความเข้มข้น 50 มก./มล. สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ร้อยละ 18.65 และฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ร้อยละ 100 เมื่อสัมผัสกับเชื้อนาน 30 และ 60 นาที ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ผลของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียน (PG ที่ความเข้มข้น 50 100 และ 150 มก./มล.) และคลอร์เฮกซิดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรียสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์ ภายหลังการสัมผัสกับสารนาน 1 5 10 20 30 และ 60 นาที

Table 1 Effects of the polysaccharide gel extracted from durian fruit-hulls (50, 100 and 150 mg/ml PG) and 0.1% chlorhexidine on the number of *S. mutans* after exposure for 1, 5, 10, 20, 30 and 60 min

Incubation time (min)	Mean ± Standard Deviation (log_{10} CFU/ml)				
	Negative control	50 mg/ml PG	100 mg/ml PG	150 mg/ml PG	0.1% Chlorhexidine
1	6.05 ± 0.17	5.57 ± 0.10	0	0	0
5	6.00 ± 0.23	4.98 ± 0.14	0	0	0
10	5.60 ± 0.43	5.11 ± 0.07	0	0	0
20	5.75 ± 0.10	4.33 ± 0.39	0	0	0
30	5.93 ± 0.19	4.38 ± 0.03	0	0	0
60	5.80 ± 0.52	0	0	0	0

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียน (PG ที่ความเข้มข้น 50 100 และ 150 มก./มล.) และคลอร์เฮกซิดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรียแอกกริเกทิแบกเทอร์แอกทิโนไมซีเทมโคมิแทนส์ภายหลังการสัมผัสกับสารนาน 1 5 10 20 30 และ 60 นาที

Table 2 Effects of the polysaccharide gel extracted from durian fruit-hulls (50, 100 and 150 mg/ml PG) and 0.1% chlorhexidine on the number of *A. actinomycetemcomitans* after exposure for 1, 5, 10, 20, 30 and 60 min

Incubation time (min)	Mean ± Standard Deviation (log_{10} CFU/ml)				
	Negative control	50 mg/ml PG	100 mg/ml PG	150 mg/ml PG	0.1% Chlorhexidine
1	6.01 ± 0.18	6.01 ± 0.09	2.53 ± 0.47	0	0
5	6.18 ± 0.45	5.71 ± 0.32	0	0	0
10	5.92 ± 0.25	5.60 ± 0.25	0	0	0
20	6.19 ± 0.41	4.76 ± 0.34	0	0	0
30	6.03 ± 0.54	4.90 ± 0.05	0	0	0
60	6.10 ± 0.29	0	0	0	0

วิจารณ์

สารสกัดจากพืชสมุนไพรในประเทศไทยหลายชนิดได้รับการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งและการฆ่าเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันไปตามชนิดของสารสกัด อีกทั้งมีการนำผลที่ได้มาทดสอบในอาสาสมัครที่เป็นโรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบ เช่น สารสกัดจากฟ้าทะลายโจร[5-7] ใบข่อย[8] ใบฝรั่ง[9,10] เปลือกมังคุด[11,12] เป็นต้น

สำหรับการศึกษาผลการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียในช่องปากของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนนั้น ผกาวัลย์ มูสิกพงศ์ และคณะ[16] ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียน ด้วยวิธีบรอทไดลูชัน (broth dilution) โดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 1 5 10 15 20 และ 35 มก./มล. พบว่าในเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดที่ความเข้มข้น 20 และ 15 มก./มล. สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์และเชื้อแบคทีเรียแอกกริเกทิแบกเทอร์แอกทิโนไมซีเทม-คอมิแทนส์ ได้ตามลำดับ และเมื่อทดสอบต่อด้วยวิธีทดสอบแบบไทม์คิล โดยติดตามผลทุก 4 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 35 มก./มล. สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดที่มีปริมาณ 10^8 คอโลนี/มล. โดยใช้เวลาสั้นที่สุดคือ 4 ชั่วโมง คุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนจะแปรตามความเข้มข้นและเวลาที่เชื้อสัมผัสกับสารสกัด โดยยิ่งค่าของตัวแปรทั้งสองยิ่งมาก คุณสมบัติในการฆ่าเชื้อจะเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านมาเป็นระยะเวลาที่นานเกินกว่าจะนำมาใช้จริงทางคลินิก ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงต้องการหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ในระยะเวลาที่เหมาะสมกับการใช้ในช่องปาก เพื่อประโยชน์ในการนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางทันตกรรมต่อไป และผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่าในเวลาที่สั้นที่สุดคือ 1 นาที สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 150 มก./มล. สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้ และสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 100 มก./มล. สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์ และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแอกกริเกทิแบกเทอร์แอกทิโนไมซี-เทมคอมิแทนส์ได้

กลไกในการออกฤทธิ์ของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียนยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัด จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียนมีส่วนประกอบและโครงสร้างของน้ำตาลใกล้เคียงกับสารไคโตซาน ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย[19,20] และมีการนำมาเป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์หลายชนิด สารไคโตซานมีประจุบวกที่กลุ่มอะมิโน (amino group) ของสายพอลิเมอร์สามารถจับกับประจุลบที่ผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียในส่วนไลโปพอลิ-

แซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) กรดเทโคอิก (teichoic acid) กรดเทคูโรนิก (teichuronic acid) หรือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่แคปซูล (capsular polysaccharide) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการปล่อยให้สารและแร่ธาตุต่าง ๆ ผ่านเข้าออกจากเชื้อแบคทีเรีย มีผลให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ หรือไคโตซานอาจแทรกเข้าไปภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียและมีผลรบกวนการอ่านรหัสของยีน ทำให้ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย[19,21] โดยกลไกดังกล่าวเป็นเพียงส่วนหนึ่งเท่านั้น คาดว่าน่าจะมีกลไกอื่น ๆ อีก เช่น จากการศึกษาสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ในกลุ่มเพกติน (pectin) อีกชนิดหนึ่งคือ ยางอะคาเซีย *(Acacia Arabica* gum) ที่มีการใช้มาตั้งแต่อดีตในแถบทวีปแอฟริกาและเอเชีย ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการสร้างอาหารของเชื้อแบคทีเรีย และอาจแย่งจับกับโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เชื้อแบคทีเรียขาดอาหารจึงไม่สามารถเจริญเติบโตได้[22]

เชื้อแบคทีเรียในการศึกษาครั้งนี้มีความแตกต่างกัน เชื้อแบคทีเรียสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์เป็นชนิดแกรมบวก ส่วนนอกของเซลล์ที่หุ้มไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ไว้นั้น ประกอบไปด้วยชั้นผนังเซลล์ (cell wall) ที่หนา หุ้มชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ไว้ภายใน มีพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดที่มีกรดเทโคอิก และกรดไลโปเทโคอิก (lipoteicoic acid) แทรกอยู่ในชั้นผนังเซลล์ แตกต่างจากเชื้อแบคทีเรียแอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ซึ่งเป็นชนิดแกรมลบ ส่วนนอกของเซลล์ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) และชั้นใน (inner membrane) แทรกด้วยผนังเซลล์ที่บางกว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียชนิดแกรมบวก ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั้งสองชนิดจะประกอบไปด้วยโมเลกุลเพปทิโดไกลแคนส์ (peptidoglycans) ซึ่งประกอบด้วยโครงร่างสลับซับซ้อนของสายไกลแคนส์ (glycans) หลายสายที่ยึดกันด้วยสายเพปไทด์ (peptide) สั้น ๆ จึงมีความยืดหยุ่นและความแข็งแรงสูง ทำหน้าที่คงรูปและปกป้องแบคทีเรียจากการแตกเนื่องจากแรงดันของของเหลวในเซลล์ (osmotic pressure) กลไกในการออกฤทธิ์ของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียนจึงอาจเกิดจากปลายคาร์บอกซิล (carboxyl group) ที่มีประจุลบจับกับโมเลกุลของไกลแคนส์ในชั้นผนังเซลล์ หรือจับกับสายเพปไทด์ที่ยึดไกลแคนส์ไว้ ทำให้ผนังเซลล์สูญเสียคุณสมบัติในการคัดกรองสารที่จะผ่านเข้าสู่เซลล์ โมเลกุลส่วนที่เหลือของสารสกัดจึงสามารถผ่านเข้าในเซลล์ได้ เกิดการเสียสมดุลของเซลล์ แบคทีเรียจึงไม่สามารถเจริญเติบโตต่อได้หรือตายไป[23] สำหรับแบคทีเรียชนิดแกรมลบนั้น การผ่านเข้าออกของสารที่มีประจุจะยากกว่าชนิดแกรมบวก เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกจะประกอบไปด้วยฟอสฟอไลปิด (phospholipid) ที่คอยต้านการผ่านของสารที่มีประจุไม่ให้เข้าสู่เซลล์ อย่างไรก็ตามโมเลกุลขนาดใหญ่และสารที่มีประจุจะเคลื่อนผ่านเข้าในเซลล์ทางโปรตีนพอริน (porin) การออกฤทธิ์ของสารสกัดจึงอาจเกิดจากการที่กรดกาแลกทูโรนิก (galacturonic acid) ไปจับกับโปรตีนพอริน แล้วทำให้เปลี่ยนความสามารถในการคัดกรองสารของพอริน ยอมให้โมเลกุลน้ำตาลต่าง ๆ ผ่านเข้าในเซลล์ได้ ส่งผลรบกวนสมดุลของเซลล์แบคทีเรียและทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อได้หรือตายไป[24] นอกจากนี้สารคาร์โบไฮเดรตจากสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนและอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจทำให้แรงดันของของเหลวภายในเซลล์มีความเข้มข้นมากกว่าภายนอกเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้น้ำภายในเซลล์ไหลออกสู่ภายนอกหรือทำให้เซลล์แตกได้

อย่างไรก็ตาม ผลของการใช้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนต่อเชื้อแบคทีเรียในช่องปากมนุษย์จริงนั้นอาจไม่เป็นไปตามผลที่ได้จากห้องปฏิบัติการ เนื่องจากในช่องปากมีน้ำลายชะล้างสารต่าง ๆ ที่เข้ามาสัมผัส และลดความเข้มข้นของสารลง รวมทั้งไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ในน้ำลายจะจับกับสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนได้ ทำให้สารสกัดที่ใช้ไม่สามารถสัมผัสกับแบคทีเรียในช่องปากได้โดยตรงทั้งหมด รวมทั้งจากการที่เชื้อแบคทีเรียในช่องปากดำรงชีวิตอยู่ในรูปของไบโอฟิล์ม (biofilm) ซึ่งมีไกลโคแค็ลลิกซ์ (glycocalyx) คลุมที่ผิวป้องกันการผ่านเข้าออกของสารเคมี ประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพจึงลดลงเมื่อเข้าสู่ส่วนลึกจากผิวของไบโอฟิล์มซึ่งใกล้ผิวฟัน นอกจากนี้ไบโอฟิล์มยังมีการจัดระบบกำจัดสารเคมีที่มีประสิทธิภาพผ่านช่องทางลำเลียงที่ซับซ้อน[25] ทั้งหมดนี้อาจทำให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดลดลงได้ ดังนั้นการใช้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนในช่องปากจึงควรมีการศึกษาต่อไป

นอกจากนั้นการศึกษาในอนาคต ควรศึกษาหากลไกในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และผลของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ต่อแบคทีเรียในช่องปากชนิดอื่น ๆ เช่น พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส *(Porphylomonas gingivalis)* และแลคโตแบซิลลัส (Lactobacillus) ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในช่องปากเช่นกัน รวมทั้งศึกษาหาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างละเอียด (ultrastructure) ของเชื้อแบคทีเรียที่สัมผัสกับสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และส่องผ่าน (scanning and transmission electron microscopes) และควรมีการศึกษาว่าส่วนประกอบที่เป็นสารบริสุทธิ์ใดในเปลือกทุเรียน ที่เป็นส่วนออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย เพื่อจะได้สกัดสารในส่วนนั้นมาใช้ได้ในความเข้มข้นที่ต่ำสำหรับนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น ๆ ได้ในอนาคต นอกจากนี้อาจนำสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียนไปทดลองใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์สำหรับป้องกันโรคในช่องปาก เพื่อศึกษาประสิทธิผลของผลิตภัณฑ์ทางคลินิกต่อไป

สรุป

ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรียสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์ และแอกกริเกทิแบกเทอร์แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ ของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียน ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร และเวลาที่สารสัมผัสกับเชื้อแบคทีเรีย โดยสารสกัดที่ความเข้มข้น 150 มก./มล. และคลอร์เฮกซิดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ใช้เวลาในการฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดนาน 1 นาที ส่วนสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 มก./มล. ใช้เวลาในการฆ่าเชื้อชนิดแรกและชนิดที่สองนาน 1 และ 5 นาที ตามลำดับ โดยสารสกัดที่ความเข้มข้น 50 มก./มล. ใช้เวลาในการฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดนาน 60 นาที ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนอาจพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์หลักในผลิตภัณฑ์ทางทันตกรรมเพื่อควบคุมโรคฟันผุและโรคปริทันต์อักเสบ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ ทุนส่งเสริมการวิจัย ของเงินกองทุนเพื่อการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้เงินทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้ และศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุญาตให้ใช้เครื่องมือในการศึกษาครั้งนี้ ศ.(พิเศษ) ทญ.ดร.วิสาขะ ลิ่มวงศ์ และ รศ.ทญ.ดอลลี่ เมธาธราธิป สำหรับคำแนะนำโครงการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? Periodontol 2000. 1997;15:55-62.
2. Hildebrandt GH, Sparks BS. Maintaining mutans streptococci suppression with xylitol chewing gum. J Am Dent Assoc. 2000;131:909-16.
3. Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, Palmer JE, Faddy MJ, Seymour GJ. The effect of a triclosan-containing dentifrice on the progression of periodontal disease in an adult population. J Clin Periodontol. 2003;30:414-9.
4. Ciancio SG. Nonsurgical chemical periodontal therapy. Periodontol 2000. 1995;9:27-37.
5. Amornchat C, Kraivaphan P, Kraivaphan V, Triratana T. The antibacterial activity of *Andrographis paniculata* crude extracts on oral bacteria. J Dent Assoc Thai. 1991;41:178-85.
6. Atsawasuwan P, Sirirat M, Amornchat C, Yudhasaraprasithi S, Rassameemasmaung S, Rojanapanthu P, *et al.* Subgingival administration on *Andrographis paniculata* gel and metronidazole gel as adjunct in the treatment of adult periodontitis: clinical and microbiological effects. Mahidol J. 1998;5:97-101.
7. Sirirat M, Rojanapanthu P. The adjunctive use of *Andrographis paniculata* gel in periodontal treatment: report of 3 cases. Thai J Periodont. 2003-2004;1:44-53.
8. Taweechaisupapong S, Singhara S, Choopan T. Antimicrobial effect of *Streblus asper* leaf extract on selected anaerobic bacteria. J Dent Assoc Thai.

2002;52:227-34.

9. Kraivaphan P, Amornchat C, Triratana T. The effect of *Psidium guajava* and *Ficus religiosa* extracts against oral bacteria. J Dent Assoc Thai. 1992;42:176-82.
10. Kraivaphan V, Kraivaphan P, Amornchat C, Triratana T, Pobrurksa C. The clinical effect of a mouthrinse containing *Psidium guajava* extract on plaque formation. J Dent Assoc Thai. 1994;44:56-60.
11. Torrungruang K, Vichienroj P, Chutimaworapan S. Antibacterial activity of mangosteen pericarp extract against cariogenic *Streptococcus mutans.* CU Dent J. 2007;30:1-10.
12. Rassameemasmaung S, Sirikulsathean A, Amornchat C, Hirunrat K, Rojanapanthu P, Gritsanapan W. Effects of herbal mouthwash containing the pericarp extract of *Garcinia mangostana* L on halitosis, plaque and papillary bleeding index. J Int Acad Periodontol. 2007;9:19-25.
13. Pongsamart S, Sukrong S, Tawatsin A. The determination of toxic effects at a high oral dose of polysaccharide gel extracts from fruit-hulls of durian (*Durio zibethinus* L.) in mice and rats. Songklanakarin J Sci Technol. 2001;23:56-62.
14. Pongsamart S, Tawatsin A, Sukrong S. Long-term-consumption of polysaccharide gel from durian fruit-hull in mice. Songklanakarin J Sci Technol. 2002;24:649-61.
15. Lipipun V, Nantawanit N, Pongsamart S. Antimicrobial activity *(in vitro)* of polysaccharide gel from durian fruit-hulls. Songklanakarin J Sci Technol. 2002;24:31-8.
16. Musikapong P, Thunyakitpisal P, Pongsamart S. Antimicrobial activity of polysaccharide gel from durian fruit-halls against *Strptococcus mutans and Actinobacillus actinomycetemcomitans.* CU Dent J. 2005;28:137-44.
17. Pongsamart S, Panmuang T. Isolation of polysaccharides from fruit-hulls of durian (*Durio zibethinus* L.). Songklanakarin J Sci Technol. 1998;20:323-32.
18. Wood GL, Washington JA. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, editors. Manual of clinical microbiology. 6th ed. Washington DC: ASM Press, 1995:1327-41.
19. Muzzarelli R, Tarsi R, Filippini O, Giovanetti E, Biagini G, Varaldo PE. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. Antimicrob Agents Chemother. 1990;34:2019-23.
20. Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. Adv Drug Deliv Rev. 2004;56:1467-80.
21. Choi BK, Kim KY, Yoo YJ, Oh SJ, Choi JH, Kim CY. *In vitro* antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans and Streptococcus mutans.* Int J Antimicrob Agents. 2001;18:553-7.
22. Clark DT, Gazi MI, Cox SW, Eley BM, Tinsley GF. The effects of *Acacia arabica* gum on the *in vitro* growth and protease activities of periodontopathic bacteria. J Clin Periodontol. 1993;20:238-43.
23. el-Nakeeb MA, Yousef RT. Study of antimicrobial action of pectin. I. Antibacterial and antifungal activities of pectin. Planta Med. 1970;18:201-9.
24. Young DH, Köhle H, Kauss H. Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* cells. Plant Physiol. 1982;70:1449-54.
25. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002;28:12-55.

Polysaccharide gel from durian fruit-hull extracts: antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Thatsanee Saladyanant D.D.S., M.Sc.[1]
Naulchavee Hongprasong D.D.S., M.D.S., Diplomate, Thai Board of Periodontology[2]
Sunan Pongsamart B.Sc. (Pharmacy), Ph.D.[3]
Wandee Apinhasmit D.D.S., Ph.D.[4]
Pasutha Thunyakitpisal D.D.S., Ph.D.[4]

[1]Graduate Student, Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University
[2]Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University
[3]Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University
[4]Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

Abstract

Objective To study the antibacterial activity of polysaccharide gel extracted from durian fruit-hulls (PG) against *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* which are associated with the development of caries and periodontal disease, respectively.

Materials and methods An inhibitory activity of PG against *S. mutans* ATCC 25175 and *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 was determined by treated them with 50, 100 and 150 mg/ml of PG for 1, 5, 10, 20, 30 and 60 min in broth. Treated bacteria were subsequently cultured on agar for 48 hrs. Their survivals were evaluated in comparison with 0.1% chlorhexidine and the negative control group using the drop plate method.

Results At 1 min, 150 mg/ml of PG and 0.1% chlorhexidine had bactericidal activity against both *S. mutans* and *A. actinomycetemcomitans,* whereas 100 mg/ml of PG had bactericidal activity against *S. mutans* and inhibitory activity against *A. actinomycetemcomitans.* The bactericidal activity against both bacteria was shown after the incubation with 50 mg/ml of PG for 60 min.

Conclusion The bactericidal activities of 100 and 150 mg/ml of the PG in 1 min against both *S. mutans* and *A. actinomycetemcomitans,* respectively, suggest that the PG may be developed as an active ingredient in oral health care products to control caries and periodontal disease.

(CU Dent J. 2007;30:235-44)

Key words*: Aggregatibacter actinomycetemcomitans; antibacterial activity; durian fruit-hull; polysaccharide gel extract; Streptococcus mutans*