ผลของสารสกัดแทนนินจากเปลือก *Garcinia mangostana* L. และคลอเฮกซิดีนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

สิริรัตน์ บุญดิเรก* ปรมาภรณ์ จิ๋วพัฒนกุล แก้วมณี* ณัฐพล กิตติคุณเดชา**
ณภัทร บุนนาค* ดนุธิดา สาเขตร์**** สิริลักษณ์ ตีรณธนากุล***

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาผลการยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ของสารสกัดแทนนินจากเปลือกมังคุด เปรียบเทียบกับคลอเฮกซิดีนกลูโคเนตร้อยละ 0.12

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ: สกัดสารแทนนินจากเปลือกมังคุดโดยใช้เอทานอลร้อยละ 95 แล้วนำมาศึกษาชนิดด้วยวิธีทางเคมี หาปริมาณแทนนินด้วยวิธีวิเคราะห์เรเดียลดิฟฟิวชั่น จากนั้นทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ด้วยสารแทนนินเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอเฮกซิดีนกลูโคเนตร้อยละ 0.12 โดยวิธีดิสก์ดิฟฟิวชั่น

ผลการศึกษา: สารสกัดจากเปลือกมังคุดเป็นสารคอนเดนส์แทนนิน ที่มีความเข้มข้น 18.69 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารสกัดแทนนินมาทดสอบพบฤทธิ์ของการยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ซึ่งเพิ่มขึ้นตามปริมาณของสารแทนนิน โดยสารแทนนินเข้มข้น 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อสูงที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 19.1 ± 0.9 มิลลิเมตร แต่ต่ำกว่าผลทดสอบที่ได้จากสารละลายคลอเฮกซิดีนกลูโคเนตร้อยละ 0.12 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อเท่ากับ 19.9 ± 1.2 มิลลิเมตร

สรุป: สารสกัดแทนนินจากเปลือกมังคุดเข้มข้น 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ไม่ต่างจากผลการยับยั้งเชื้อของคลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

คำสำคัญ: คลอเฮกซิดีน ดิสก์ดิฟฟิวชั่น แทนนิน เปลือกมังคุด สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

Received Date: Dec 03, 2021
Revised Date: Mar 02, 2022
Accepted Date: Apr 11, 2022

**ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่ 114 สุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110*

***ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์และทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่ 114 สุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110*

****ศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เลขที่ 62 หมู่ 7 ถ.รังสิต-นครนายก ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ นครนายก 26120*

*****โรงพยาบาลธัญบุรี เลขที่ 140 ถนนรังสิต-นครนายก ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110*

Growth inhibitory effect of tannin extract from *Garcinia mangostana* L. peels and chlorhexidine on *Streptococcus mutans*

Sirirat Boondireke* Paramaporn Chiewpattanakul Kaewmanee* Nuttaphon Kittikundecha Napat Bunnag*** Danuthida Saket**** Siriluck Tiranathanagul***

Abstract

Objective: To study the effect of tannin, extracted from *Garcinia mangostana* L. peels, on growth inhibition of *Streptococcus mutans,* compared to 0.12% chlorhexidine gluconate.

Methods: Tannin was extracted from the *Garcinia mangostana* L. peels by using 95% ethanol as a solvent. Then, the type of tannin was examined using chemical reactions and the amount of tannin extract was determined using radial diffusion assay. Thereafter, the effect of different concentrations of tannin, i.e., 2, 4, 6, 8, 16 mg/ml, and 0.12% chlorhexidine gluconate, on the growth inhibition of *S. mutans* was studied using disk diffusion assay.

Results: The extractant from *Garcinia mangostana* L. peels was the condensed tannin, with its concentration of 18.69 mg/ml. It was found that the growth inhibitory effect of *S. mutans* increased, along with the increasing concentrations of tannin. Though, tannin at 16 mg/ml showed the most inhibitory effect against *S. mutans* according to its highest inhibition zone (19.1 ± 0.9 mm), it was lower than that of 0.12% chlorhexidine gluconate (19.9 ± 1.2 mm)

Conclusion: Tannin, 16 mg/ml, from the *Garcinia mangostana* L. peels had the growth inhibition effect of *S. mutans* but not statistically significant different from that of 0.12% chlorhexidine gluconate at 95% confidence level.

Keywords: Chlorhexidine, Disk diffusion, *Garcinia mangostana* L. peel, *Streptococcus mutans,* Tannin

**Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, 114 Sukhumvit 23 Rd, Wattana, Bangkok 10110 Thailand.*

***Department of Conservative Dentistry and Prosthodontics, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, 114 Sukhumvit 23 Rd, Wattana, Bangkok 10110 Thailand.*

****HRH Princess MahaChakri Sirindhorn Medical Center, 62 Moo 7 Ongkharak, Ongkharak District, Nakhon Nayok 26120.*

*****Thanyaburi Hospital, 140 Rangsit-Nakorn Nayok Rd, Rangsit, Thanyaburi District, Pathum Thani 12110.*

บทนำ (Introduction)

โรคฟันผุเป็นโรคติดเชื้อที่มีอุบัติการณ์การเกิดโรคมากที่สุด ทั้งในประเทศที่พัฒนาแล้วและประเทศที่กำลังพัฒนา โดยโรคฟันผุมีปัจจัยร่วมหลายสาเหตุที่ส่งผลทำให้เกิดโรค ได้แก่ ตัวบุคคล สภาพแวดล้อมในช่องปาก และเชื้อก่อโรค ซึ่งเชื้อก่อโรคที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคฟันผุ ได้แก่ สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) และแลคโตบาซิลลัสสปีชีส์ (*Lactobacillus* spp.) แบคทีเรียเหล่านี้ที่ก่อโรคฟันผุสามารถผลิตกรดซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของอาหารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต โดยกรดที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเข้าไปในชั้นของเคลือบฟันและเนื้อฟันทำให้เกิดการละลายแร่ธาตุแคลเซียมและฟอสเฟตที่อยู่ในฟันออกมาสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก เรียกกระบวนการนี้ว่ากระบวนการสลายแร่ธาตุ (demineralization) (1) ในขณะเดียวกันร่างกายของคนเราก็มีการตอบสนองต่อการสูญเสียแร่ธาตุในฟันโดยการที่มีแคลเซียมและฟอสเฟตซึ่งมีอยู่ในน้ำลาย ร่วมกับฟลูออไรด์ที่ช่วยให้เกิดการสร้างคริสตัล (crystals) ของเนื้อฟันใหม่ โดยที่ฟลูออไรด์ที่มีอยู่จะเข้าไปจับแคลเซียมไอออนและฟอสเฟตไอออน แล้วเกิดการตกตะกอนเป็นผลึกของฟลูออโรอพาไทต์ (fluorapatite) ที่มีความแข็งแรงเรียกกระบวนการนี้ว่าการคืนกลับแร่ธาตุ (remineralization) (1) ในสภาวะปกติกระบวนการสลายแร่ธาตุและการคืนกลับแร่ธาตุ จะเกิดขึ้นอย่างสมดุลจึงไม่ทำให้เกิดฟันผุ แต่เมื่อใดที่มีปริมาณของเชื้อในช่องปากมากจนทำให้กระบวนการสลายแร่ธาตุมากกว่ากระบวนการคืนกลับแร่ธาตุแล้ว ก็จะเกิดการสูญเสียแร่ธาตุในฟันออกไปจนเกิดเป็นลักษณะของฟันที่มีสีขาวขุ่น (white spot lesion) ซึ่งเป็นสัญญาณเริ่มแรกและเกิดเป็นรูของฟันผุถ้าไม่ได้รับการดูแลรักษา (2) แนวทางในการป้องกันโรคฟันผุในปัจจุบันมีหลายวิธี เช่น การใช้ฟลูออไรด์ การเคลือบหลุมร่องฟัน เป็นต้น (2) อีกหนึ่งวิธีที่สามารถลดการเกิดโรคฟันผุได้ คือ การยับยั้งและการลดปริมาณเชื้อก่อโรค ด้วยสารหลายประเภท ไม่ว่าจะเป็นสารสังเคราะห์ทางเคมีหรือสารสกัดจากธรรมชาติ (3) คลอเฮกซิดีนเป็นสารสังเคราะห์ทางเคมีที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อจุลชีพ (4) จากคุณสมบัตินี้ ทำให้คลอเฮกซิดีนถูกนำมาเป็นตัวเสริมในกระบวนการป้องกันฟันผุ โดยเฉพาะกับผู้ที่มีความเสี่ยงสูงในการเกิดฟันผุ จากการศึกษาพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดฟันผุร้อยละ 46 (95%CI = 35, 57) และมีคะแนนคุณภาพ (quality score) คือ ดี (good) (2) อีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถป้องกันการเกิดฟันผุได้ คือการนำสารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ มาใช้ จากการศึกษาพบว่าสมุนไพรมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ โดยใช้สารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ เช่น สายน้ำผึ้ง (honeysuckle) ดอกมะลิ (jasmine) ดอกเก๊กฮวย (juhua) ดอกลาเวนเดอร์ (lavender) ดอกกุหลาบ (rose) ดอกหอมหมื่นลี้ (osmanthus) โต่วต๋ง (duzhong) ชาเขียว (green tea) เจียวกู่หลาน (jiaogulan) ตะไคร้ (lemongrass) โรสแมรี่ (rosemary) (3) นอกจากนี้สารสกัดจากกาแฟและโกโก้ที่มีสารประกอบโพลีฟีนอล (polyphenol) ก็มีความสามารถในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียได้ (5) มีงานวิจัยที่แนะนำการป้องกันฟันผุจากการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรคเนื่องจากการใช้สารเคมีมีผลกระทบต่อร่างกายหลายอย่าง ไม่ว่าจะเป็นการรบกวนจุลชีพประจำถิ่นของช่องปากหรือการเป็นพิษต่อร่างกาย และทำให้เกิดอาการข้างเคียง (3,6) โดยมีผลข้างเคียงต่อฟันและเนื้อเยื่อในช่องปาก ในขณะที่สกัดจากพืชนั้นมาจากธรรมชาติซึ่งส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อในช่องปากน้อยกว่า (6) แทนนินเป็นหนึ่งในสารที่พบได้ในส่วนประกอบของพืชหลายชนิด เช่น ใบชา ใบฝรั่ง ใบพลู ใบชุมเห็ด ผลไม้ดิบ เช่น กล้วยดิบ เปลือกและเมล็ดของผลไม้ เช่น เปลือกมังคุด องุ่น เมล็ดของมะขาม เปลือกมะพร้าวอ่อน และในไวน์แดง (3) แทนนินหรือกรดแทนนิก (tannic acid) เป็นสารโพลีฟีนอลโมเลกุลใหญ่ที่สามารถละลายน้ำได้ มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{75}H_{52}O_{46}$ มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (glucose) 1 โมเลกุล และกรดแกลลิค (gallic acid) 9 โมเลกุล (7) โดยแทนนินมีสองประเภท ประเภทแรกคือ ไฮโดรไลซ์แทนนิน (hydrolysable tannin) ซึ่งเป็นแทนนินที่สามารถถูกแยกออกเป็นโมเลกุลเล็ก ๆ มีส่วนประกอบสำคัญคือกรดแทนนิก พบมากในส่วนใบ ฝัก และส่วนที่ปูดออกมาจากปกติของพืช (8,9) และประเภทที่สองคือ คอนเดนส์แทนนิน(condensed tannin) หรือ

เรียกว่า โปรแอนโทไซยานิดิน (proanthocyanidin) หรืออีกชื่อหนึ่งคือนอนไฮโดรไลซ์แทนนิน (non-hydrolysable tannin) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์โมโนเมอร์ (flavonoid monomers) (8) จะมีสารคาเทชิน (catechin) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ พบได้ในส่วนเปลือกต้นและแก่นไม้เป็นส่วนใหญ่ (9) การเกิดแทนนินยังสามารถเกิดได้จากปฏิกิริยาคอนเดนเซชัน (condensation) ของอนุพันธ์ของฟลาแวน (flavan) ซึ่งอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช นอกจากนั้นแทนนินยังสามารถเกิดได้จากการพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) ของควิโนน (quinone) (10) แทนนินมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกต่าง ๆ ของร่างกายหลายกลไก ไม่ว่าจะเป็นการกระตุ้นฟาโกไซติกเซลล์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (host-mediated antitumor activity) หรือการต้านทานการติดเชื้อ (11) โดยแทนนินจะสามารถรวมตัวกับโปรตีนโดยใช้พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ไฮโดรโฟบิกเอฟเฟ็กต์ (hydrophobic effect) หรือพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ได้ (11,12) กลไกการทำงานของแทนนินในการต้านทานเชื้อที่มีการศึกษาและให้ข้อสันนิษฐานไว้มี 3 กลไก ได้แก่ กลไกที่หนึ่ง คือการยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ (adherence of bacterial cell) โดยมีรายงานวิจัยผลของแทนนินซึ่งเป็นสารประกอบโพลีฟีนอล ว่าสามารถยับยั้งการเกาะติดของเชื้อจากกลไกที่สารโพลีฟีนอลเข้าจับกับบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส (dextran sucrase) และมิวแทนซูเครส (mutansucrase) ที่ตำแหน่งหมู่ -COOH ซึ่งให้ประจุบวก (13,14) จึงเกิดการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส ในการสังเคราะห์กลูแคนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เดกซ์แทรน (dextran) และมิวแทน (mutan) จากซูโครส (sucrose) (15) ซึ่งปกติเชื้อสเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์จะสังเคราะห์กลูแคนแล้วหลั่งออกมาเพื่อนำไปใช้ในการเกาะติดแบบครอสลิงค์ (cross-linking) กับโฮสท์เซลล์ ดังนั้นการยับยั้งการเกาะติดของเชื้อเกิดขึ้นได้จากการยับยั้งการทำงานของเดกซ์แทรนซูเครส กลไกที่สอง คือ การยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานซ์เฟอเรส (glucosyltransferase, GTF) ซึ่งมีหน้าที่ย้ายหน่วยกลูโคสจากซูโครสเพื่อสังเคราะห์กลูแคน โดยเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติของกลูโคซิลทรานซ์เฟอเรส คือ เดกซ์แทรนซูเครสและมิวแทนซูเครสซึ่งมีหมู่ -COOH ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ โดยเดกซ์แทรนซูเครสมีคุณสมบัติเป็น GTF-soluble มีหน้าที่สังเคราะห์เดกซ์แทรน ซึ่งเป็นกลูแคนที่ละลายน้ำ ส่วนเอนไซม์มิวแทนซูเครส มีคุณสมบัติเป็น GTF-insoluble มีหน้าที่สังเคราะห์มิวแทน ซึ่งเป็นกลูแคนที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นโมเลกุลของโพลีฟีนอลจึงสามารถเข้าจับและขัดขวางกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานซ์เฟอเรส (13) ซึ่งทำหน้าที่สำคัญเป็นกลูแคนซูเครส ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของซูโครส (16) ทำให้เชื้อไม่สามารถย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพื่อสร้างพลังงาน ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์ (13) กลไกที่สาม คือ ฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพ (antimicrobial activity) เกิดขึ้นเมื่อมีการเข้าจับของสารโพลีฟีนอล แล้วสร้างคอมเพล็กซ์กับโปรตีนและโพลีแซคคาไรด์บนผิวเซลล์ (11,17) ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของโมเลกุลบนผิวเซลล์ โดยสามารถยับยั้งเอนไซม์ที่เกาะอยู่ด้านนอกผิวเซลล์ (envelope transport proteins) รวมทั้งแอดฮีซิน (adhesins) ของเซลล์แบคทีเรีย (8,17) ซึ่งนอกจากนี้ ยังมีผลให้การซึมผ่านของสารจำพวกไอออน (ions) โปรตอน (protons) และสารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน ลดลง (18) โดยเฉพาะการสร้างคอมเพล็กซ์ของสารโพลีฟีนอล กับไอออนของโลหะหรือสารโมเลกุลใหญ่จะมีผลกระทบทำให้มีปริมาณไอออนโลหะและสารที่จำเป็นลดลง ซึ่งสารเหล่านี้จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย (8,19) ดังนั้น จึงเป็นกลไกสำคัญในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัสมิวแทนส์ โดยความสามารถในการยับยั้งจะมีมากขึ้นเมื่อเกิดการสร้างคอมเพล็กซ์ที่มีขนาดใหญ่ นอกจากนี้ยังมีการทดลองที่แสดงว่า แทนนินและองค์ประกอบของแทนนินหรืออนุพันธ์สามารถจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียบางชนิดได้ มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (antibacterial activity) (7) และยับยั้งกระบวนการสลายโปรตีน (antiprotease activity) ของแบคทีเรียได้ (8,20) และนอกจากนี้แทนนินเป็นหนึ่งในสารสกัดจากพืชที่มีงานวิจัยพิสูจน์ถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคฟันผุ (18)

ทางคณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคฟันผุของแทนนินที่สกัดจากเปลือก

มังคุด ซึ่งจัดเป็นพืชไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีมากในประเทศไทย จึงนำมาศึกษาวิจัยถึงประสิทธิภาพของสารสกัดแทนนินจากเปลือกมังคุด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคฟันผุ โดยเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของสารละลายคลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.12

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)

1. การสกัดแทนนินจากเปลือกมังคุด

หั่นเปลือกมังคุดสดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปตากแดดจนแห้งสนิท โดยทำการชั่งน้ำหนักเปลือกมังคุดซ้ำต่อเนื่อง 2 วัน และน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง จึงนำเปลือกมังคุดแห้งที่ได้มาเข้าเครื่องปั่น ทำการปั่นจนได้ผงเปลือกมังคุดหยาบ แล้วนำมาบดละเอียดโดยใช้โกร่งบดยา ผสมผงเปลือกมังคุดบดละเอียดปริมาณ 100 กรัม กับเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไปต้มในอ่างต้มน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองสารละลายที่ได้ด้วยการดาษกรองวอทแมน เบอร์1 (whatman filter paper, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) หลังจากนั้น นำสารละลายที่ได้จากการกรองมาตั้งทิ้งไว้ให้ระเหยที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 สัปดาห์ จนได้ผลึกของสารสกัดจากเปลือกมังคุด (21)

2. การทดสอบชนิดของแทนนินโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี

ละลายสารสกัดที่ได้จากข้อ 1 ปริมาณ 1.13 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 125 มิลลิลิตร และเติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ร้อยละ 10 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 แล้วนำสารที่ผ่านการกรองมาทดสอบโดยแบ่งสารสกัดออกเป็น 3 หลอด หลอดที่ 1 ทดสอบด้วยเฟอร์ริกคลอไรด์ (ferric chloride) ร้อยละ 1 ปริมาณ 2-3 หยด หลอดที่ 2 ทดสอบด้วยน้ำปูนใส (lime water) 5 มิลลิลิตร และหลอดที่ 3 ไม่ใส่สารใด ๆ เพิ่มเติม เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุม โดยผลจากการทดสอบแทนนินชนิดคอนเดนส์แทนนิน จะให้สีเขียวกับเฟอร์ริกคลอไรด์และไม่พบการตกตะกอนกับน้ำปูนใส ส่วนแทนนินชนิดไฮโดรไลซ์แทนนิน จะให้สีน้ำเงินดำกับเฟอร์ริกคลอไรด์ และให้ตะกอนสีน้ำเงินเหลือบเทากับน้ำปูนใส (22)

3. การทดสอบหาปริมาณแทนนินด้วยวิธีวิเคราะห์เรเดียลดิฟฟิวชั่น (radial diffusion assay)(23) (ดัดแปลงจาก Hagerman AE. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. J Chem Ecol. 1987;13(3):437-49.)

3.1 การเตรียมเพลทสำหรับการทดสอบ

เติมผงวุ้น 1 กรัมในบัฟเฟอร์ (glacial acetic acid 0.29%v/v และ ascorbic acid 1.07%v/v ในน้ำกลั่น pH 5.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยอุ่นให้ร้อนและคนจนละลายหมด ตั้งสารละลายที่ได้ในอ่างอังไอน้ำ 45 องศาเซลเซียส คนเป็นระยะ ๆ แล้วเติม Bovine serum albumin (Difco & BBL, USA) ปริมาณ 0.1 กรัม คนจนละลายหมด ก่อนเทสารละลาย 19 มิลลิลิตร ใส่แต่ละเพลท รอจนแข็งตัวแล้วเจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จากนั้นห่อปิดด้วยพาราฟิล์ม เก็บเพลทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2 การวิเคราะห์เรเดียลดิฟฟิวชั่น

นำกรดแทนนิกมาตรฐาน (Merck, Germany) มาเตรียมให้มีความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เอทานอลร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย สำหรับการเตรียมสารสกัดเพื่อหาปริมาณแทนนิน ทำโดยชั่งผงสารสกัดเปลือกมังคุดที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ปริมาณ 1 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต้มอุ่นในอ่างอังไอน้ำ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 8 มิลลิลิตร นำมากรองตะกอนด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) หลังจากนั้นหยดสารสกัดแทนนิน และกรดแทนนิกมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นลงในเพลทที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 หลุมละ 15 ไมโครลิตร นำเพลทไปอบในตู้ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงที่เกิดขึ้นและนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของแทนนินในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงเทียบหาปริมาณแทนนินที่สกัดได้โดยใช้กราฟมาตรฐาน

4. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ด้วยวิธีการดิสก์ดิฟฟิวชั่น

4.1 การเตรียมสารสกัดแทนนิน

นำสารสกัดจากเปลือกมังคุดมาละลายในเอทานอลร้อยละ 95 ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแทนนินที่ 18.69 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางต่อด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ให้ได้ความเข้มข้นของแทนนินเท่ากับ 2, 4, 8, 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

4.2 การเตรียมเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

นำเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ที่ได้ความอนุเคราะห์จากภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Mueller Hinton broth (Difco & BBL, USA) โดยบ่มในตู้อบเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อมาแขวนลอยในอาหารเหลวใหม่ ให้ได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 0.5 Mcfarland Standard โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งแข็งชนิด Mueller Hinton Agar (Difco & BBL, USA)

4.3 การทดสอบฤทธิ์ของแทนนินในการยับยั้งเชื้อด้วยวิธีการดิสก์ดิฟฟิวชั่น (disk-diffusion)

ทำการทดสอบโดยวิธีดิสก์ดิฟฟิวชั่น นำสารแทนนินที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว และวางทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงเพื่อให้เอทานอลร้อยละ 95 ซึ่งเป็นตัวทำละลายระเหยออกจนหมด หลังจากนั้นนำแผ่นกระดาษกรองวางลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 4.2 โดยมีคลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.12 เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก และเอทานอลร้อยละ 95 เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผลความสามารถในการต้านเชื้อโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อ (clear zone) โดยทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย (mean ± SD)

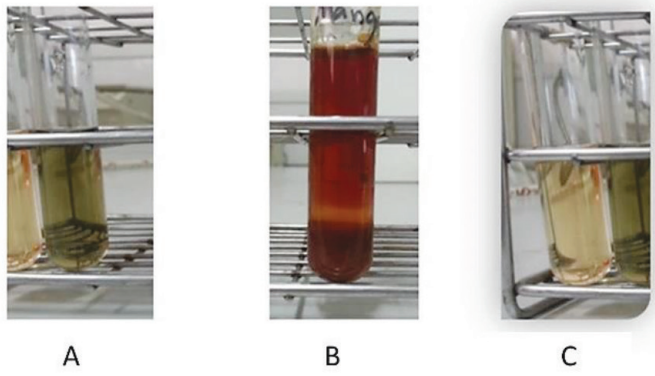
5. การทดสอบทางสถิติ

ทำการทดสอบทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างผลการยับยั้งเชื้อ (mean ± SD) ของสารสกัดแทนนินที่ได้จากเปลือกมังคุด ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 2, 4, 8, 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับคลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.12 ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 9.3.1 ด้วยสถิติ Independent t-test ที่ $p\text{-value} < 0.05$ แสดงถึงความมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลอง (Results)

1. ผลการทดสอบชนิดแทนนินที่สกัดได้จากเปลือกมังคุด

จากการทดสอบชนิดของแทนนินด้วยเฟอร์ริกคลอไรด์ร้อยละ 1 พบการตกตะกอนเป็นสีเขียว และการทดสอบด้วยน้ำปูนใสไม่พบการตกตะกอนสีน้ำเงินเหลือบเทา ดังแสดงในรูปที่ 1A และ B แสดงให้เห็นว่าแทนนินที่สกัดได้จากเปลือกมังคุดเป็นชนิดคอนเดนส์แทนนิน

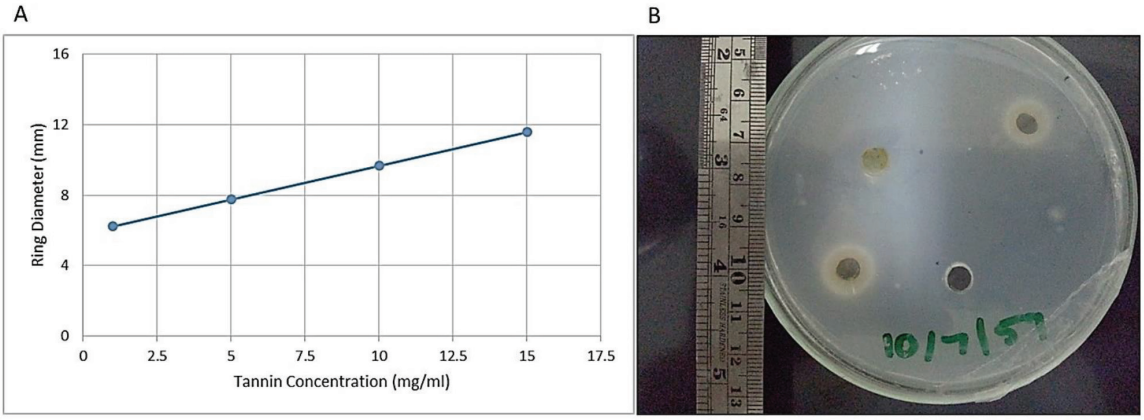


รูปที่ 1 ผลการทดสอบหาชนิดของแทนนินด้วยวิธีทางเคมีโดยการทำปฏิกิริยากับ A) เฟอร์ริกคลอไรด์ร้อยละ 1, B) น้ำปูนใส และ C) ไม่เติมสารทดสอบ (หลอดควบคุม)

Fig. 1 Chemical test results for the determination of tannin by using A) 1% ferric chloride, B) lime water and C) without reaction (control).

2. ผลการทดสอบหาปริมาณแทนนินด้วยการวิเคราะห์เรเดียลดิฟฟิวชั่น

รูปที่ 2 แสดงผลการทดสอบของปริมาณแทนนินโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงที่เกิดขึ้น (ring diameter) แล้วสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของแทนนินในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูป 2A) และหลังการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงที่เกิดขึ้นจากการทดสอบ (รูป 2B) แล้วเทียบหาปริมาณแทนนินจากกราฟมาตรฐาน โดยใช้สมการ y = 0.383x + 5.8405 ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของแทนนินที่สกัดได้จากเปลือกมังคุด (x) = 18.69 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

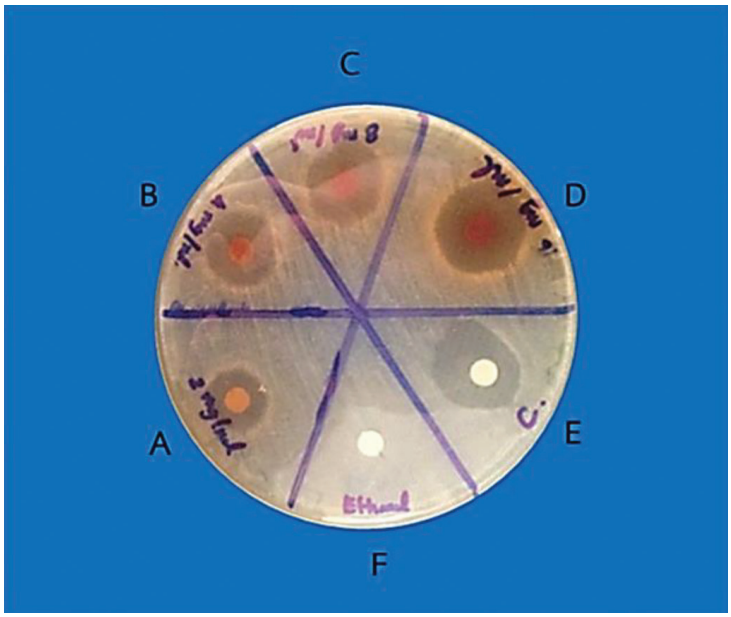


รูปที่ 2A) กราฟมาตรฐานของสารแทนนินตามความเข้มข้นและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงที่เกิดขึ้นและ B) ลักษณะของวงที่เกิดขึ้นในการศึกษาปริมาณสารสกัดแทนนินจากเปลือกมังคุด

Fig. 2A) The standard curve of tannin showing the increasing concentrations and ring diameters and B) the formed rings of tannin extracted from *Garcinia mangostana* L. peels.

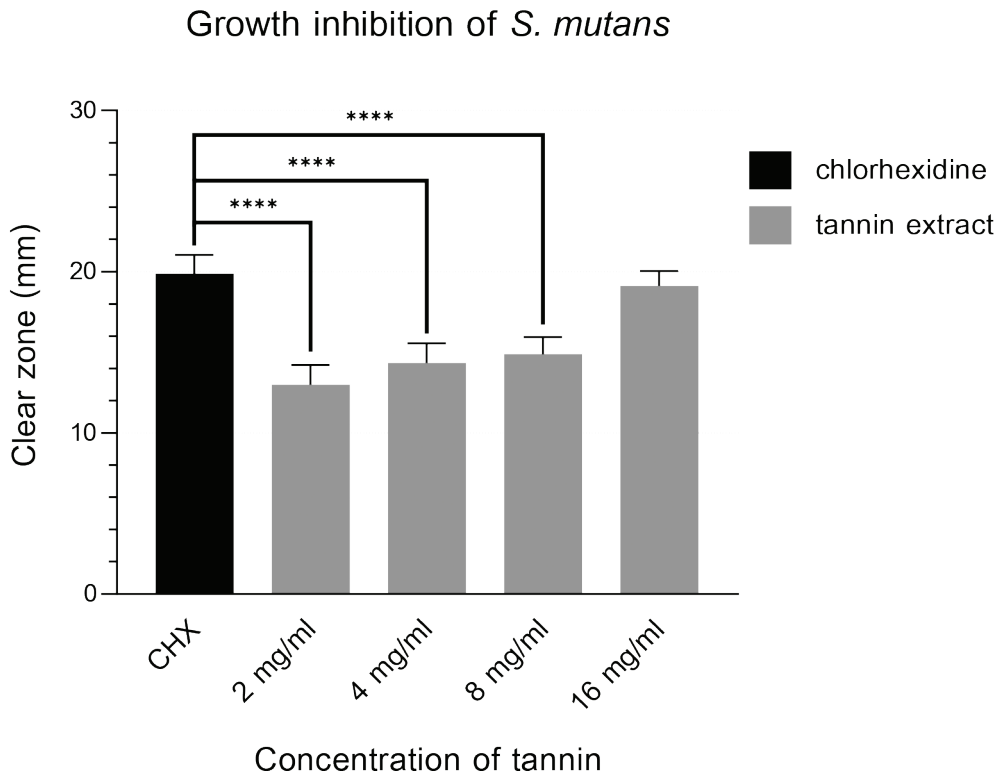
3. ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อด้วยวิธีการดิสก์ดิฟฟิวชั่น

ผลการยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ของแทนนินจากเปลือกมังคุด ที่มีความเข้มข้นของแทนนิน 2, 4, 8, 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.12 และเอทานอลร้อยละ 95 วัดได้จากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อ ดังผลที่แสดงในรูปที่ 3 และกราฟที่แสดงในรูปที่ 4 โดยแทนนินที่สกัดได้จากเปลือกมังคุดมีค่าเฉลี่ยการยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์เท่ากับ 13 ± 1.2, 14.3 ± 1.2, 14.9 ± 1.1 และ 19.1 ± 0.9 มิลลิเมตรตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น และค่าเฉลี่ยการยับยั้งเชื้อของคลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.12 มีค่าเท่ากับ 19.9 ± 1.2 มิลลิเมตร ซึ่งสูงที่สุด ขณะที่เอทานอลร้อยละ 95 ไม่พบบริเวณการยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์



รูปที่ 3 ผลการยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ของแทนนินจากเปลือกมังคุดที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (A), 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (B), 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (C), 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (D), คลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.12 (E), และเอทานอลร้อยละ 95 (F).

Fig. 3 Inhibitory effect of tannin from *Garcinia mangostana* L. peels at concentrations of 2 mg/ml (A), 4 mg/ml (B), 8 mg/ml (C), 16 mg/ml (D), 0.12% chlorhexidine (E) and 95% ethanol (F) on *S. mutans*.



**** means statistically significant difference compared to chlorhexidine at P < 0.0001

รูปที่ 4 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง (mean ± SD) ในการยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ของแทนนินจากเปลือกมังคุดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับคลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.12

Fig. 4 The mean diameters (mean ± SD) in *S. mutans* inhibition by tannins from *Garcinia mangostana* L. peels at various concentrations, compared to the 0.12% chlorhexidine.

4. ผลการทดสอบทางสถิติ

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ของสารสกัดแทนนินจากเปลือกมังคุดที่ความเข้มข้น 2, 4 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อ 13 ± 1.2, 14.3 ± 1.2 และ 14.9 ± 1.1 มิลลิเมตร ตามลำดับมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับคลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.12 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อ 19.9 ± 1.2 มิลลิเมตร ที่ p-value < 0.0001 ในขณะที่สารสกัดแทนนินที่ความเข้มข้น 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อ 19.1 ± 0.9 มิลลิเมตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับผลการยับยั้งเชื้อของคลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.12 (รูปที่ 4)

บทวิจารณ์ (Discussion)

แทนนินเป็นสารที่พบได้จากพืชหลากหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นเปลือกมังคุด เปลือกกล้วยหอม หรือใบชา โดยพบว่ามีหลากหลายวิธีที่สามารถใช้ในการสกัดแทนนินจากพืช ไม่ว่าจะเป็นการสกัดด้วยน้ำ เอทานอล หรืออะซีโตน และอีกหลากหลายวิธี ยกตัวอย่างเช่น จากการทดลองของ Sung และคณะ ในปี 2012 เมื่อทำการสกัดแทนนินจากชาเขียวด้วยเอทานอล พบว่าให้ปริมาณสารสกัดแทนนินสูงที่สุด (21) ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงเลือกวิธีการดังกล่าวในการทดลอง โดยจากการทดสอบแทนนินที่สกัดได้จากเปลือกมังคุดนั้นพบว่าเป็นชนิดคอนเดนส์แทนนิน ในปี 1999 Cowan ได้กล่าวถึงผลการยับยั้งเชื้อของสารสกัดแทนนินหรืออนุพันธ์ซึ่งรวมถึงโพลีฟีนอล คาเทชิน ควิโนน และฟลาโวน (flavone) ซึ่งมีผลยับยั้งไวรัสและแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เช่น วิบริโอ คอเลอเร (*Vibrio cholerae*), ชิเกลล่า (*Shigella*), สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ และเชื้ออื่น ๆ (8) อย่างที่ทราบกันดีว่าเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์เป็นแบคทีเรียชนิดสำคัญที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุด้วยกลไกการสร้างกรดแลคติกมาทำลายโครงสร้างของฟันเกิดเป็นฟันผุขึ้น ดังนั้นการกำจัดเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ จึงเป็นหนึ่งในวิธีที่สามารถป้องกันการเกิดฟันผุได้ มีการวิจัยพบว่าแทนนินที่สกัดจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งไบโอฟิล์มของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์และเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส (*Porphyromonas gingivalis*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคฟันผุและเหงือกอักเสบในช่องปาก (24) นอกจากแทนนินที่สกัดได้จากเปลือกมังคุดแล้ว ยังมีงานวิจัยที่รายงานว่าแทนนิน รวมทั้งสารอนุพันธ์ เช่น โพลีฟีนอล ที่สกัดได้จากพืชหลากหลายชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ได้เช่นกัน (25-27) และมีรายงานพบว่าสารคาเทชิน มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด โดยเฉพาะความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์กลูโคซิลทรานส์เฟอเรสของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ (28,29) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ ที่เป็นสาเหตุนำไปสู่โรคฟันผุ โดยผลการยับยั้งคาดว่าเกิดจากการที่สารสร้างพันธะกับโปรตีนได้เป็นคอมเพล็กซ์ (8) จึงเป็นการขัดขวางกระบวนการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว จึงมีผลกับการสร้างพลังงานและการเจริญของเชื้อ สารสกัดแทนนินหรืออนุพันธ์ยังสามารถยับยั้งกระบวนการอื่นๆ ของเชื้อได้จากการสร้างคอมเพล็กซ์กับเอนไซม์นอกผิวเซลล์ (envelope transport proteins) รวมทั้งแอดฮีซิน (adhesins) และโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) นอกจากนี้ มีการวิจัยพบร้อยละการลดลงของการผุตามร่องฟัน (fissure caries) ร้อยละ 40 ที่เกิดจากเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคาเทชินร้อยละ 0.1 เป็นส่วนประกอบ (30) ในปี 2012 ตรีสุวรรณและคณะ (27) พบว่าสารสกัดโพลีฟีนอลจากเปลือกมังคุดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญคือ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อคือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปัจจุบันคลอเฮกซิดีนเป็นสารที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในการลดปริมาณเชื้อในช่องปาก แต่ด้วยผลข้างเคียงของการใช้ ไม่ว่าจะเป็นการติดสีที่ตัวฟันหรือเนื้อเยื่อในช่องปาก การเปลี่ยนแปลงการรับรสหรือการหลุดลอกของเนื้อเยื่อในช่องปาก (4) ปัจจุบันจึงมีงานวิจัยที่มุ่งเน้นหาสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อในช่องปากได้โดยมีผลข้างเคียงที่น้อยลง ซึ่งแทนนินก็เป็นหนึ่งในสารสกัดจากธรรมชาติที่มีงานวิจัยหลากหลายกล่าวถึง อย่างไรก็ตาม การนำแทนนินมาใช้ในการลดปริมาณเชื้อในช่องปากนั้น ยังไม่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งได้นำมาสู่ความสนใจของผู้วิจัยในการศึกษาการใช้แทนนินในการกำจัดเชื้อในช่องปาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคฟันผุในช่องปากที่สำคัญ โดยเปรียบเทียบระหว่างผลการยับยั้งเชื้อของแทนนินกับคลอเฮกซิดีนซึ่งเป็นสารเคมีที่นิยมใช้สำหรับการฆ่าเชื้อในช่องปากในปัจจุบัน โดยในงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่มีการเปรียบเทียบผลของการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์กับคลอเฮกซิดีนหรือสารเคมีตัวอื่น ๆ จากผลการทดลองของคณะผู้วิจัยทำให้พบว่าสารสกัดแทนนินจากเปลือกมังคุดที่ความเข้มข้น 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

มีผลในการยับยั้งเชื้อ สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ ไม่แตกต่างกับคลอเฮกซิดีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95

แม้ว่าคลอเฮกซิดีนเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อในช่องปากที่ดี แต่มีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์หลายประการ ดังนั้นจึงเป็นแนวทางในการพัฒนาการใช้สารสกัดแทนนินเพื่อเสริมหรือทดแทนฤทธิ์การยับยั้งเชื้อของคลอเฮกซิดีนและลดผลข้างเคียง ซึ่งแนวทางดังกล่าวยังจำเป็นต้องได้รับการศึกษาต่อไปในอนาคต โดยการนำสารทั้งสองชนิดมาทดสอบเพื่อศึกษาฤทธิ์ร่วมในการยับยั้งเชื้อเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ หากผลในการศึกษาพบว่าเมื่อใช้สารทั้งสองชนิดร่วมกันแล้วสามารถเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ จึงสามารถนำสารสกัดแทนนินมาใช้ทดแทนหรือเสริมฤทธิ์ของคลอเฮกซิดีนได้ นอกจากนี้แทนนินมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาต่อไปด้วยเช่นกัน

บทสรุป (Conclusions)

จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า แทนนินที่ได้จากการสกัดเปลือกมังคุดด้วยเอทานอลเป็นแทนนินชนิดคอนเดนส์แทนนิน โดยสารสกัดแทนนินที่ความเข้มข้นที่ 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ (ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อเท่ากับ 19.1 ± 0.9 มิลลิเมตร) ไม่แตกต่างจากคลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.12 (ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อเท่ากับ 19.9 ± 1.2 มิลลิเมตร)

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ผลประโยชน์ทับซ้อน (Conflicts of Interest)

งานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อนกับองค์กรใด ๆ

เอกสารอ้างอิง (References)

1. Featherstone JD. Dental caries: a dynamic disease process. Aust Dent J. 2008;53(3):286-91.

2. Rozier RG. Effectiveness of methods used by dental professionals for the primary prevention of dental caries. J Dent Educ. 2001; 65(10):1063-72.

3. Tsai TH, Tsai TH, Chien YC, Lee CW, Tsai PJ. *In vitro* antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. Food Chem. 2008;110(4): 859-64.

4. Lim KS, Kam PC. Chlorhexidine-pharmacology and clinical applications. Anaesth Intensive Care. 2008;36(4):502-12.

5. Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, De Natale A, Pollio A. Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). Fitoterapia. 2009;80(5):255-62.

6. Bhardwaj A, Bhardwaj SV. Role of medicinal herbs in prevention and treatment of dental diseases. Annals Ayurvedic Med. 2012;1(3):95-101.

7. Pornchaloempong P, Rattnaapnone N. Tannin [Internet]. Bangkok: Food Network Solution; 2010 [cited 2021 Oct 27] Available from: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2376.

8. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agent. Clin Microbiol Rev. 1999;12(4):564-82.

9. Akiyama H, Fujii K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus.* J Antimicrob Chemother. 2001;48(4):487-91.

10. Geissman TA. Chapter X - flavonoid compounds, tannins, lignins and, related compounds. In: Florkin M, Stotz EH, editors. Comp Biochem. 9. NewYork: Elsevier; 1963. p. 213-50.

11.Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. J Nat Prod. 1996;59(2):205-15.

12. Stern JL, Hagerman AE, Steinberg PD, Mason PK. Phlorotannin-protein interactions. J Chem Ecol. 1996;22(10):1887-99.

13. Goyal D, Sharma S, Mahmood A. Inhibition of dextransucrase activity in *Streptococcus mutans* by plant phenolics. Indian J Biochem Biophys. 2013;50(1):48-53.

14. Monchois V, Willemot RM, Monsan P. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. FEMS Microbiol Rev. 1999;23(2):131-51.

15. Xu RR, Yang WD, Niu KX, Wang B, Wang WM. An Update on the evolution of glucosyltransferase (Gtf) genes in Streptococcus. Front Microbiol. 2018;9:2979. doi.org/10.3389/fmicb.2018.02979.

16. Ito K, Ito S, Shimamura T, Weyand S, Kawarasaki Y, Misaka T, et al. Crystal structure of glucansucrase from the dental caries pathogen *Streptococcus mutans.* J Mol Biol. 2011;408(2): 177-86.

17. Smullen J, Koutsou GA, Foster HA, Zumbe A, Storey DM. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans.* Caries Res. 2007;41(5): 342-9.

18. Sieniawska E, Baj T. Tannins. In: Badal S, Delgoda R, editors. Pharmacognosy. Boston: Academic Press; 2017. p. 199-232.

19. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry. 1991;30(12):3875-83.

20. Jones GA, McAllister TA, Muir AD, Cheng KJ. Effects of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. Appl Environ Microbiol. 1994;60(4):1374-8.

21. Sung SH, Kim KH, Jeon BT, Cheong SH, Park JH, Kim DH, et al. Antibacterial and antioxidant activities of tannins extracted from agricultural by-products. J Med Plants Res. 2012;6(15):3072-9.

22. Piriyasopakul T, Wacharachaisurapol N. Development of determination method for total tannins in medical plants [special project, Pharm.D.]. Bangkok: Mahidol University; 2002.

23. Hagerman AE. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. J Chem Ecol. 1987;13(3):437-49.

24. Widyarman AS, Lay SH, Wendhita IP, Tjakra EE, Murdono FI, Binartha CTO. Indonesian Mangosteen fruit (*Garcinia mangostana* L.) peel extract inhibits *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis* in biofilms In *vitro.* Contemp Clin Dent. 2019;10(1):123-8.

25. Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A. Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: A review. Molecules. 2011;16(2):1486-507.

26. Wu-Yuan CD, Chen CY, Wu RT. Gallotannins inhibit growth, water-insoluble glucan synthesis, and aggregation of mutans streptococci. J Dent Res. 1988;67(1):51-5.

27. Treesuwan P, Juntavee A, Rattanathongkom A, Peerapattana J, Nualkaew N, Chatchiwiwatana S. Inhibitory effects of polyphenol from mangosteen extracts on *Streptococcus mutans in vitro.* Isan J Pharm Sci. 2012;8(1):221-6.

28. Xu X, Zhou XD, Wu CD. The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans.* Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(3):1229-36.

29. Nakahara K, Kawabata S, Ono H, Ogura K, Tanaka T, Ooshima T, et al. Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glycosyltransferases of mutans Streptococci. Appl Environ Microbiol. 1993;59(4):968-73.

30. Ooshima T, Minami T, Aono W, Izumitani A, Sobue S, Fujiwara T, et al. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. Caries Res. 1993;27(2):124-9.

ติดต่อบทความ:
ผศ.ดร.ทพญ.สิริลักษณ์ ตีรณธนากุล
ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่ 114 สุขุมวิท 23
เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110
โทรศัพท์: 02-6495000 ต่อ 15126
อีเมล์ siriluk@m.swu.ac.th

Corresponding author:
Assist.Prof.Dr.Siriluck Tiranathanagul
Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, 114 Sukhumvit 23 Rd, Wattana, Bangkok 10110 Thailand.
Tel: (662) 6495000 ext. 15126
E-mail: siriluk@m.swu.ac.th