ผลการต้านเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และ เชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน

นางสาวรัชนู รูปทรง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปริทันตศาสตร์ ภาควิชาปริทันตวิทยา
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE ANTIMICROBIAL EFFECT AGAINST *Porphyromonas gingivalis* AND *Prevotella intermedia* OF MOUTHRINSE CONTAINING THE EXTRACTED POLYSACCHARIDE FROM DURIAN FRUIT-HALLS.

Miss RUTCHANOO ROOBSONG

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences Program in Periodontics
Department of Periodontology
Faculty of Dentistry
Chulalongkorn University
Academic Year 2010
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลการต้านเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และ เชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน
โดย	นางสาวรัชนู รูปทรง
สาขาวิชา	ปริทันตศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง นวลฉวี หงษ์ประสงค์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ จินตกร คูวัฒนสุชาติ

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง วัชราภรณ์ ทัศจันทร์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. จันทรกร แจ่มไพบูลย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง นวลฉวี หงษ์ประสงค์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ จินตกร คูวัฒนสุชาติ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. พสุธา ธัญญะกิจไพศาล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์(คลินิก)ทันตแพทย์หญิง มัลลิกา ศิริรัตน์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รัชนู รูปทรง : ผลการต้านเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และ เชื้อพรีโวเทลลาอินเตอร์มีเดียของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน.(The antimicrobial effect against *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* of mouthrinse containing the extracted polysaccharide from durian fruit-hulls) **อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ทพญ.นวลฉวี หงษ์ประสงค์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.ทพ. จินตกร คูวัฒนสุชาติ,46 หน้า.**

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลการยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรียพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ในห้องปฏิบัติการ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา ทดสอบการยับยั้งเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สายพันธุ์ ATCC 33277และพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย สายพันธุ์ ATCC 25611 ด้วยวิธีดิสดิฟฟิวชั่น และวิเคราะห์การทำลายเชื้อแบบไทม์คิลล์ โดยเก็บผลที่ 30 วินาที 1 และ 3 นาที ทำการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิต เปรียบเทียบกับน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.1และน้ำเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ0.9

ผลการศึกษา เมื่อนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดจากเปลือกทุเรียนมีประสิทธิภาพต้านเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.001$)เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเกลือ โดยทำให้เกิดบริเวณยับยั้งเชื้อกว้าง 11.0 และ15.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อน้ำยาบ้วนปากสัมผัสกับเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 30 วินาที 1 และ 3 นาที สามารถฆ่าเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และ พรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดียได้ร้อยละ100 เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีน พบว่าน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดจากเปลือกทุเรียนทำให้เกิดบริเวณยับยั้งเชื้อน้อยกว่าคลอร์เฮกซิดีนอย่างมีนัยสำคัญ($p<0.001$) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการฆ่าเชื้อพบว่าไม่แตกต่างจากคลอร์เฮกซิดีน

บทสรุป น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก สามารถต้านเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ได้ โดยสามารถทำลายเชื้อทั้งสองชนิดได้ร้อยละ100 ภายในระยะเวลาตั้งแต่ 30 วินาที

ภาควิชา ปริทันตวิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....รัชนู.....

สาขาวิชา ปริทันตศาสตร์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5276124332 : MAJOR PERIODONTICS

KEYWORDS: ANTIMICROBIAL EFFECT/ *Porphyromonas gingivalis* / *Prevotella intermedia* / POLYSACCHARIDE FROM DURIAN FRUIT HALLS

RUTCHANOO ROOBSONG : THE ANTIMICROBIAL EFFECT AGAINST *Porphyromonas gingivalis* AND *Prevotella intermedia* OF MOUTHRINSE CONTAINING THE EXTRACTED POLYSACCHARIDE FROM DURIAN FRUIT-HALLS. ADVISOR : ASSOC.PROF.NAULCHAVEE HONGPRASONG, CO.ADVISOR:ASSOC.PROF.JINTAKORN KUVATANASUCHATI,46pp.

Objective To investigate the antimicrobial effect against *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* of 2% w/w concentration mouthrinse containing the extracted polysaccharide from durian fruit hulls *in vitro*.

Materials and methods This study investigated the antimicrobial effect against *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277and *Prevotella intermedia* ATCC 25611 by Disc diffusion technique and Time kill analysis, recorded at 30 seconds,1 and 3 minutes by counting the colony forming unit which compare with 0.1% chlorhexidine mouthrinse and 0.9% normal saline solution.

Results This study found that mouthrinse containing the extracted polysaccharide from durian fruit hulls had statistically significant antimicrobial effect against *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* ($p<0.001$) when compare with normal saline solution. The inhibition zones indicating the two bacteria were inhibited from the mouthrinse were 11.0 and 15.5 millimeters, respectively. In time kill analysis, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* were killed at 100 % when the bacteria contacted with mouthrinse for 30 seconds, 1 and 3 minutes. The inhibition zones of mouthrinse containing the extracted polysaccharide from durian fruit hulls were less than those of chlorhexidine mouthrinse significantly ($p<0.001$). However, the bactericidal effect of mouthrinse containing the extracted polysaccharide from durian fruit hull was not different when compare with chlorhexidine mouthrinse.

Conclusion: 2% w/w concentration mouth-rinse containing the extracted polysaccharide from durian fruit hull has an antimicrobial effect against *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* 100 % at 30 seconds.

Department : Periodontology Student's Signature Rutchanoo

Field of Study : Periodontics Advisor's Signature Naulchavee Hongprasong

Academic Year : 2010 Co-advisor's Signature Jintakorn Kuvatanasucha

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ดี โดยได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง นวลฉวี หงษ์ประสงค์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ จินตกร คูวัฒนสุชาติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้การสั่งสอน และให้คำแนะนำในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. พสุธา ธัญญะกิจไพศาล และ รองศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ พงษ์สามารถ ที่เอื้อเฟื้อสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน สอนวิธีการเตรียมน้ำยาบ้วนปาก รวมถึงทำให้คำแนะนำและให้คำปรึกษาในการทำวิจัยอย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์(คลินิก)ทันตแพทย์หญิง มัลลิกา ศิริรัตน์ และอาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. จันทรกร แจ่มไพบูลย์ ที่สละเวลาชี้แนะ และเป็นกรรมการสอบ

ขอขอบคุณทันตแพทย์รณยุทธ ชาญสมาธิ์ ที่ได้ให้คำแนะนำด้านสถิติ และเป็นกำลังใจในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการอำนวยความสะดวกในการทำเอกสารต่างๆ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือต่างๆ รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนส่งเสริมการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

คำถามการวิจัย..... 3

วัตถุประสงค์การวิจัย..... 3

ขอบเขตการวิจัย..... 4

ข้อตกลงเบื้องต้น..... 4

ข้อจำกัดการวิจัย..... 5

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 5

บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม..... 6

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 19

การเตรียมน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดจากเปลือกทุเรียน..... 20

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 21

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง..... 21

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก..... 24

การทดสอบด้วยวิธี ดิส ดิฟฟิวชั่น..... 24

การวิเคราะห์ผลการทำลายเชื้อแบบไทม์คิลล์..... 24

การเก็บรวบรวมข้อมูล..... 25

การวิเคราะห์ข้อมูล 26

บทที่ 4 ผลการวิจัย..... 27
บทที่ 5 การอภิปรายและสรุปผล..... 32
รายการอ้างอิง..... 36
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 46

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สมุนไพรไทยที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก….. 15

ตารางที่ 2 แสดงความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อจากการทดสอบด้วย วิธีดิส ดิฟฟิวชั่น…… 28

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่รอดชีวิต…… 31

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงวิธีการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์โดยการเจือจางทีละ 10 เท่า…… 23

ภาพที่ 2 แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส……..... 29

ภาพที่ 3 แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อของเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย……... 30

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพครั้งที่ 6 โดยกระทรวงสาธารณสุข ในระหว่างปี พ.ศ. 2549-2550 พบว่าคนไทยส่วนใหญ่เป็นโรคปริทันต์ โดยในกลุ่มเด็กและเยาวชนมีโรคเหงือกอักเสบถึงร้อยละ 58-60 ส่วนในกลุ่มผู้ใหญ่และผู้สูงอายุพบโรคปริทันต์อักเสบถึงร้อยละ 37-84(1) โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคติดเชื้อที่ก่อให้เกิดการอักเสบและการทำลายของอวัยวะปริทันต์มีสาเหตุก่อโรค คือจุลชีพในคราบจุลินทรีย์ จากข้อมูลงานวิจัยและหลักฐานทางระบาดวิทยาที่ผ่านมาได้สรุปว่า แบคทีเรียหลักที่ก่อให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบได้แก่ เชื้อแบคทีเรียพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส (*Porphylomonas gingivalis*), แทนนีเรลลา ฟอร์ไซเทีย (*Tannerella forsythia*)และแอกกริเกทิ-แบกเทอร์ แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์(*Aggregatibactor actinomycetemcomitans*)(2) นอกจากนี้ยังมีเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่น่าจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคปริทันต์ เช่น เชื้อแบคทีเรียพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย (*Prevotella intermedia*) ซึ่งพบได้ในปริมาณสูงในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ(3) และโรคเหงือกอักเสบเนื้อตายชนิดเฉียบพลัน(4) ซึ่งการกำจัดหรือลดปริมาณเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคปริทันต์ ถือว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่จะนำไปสู่ความสำเร็จในการรักษา

การควบคุมคราบจุลินทรีย์ทางกล ซึ่งได้แก่การแปรงฟันอย่างถูกวิธีร่วมกับยาสีฟันที่มีส่วนผสมของฟลูออไรด์ การใช้เส้นใยขัดฟันเพื่อทำความสะอาดซอกฟัน และการหมั่นไปตรวจสุขภาพช่องปากอย่างสม่ำเสมอ ถือได้ว่าเป็นการกำจัด/ลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียในช่องปากและควบคุมการเกิดโรคปริทันต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามในกรณีผู้ป่วยที่มีปัญหาในการควบคุมกล้ามเนื้อและข้อมือ หรือในตำแหน่งที่เครื่องมือเข้าไปทำความสะอาดได้ยากหรือไม่สามารถเข้าไปทำความสะอาดได้ถึง เช่น บริเวณซอกฟันหรือในร่องลึกปริทันต์ ประกอบกับสภาวะที่เร่งรีบในชีวิตประจำวัน การใช้สารเคมีบำบัดเฉพาะที่เพื่อช่วยเสริมในการทำความสะอาดช่องปาก เช่น น้ำยาบ้วนปาก น้ำยาชะล้างเหนือเหงือกและภายในร่องลึกปริทันต์ได้ถูกแนะนำขึ้น โดยหวังผลในการควบคุมคราบจุลินทรีย์และลดการอักเสบของเหงือก(5) ปัจจุบันสารเคมีบำบัดเฉพาะที่ เช่น คลอร์เฮกซิดีนเป็นที่ยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่อย่างไรก็ตามพบว่าคลอร์เฮกซิดีนมีผลข้างเคียง(adverse effect)หลายประการ เช่น มีรสขม ทำให้การรับรสอาหารเปลี่ยนไประยะหนึ่งภายหลังการใช้ ฟันและวัสดุบูรณะติดสีน้ำตาลหรือดำ และอาจทำให้เยื่อบุผิวมี

การลอกหลุดแล้วทำให้เกิดความรู้สึกปวดแสบปวดร้อนได้(5,6) ดังนั้นหากเราสามารถนำสารจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัยและมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์เพื่อทดแทนสารเคมีได้ ก็น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สมุนไพรไทยหลายชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ได้ เช่น ใบข่อย(7) ฟ้าทะลายโจร(8) ใบฝรั่ง(9) ใบและกิ่งของต้นแก้ว(10) เป็นต้น

ทุเรียน (*Durio Zibethinus Linn.*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยและได้รับความสนใจในการศึกษาวิจัย โดยพบว่าสารสกัดจากเปลือกทุเรียนซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์(polysaccharide)มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด(11) รวมทั้งเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์(*Streptococcus mutans*) และเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์ แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์(*Aggregatibactor actinomycetemcomitans*) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดฟันผุ และโรคปริทันต์อักเสบตามลำดับ(12,13) ต่อมาพสุธาและคณะ(14) ได้มีการพัฒนาสูตรน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก พบว่ามีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์ และเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์ แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ได้ร้อยละ 100 ภายในเวลา 1 นาที และ จากการทดสอบความระคายเคืองชนิดกึ่งเรื้อรังต่อเนื้อเยื่อช่องปากและความเป็นพิษต่อร่างกายในสัตว์ทดลองชนิดหนูแรท พบว่าไม่มีผลต่อเนื้อเยื่อช่องปาก ค่าเคมีในเลือด และการทำงานของตับและไตของสัตว์ทดลองที่ได้รับน้ำยาบ้วนปากดังกล่าวติดต่อกันเป็นเวลา 21วัน ซึ่งสูตรน้ำยาบ้วนปากสูตรนี้ได้ผ่านเกณฑ์คุณภาพตามมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก.) โดยไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อราหรือโลหะหนักในน้ำยาบ้วนปาก(14)

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้มีแนวคิดที่จะนำน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก มาทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และ พรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดียซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์อักเสบ โดยทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นการศึกษานำร่องก่อนที่จะนำน้ำยาบ้วนปากดังกล่าวไปศึกษาในทางคลินิกต่อไป

คำถามการวิจัย

คำถามหลัก

น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและเชื้อแบคทีเรียพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ได้หรือไม่

คำถามรอง

ต้องการทราบความสามารถของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและเชื้อแบคทีเรียพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที และ 3 นาที ตามลำดับ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและเชื้อแบคทีเรียพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ในห้องปฏิบัติการ

วัตถุประสงค์รอง

เพื่อศึกษาความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและเชื้อแบคทีเรียพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที และ 3 นาที ในห้องปฏิบัติการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการวิจัยในห้องปฏิบัติการโดยเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบคือเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สายพันธุ์ ATCC 33277 และเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย สายพันธุ์ ATCC 25611โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อชนิดเบรนฮาร์ทอินฟิวชันและอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อชนิดบรูเซลลา (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England)ในตู้เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนในที่นี้คือ น้ำยาบ้วนปากที่ถูกเตรียมขึ้นตามกรรมวิธีที่ได้รับการจดสิทธิบัตรโดยสำนักงานทรัพย์สินทางปัญญา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่คำขอ 0801004570 ลงวันที่ 5 กันยายน 2551

2. น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีน คือ น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของคลอร์เฮกซิดีนกลูโคเนตร้อยละ 0.2 ผลิตโดยคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งถูกนำมาเจือจางด้วยน้ำเกลือเพื่อให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เพื่อใช้ในการทดลองด้วยวิธีดิส ดิฟฟิวชั่น

3. น้ำเกลือที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ normal saline ปราศจากเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.9 สำหรับฉีดเข้าหลอดเลือดดำ (sodium chloride 0.9% for injection) ผลิตโดยบริษัท GHP (General Hospital Products Public Co.,Ltd)

4. การทดลองทุกขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย รวมทั้งการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อจะทำอยู่ภายในตู้ปราศจากออกซิเจน (anaerobic chamber ;ไนโตรเจน 75% ,ไฮโดรเจน 10% , คาร์บอนไดออกไซด์ 5%) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

5. หากพบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่น หรือเชื้อที่ใช้เป็นตัวควบคุมตายทั้งหมด ผลการทดลองครั้งนั้นจะถูกตัดทิ้ง และทำการทดลองใหม่

ข้อจำกัดของการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องหลอดทดลองเท่านั้น สภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการทดลองถูกจำกัดให้อยู่ภายในห้องปฏิบัติการ ยังไม่ได้จำลองจากสภาวะช่องปากที่แท้จริง

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ตัวควบคุมบวก (positive control) หมายถึง สารเคมีซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ในที่นี้หมายถึง คลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.1

ตัวควบคุมลบ(negative control) หมายถึง สารเคมีซึ่งไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ในที่นี้หมายถึง น้ำเกลือปราศจากเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.9

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากจากสารสกัดเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส และ พรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ในห้องปฏิบัติการ

2. ทราบถึงความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส และ พรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดียที่ระยะเวลา 30 วินาที,1 และ 3 นาที ในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นการศึกษานำร่องก่อนที่จะนำน้ำยาบ้วนปากดังกล่าวไปศึกษาในทางคลินิกต่อไป

3. เพื่อพัฒนาน้ำยาบ้วนปากจากสารสกัดธรรมชาติที่หาได้ง่ายในประเทศไทย และลดผลข้างเคียงจากการใช้สารเคมี

4. เป็นการนำขยะทางการเกษตรซึ่งมีปริมาณมาก และหาได้ง่ายในประเทศไทยมาพัฒนาและปรับปรุงให้เกิดประโยชน์ ซึ่งเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มของขยะทางการเกษตร

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

แนวคิดและทฤษฎี

โรคปริทันต์เป็นโรคที่เกิดกับเนื้อเยื่อของอวัยวะปริทันต์แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ โรคเหงือกอักเสบ และโรคปริทันต์อักเสบ สาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์คือ แบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ที่ยึดเกาะกับผิวฟันใกล้ขอบเหงือกและบริเวณใต้ขอบเหงือก(15,16) ซึ่งจะผลิตปัจจัยความรุนแรงอันได้แก่ เอนไซม์เอนโดทอกซิน, เอ็กโซทอกซิน และ สารอื่นๆ ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ของเนื้อเยื่อปริทันต์(17) นอกจากนี้ยังสามารถปล่อยเอนไซม์คอลลาจีเนส และโปรทิเอส ซึ่งจะย่อยสลายคอลลาเจน, สารโพรทีโอไกลแคนหรือไกลโคซามิโนไกลแคน และสารพื้นระหว่างเซลล์ของเนื้อเยื่อยึดต่อ(18) เมื่อมีการสะสมของเชื้อแบคทีเรียร่างกายจะมีกลไกการป้องกัน โดยการจดจำสารไลโพพอลิแซคคาไรด์ซึ่งเป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ และปล่อยสารตัวกลางการอักเสบ กระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันทำให้เกิดการทำลายเชื้อแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตามผลจากกระบวนการอักเสบนอกจากทำให้เกิดการทำลายเชื้อแบคทีเรียแล้ว ยังมีการผลิตสารสลายคอลลาเจน และเอนไซม์ต่างๆที่ทำให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ร่วมด้วย ซึ่งภายหลังจากการทำลาย ร่างกายจะเกิดกระบวนการซ่อมแซมขึ้น แต่หากคราบจุลินทรีย์ไม่ถูกกำจัดออกไป แบคทีเรีย และ/หรือปัจจัยความรุนแรงมีจำนวนมากกว่ากลไกการป้องกันและการซ่อมแซมของร่างกาย จะทำให้ภาวะสมดุลของเนื้อเยื่อปริทันต์เสียไป เกิดการทำลายมากกว่าการซ่อมแซมซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคปริทันต์อักเสบในที่สุด(19)

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยเฉพาะที่ที่สนับสนุนการเกิดโรคปริทันต์ เช่น หินน้ำลาย ลักษณะของฟันและอวัยวะปริทันต์ที่ทำให้มีการสะสมของคราบจุลินทรีย์มากขึ้น รวมทั้งปัจจัยทั่วกายเสริมการก่อโรค และปัจจัยเสี่ยง เช่น โรคเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลไม่ได้ และการสูบบุหรี่ เป็นต้น ซึ่งมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน และเพิ่มความรุนแรงของการเกิดโรคปริทันต์อีกด้วย (19)

เชื้อแบคทีเรียกับการเกิดโรคปริทันต์

เชื้อแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์จะอยู่รวมกันในรูปไบโอฟิล์มซึ่งประกอบด้วยพอลิแซคคาไรด์ หรือ ไกลโคคาลิคซ์ร้อยละ 75-80 ของปริมาตร และโคโลนีของจุลินทรีย์อีกร้อยละ 20-25 ของ

ปริมาตร ผิวด้านนอกของไบโอฟิล์มจะปกคลุมด้วยพอลิแซคคาไรด์มีลักษณะเป็นสารเหนียว ช่วยป้องกันไม่ให้ผิวของไบโอฟิล์มแห้ง เป็นที่กักเก็บอาหารไว้สำหรับแบคทีเรีย ป้องกันการทำลายจากยา และเป็นสารผ่อนความเป็นกรดหรือด่าง(Buffer)กับเอนไซม์ที่หลั่งจากเม็ดเลือดขาว มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อลดลง ส่วนโครงสร้างภายในไบโอฟิล์มจะมีช่องทางลำเลียงสำหรับกำจัดของเสีย ขนส่งอาหาร และใช้ติดต่อสื่อสารกันภายในไบโอฟิล์ม ทำให้เมื่อเกิดเชื้อชนิดหนึ่งดื้อยา จะสามารถส่งสัญญาณทำให้เชื้อชนิดอื่นเกิดการดื้อยาได้ ดังนั้นการกำจัดแบคทีเรียที่อยู่ในรูปของไบโอฟิล์มจึงทำได้ยากขึ้น นอกจากนี้ไบโอฟิล์มยังสามารถยึดเกาะได้ทั่วไปในช่องปากทั้งส่วนเนื้อเยื่อกระพุ้งแก้ม ลิ้น เหงือก และผิวฟัน แต่เนื่องจากบริเวณผิวฟันไม่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อเหมือนเนื้อเยื่อบริเวณอื่นๆ จึงทำให้ไบโอฟิล์มยึดที่ผิวฟันได้นานขึ้น สามารถกระตุ้นการอักเสบของเนื้อเยื่อปริทันต์ได้อย่างต่อเนื่องจนทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบขึ้น (20)

กระบวนการเกิดไบโอฟิล์ม เริ่มต้นจากไกลโคโปรตีนในน้ำลาย จับกับผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ของผิวฟัน กลายเป็นเยื่อผิว(pellicle)บางๆ ซึ่งทำหน้าที่เป็นส่วนรับให้เชื้อจุลินทรีย์เข้ามายึดเกาะ โดยใช้โปรตีนยึดจับที่อยู่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียกลุ่มแรกที่เข้ามายึดเกาะเป็นชนิดสเตร็ปโตค็อกคัส แซงกิส (*Streptococcus sanguis*) สเตร็ปโตค็อกคัส ไมทิส (*Streptococcus mitis*) และแอกทิโนไมซีส(*Actinomyces*) ต่อมาแบคทีเรียจะมีการแบ่งตัวมากขึ้น และมีเชื้อแบคทีเรียชนิดใหม่เข้ามายึดจับต่อกันไปอย่างเป็นระบบ โดย Socransky และคณะ (21) จัดแบ่งชนิดของเชื้อแบคทีเรียในไบโอฟิล์มตามลำดับการเข้ายึดได้เป็น 5 กลุ่ม และให้สัญลักษณ์ของกลุ่มเป็นสีต่างๆ ได้แก่ 1) สีเหลือง เป็นเชื้อในกลุ่มแอคทิโนไมซีส และ สเตร็ปโตค็อคคัสซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีฟิมเบรียที่ยื่นจากผนังเซลล์ช่วยยึดกับพื้นผิวฟันและโปรตีนจากน้ำลายที่ผิวฟัน 2) กลุ่มสีเขียว เช่น แคปโนไซโทฟากา(*Capnocytophaga*) และ เชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์ แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ 3) กลุ่มสีม่วง เช่น แอกทิโนไมซีส นีสลันดิไอ (*Actinomyces naeslundii*) จะมายึดต่อกับเชื้อในกลุ่มสีเหลือง และทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมในการเข้ายึดของแบคทีเรียในกลุ่มต่อไป 4) กลุ่มสีส้ม เช่น พรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย และ 5) กลุ่มสีแดง เช่น พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส, ทรีโพนีมา เดนติโคลา(*Treponema denticola*) และ แทนนีเรลลา ฟอร์ไซเทีย (*Tannerella forsythia*) โดยมีเชื้อกลุ่มฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีเอตัม (*Fusobacterium nucleatum*)ซึ่งมีความสามารถในการยึดเกาะกับเชื้อได้หลายชนิด ทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมระหว่างเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแรกที่มายึดผิวฟันกับเชื้อแบคทีเรียกลุ่มหลัง คือกลุ่มสีส้มและสีแดงที่มีความสามารถในการทำลายอวัยวะปริทันต์ เช่น เชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์ แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์, เชื้อแทนนีเรลลา ฟอร์ไซเทีย และเชื้อพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส เป็นต้น

ในช่องปากมีแบคทีเรียมากกว่า 700 ชนิด โดยที่มากกว่า 400 ชนิด สามารถตรวจพบได้ในร่องลึกปริทันต์ (22) จากหลายการศึกษาพบว่าปริมาณและชนิดของเชื้อแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์สัมพันธ์กับสภาวะปริทันต์ที่ต่างกัน โดยในคนที่ไม่เป็นโรคปริทันต์ จะพบเชื้อน้อยประมาณ$10^2 – 10^3$ โคโลนี/ร่องเหงือก เชื้อส่วนใหญ่เป็นกลุ่มสเตร็ปโตค็อคคัส และ แอคทิโนไมซีส ในบริเวณที่เป็นโรคเหงือกอักเสบจะมีเชื้อประมาณ $10^4 – 10^6$ โคโลนี/ร่องเหงือก โดยจะพบเชื้อแกรมบวกและแกรมลบในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน เชื้อแกรมบวกส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มสเตร็ปโตค็อคคัส และ แอคทิโนไมซีสคล้ายกับในตำแหน่งที่มีอวัยวะปริทันต์ปกติ ส่วนเชื้อแกรมลบ ส่วนใหญ่เป็นพวกเชื้อฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีเอตัม, พรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย และ เวลโลเนลลา พาวูลา(*Veillonella parvula*)เป็นต้น(23) ส่วนบริเวณที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบมักจะพบเชื้อปริมาณมากถึง$10^5 – 10^8$ โคโลนี/ร่องลึกปริทันต์และชนิดของเชื้อแบคทีเรียจะแตกต่างจากในตำแหน่งที่มีอวัยวะปริทันต์ปกติหรือมีเหงือกอักเสบ คือส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อแกรมลบ ชนิดที่เจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เช่น เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส, ทรีโพนีมา เดนติโคลา และแทนนีเรลลา ฟอร์ไซเทีย เป็นต้น(24,25)

เนื่องจากในช่องปากมีเชื้อแบคทีเรียมากกว่า 700 ชนิด ดังนั้นในการกำหนดแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคปริทันต์อักเสบนั้น Socransky (26) ได้เสนอเกณฑ์ที่นำมาใช้อธิบายถึงแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคปริทันต์อักเสบดังนี้

1) ต้องเป็นเชื้อที่ปรากฏอยู่หรือมีปริมาณมากในรอยโรคที่กำลังลุกลาม

2) ตรวจไม่พบหรือมีปริมาณน้อยในคนที่มีอวัยวะปริทันต์ปกติ

3) เมื่อกำจัดแบคทีเรีย หรือปัจจัยความรุนแรงของแบคทีเรียชนิดนี้ออกไปแล้วทำให้ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยดีขึ้น และเมื่อเกิดโรคกลับมาเป็นซ้ำ มักจะพบว่ามีแบคทีเรียชนิดนี้อยู่ในรอยโรคนั้นๆ อีก

4) สามารถตรวจภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีต่อแบคทีเรียชนิดนี้ เช่น พบปริมาณของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแบคทีเรียชนิดนี้

5) ผลิตปัจจัยความรุนแรงที่เกี่ยวข้องกับการเกิดหรือลุกลามของโรคปริทันต์อักเสบได้

6) มีตัวอย่างการศึกษาในสัตว์ที่ทำให้ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ แล้วสามารถมีการทำลายอวัยวะปริทันต์ในสัตว์ทดลองได้

จากการพิจารณาตามเกณฑ์ของ Socransky, ข้อมูลงานวิจัยและหลักฐานทางระบาดวิทยาที่ผ่านมาสรุปได้ว่ามีเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด ที่เป็นสาเหตุของโรคปริทันต์อักเสบ คือ เชื้อ

แบคทีเรียพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส, เชื้อแบคทีเรียแอกกริเกทิแบกเทอร์ แอกทิโนไมซีเทมคอมิ-แทนส์ และ เชื้อแบคทีเรียแทนนีเรลลา ฟอร์ไซเทีย

เชื้อแบคทีเรียพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส เป็นเชื้อแกรมลบ รูปร่างกลมหรือรูปแท่งสั้นๆ เจริญได้ดีในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเชื้อในกลุ่ม black pigment bacteroides ลักษณะโคโลนีกลม ผิวเรียบมน สีดำหรือน้ำตาลเข้ม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร พบได้น้อยในผู้ที่มีอวัยวะปริทันต์ปกติ พบได้ในปริมาณสูงในผู้ป่วยที่มีโรคปริทันต์อักเสบ(27) โดยปริมาณของเชื้อจะลดลงในตำแหน่งที่ประสบความสำเร็จในการรักษา และยังคงพบในปริมาณสูงในตำแหน่งที่มีการกลับมาเป็นซ้ำ หรือยังคงมีร่องลึกปริทันต์หลงเหลืออยู่ภายหลังการรักษา(28) เชื้อดังกล่าวสามารถผลิตสารที่ทำให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์โดยทางตรงหรือทางอ้อมได้หลายชนิด เช่น คอลาจีเนส, ฮีโมไลซิน, ไฟบริโนไลซิน, จิงจิเพน และเอนโดทอกซิน(29,30)เป็นต้น จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สามารถบุกรุกเข้าไปอยู่ในเซลล์เยื่อบุช่องปากโดยอาศัยฟิมเบรีย(31) และสามารถพบเชื้ออยู่ภายในเซลล์เยื่อบุร่องลึกปริทันต์(32) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่เชื้อใช้ในการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และจากการศึกษาของ Madianos และคณะ(33) ยังพบว่า เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของโพลีมอร์โฟนิวเคลียร์ ลิวโคไซต์ ข้ามเยื่อบุผิวออกมาบริเวณร่องเหงือก โดยการผลิตจิงจิเพน ซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของอินเตอร์ลิวคิน-8 และไอแคม-1(ICAM-1: Intercellular adhesion molecule-1)ที่ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวเคลื่อนที่ไปยังตำแหน่งที่มีการติดเชื้อ(chemotaxis factor)ทำให้โพลีมอร์โฟนิวเคลียร์ ลิวโคไซต์ไม่สามารถเคลื่อนที่ข้ามเยื่อบุผิวร่องเหงือกออกมาทำลายเชื้อแบคทีเรียในร่องเหงือกได้ ส่งผลให้โรคปริทันต์มีความรุนแรงมากขึ้น

นอกจากเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสแล้ว เชื้อแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งซึ่งอยู่ในกลุ่ม black pigment bacteroides เช่นเดียวกับเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสาเหตุก่อโรคปริทันต์เช่นกัน คือ เชื้อแบคทีเรียพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ซึ่งเป็นเชื้อแกรมลบ รูปแท่งสั้นๆ เจริญได้ดีในสภาวะปราศจากออกซิเจน ลักษณะโคโลนีกลม ผิวเรียบมน สีดำหรือน้ำตาลเข้ม โดยจากหลายการศึกษาพบเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ปริมาณสูงในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ(3) และโรคเหงือกอักเสบเนื้อตายชนิดเฉียบพลัน(4) โดย Soder และคณะ(34) พบว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้มีการหลั่งแมทริกซ์เมแทลโลโพรทีเนส- 8และ9 มากขึ้นและทำให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสามารถบุกรุกเข้าไปอยู่ในเซลล์เยื่อบุช่องปาก(35) และสามารถพบเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ภายในเซลล์เยื่อบุร่องลึกปริทันต์

(32) เช่นเดียวกับเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเชื้อพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส และ พรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดียมีความสำคัญในการทำให้เกิดโรคปริทันต์ ซึ่งการกำจัดหรือลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว จึงถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่นำไปสู่ความสำเร็จในการรักษา

การป้องกันและรักษาโรคปริทันต์

การควบคุมคราบจุลินทรีย์ทางกล โดยการแปรงฟันอย่างถูกวิธี การใช้อุปกรณ์ทำความสะอาดซอกฟัน รวมถึงการขูดหินน้ำลายทั้งเหนือเหงือกและใต้เหงือก ถือเป็นวิธีการรักษาและป้องกันโรคปริทันต์ที่ได้ผล การขูดหินน้ำลายและเกลารากฟัน เป็นการกำจัดสิ่งสะสมที่ผิวฟันและผิวรากฟัน โดยเฉพาะไบโอฟิล์มทั้งด้านที่ยึดกับผิวฟัน และด้านที่ยึดกับเนื้อเยื่อเหงือก ทำให้อัตราส่วนเชื้อแบคทีเรียใต้เหงือกเปลี่ยนแปลงเข้าสู่สมดุล ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบลดลง ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งและรูปกลมเพิ่มขึ้น จึงเป็นการหยุดการดำเนินของโรค ซึ่งสัมพันธ์กับผลทางคลินิก คือ การลดความลึกของร่องลึกปริทันต์ และเพิ่มระดับการยึดของอวัยวะปริทันต์ ทั้งนี้เชื้อแบคทีเรียที่เหลือในร่องลึกปริทันต์จะเป็นตัวตั้งต้นในการกลับมาเกิดโรคใหม่ ดังนั้นผลสำเร็จของการรักษาจึงขึ้นอยู่กับการกำจัดเชื้อที่อยู่ใต้เหงือกได้มากเพียงใด(36) อย่างไรก็ตามวิธีทางกลไม่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่แทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อปริทันต์ เช่น เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์ แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ หรือเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในร่องลึกปริทันต์ที่คดโค้งได้ รวมทั้งในผู้ป่วยบางรายที่มีปัญหาในการควบคุมกล้ามเนื้อและข้อมือ ทำให้ไม่สามารถทำความสะอาดช่องปากได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงมีการนำสารเคมีบำบัดมาใช้เสริมวิธีการทางกลเพื่อช่วยกำจัดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

การใช้สารเคมีบำบัดในโรคปริทันต์

การใช้สารเคมีบำบัดมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ลดการก่อตัวของคราบจุลินทรีย์ใหม่ และสร้างสมดุลของเชื้อในช่องปาก 2) กำจัดคราบจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิม 3) กำจัดหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค และ 4) ยับยั้งปัจจัยความรุนแรงที่เชื้อผลิตขึ้น โดยสารเคมีบำบัดอาจแบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์ได้ดังนี้ 1) สารฆ่าเชื้อ (disinfectant) ได้แก่ สารฆ่า หรือหยุดการเจริญเติบโตของจุลชีพในคราบจุลินทรีย์ 2) สารต้านจุลชีพ (antimicrobial agent) ได้แก่ ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์หยุดยั้งแบคทีเรียและยาปฏิชีวนะที่ฆ่าแบคทีเรีย 3) สารที่ขัดขวางการยึดของจุลชีพกับอินทรีย์สารของผิวฟัน และขัดขวางการยึดระหว่างจุลชีพด้วยกันเอง นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งตามลักษณะ

การนำมาใช้ทางคลินิกได้เป็น 2 แบบ คือยาต้านจุลชีพใช้รับประทาน และสารเคมีบำบัดเฉพาะที่หรือใช้ภายนอก(37)

ยาต้านจุลชีพแบบรับประทาน จะช่วยหยุดยั้งหรือฆ่าจุลชีพก่อโรคที่หลงเหลืออยู่ในเส้นใยเหงือก เส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ และผิวของเคลือบรากฟัน นอกจากนี้ยาในกลุ่มเตตราไซคลินยังมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส ซึ่งจะช่วยลดการทำลายคอลลาเจน และกระดูกอีกด้วย(38) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาต้านจุลชีพแบบรับประทานควรต้องคำนึงถึงอาการไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้น เช่น อาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง เวียนศีรษะ ปากแห้ง รวมถึงการแพ้ยาที่อาจเกิดขึ้นได้ นอกจากนี้การใช้ยาต้านจุลชีพเป็นเวลานานอาจทำให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการดื้อยาหรือเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสได้อีกด้วย(39)

สารเคมีบำบัดเฉพาะที่ถูกนำมาใช้ในหลายรูปแบบ เช่น น้ำยาบ้วนปาก น้ำยาฉีดล้างในช่องปาก(supragingival irrigation) น้ำยาฉีดล้างใต้เหงือก(subgingival irrigation)หรือในรูปแบบของระบบควบคุมการปล่อยตัวยาอย่างช้าๆ(controlled release delivery system) โดยอาศัยสารตัวนำให้ตัวยาค่อยๆ ละลายออกมา เป็นต้น โดยสารเคมีบำบัดเฉพาะที่จะให้ความเข้มข้นของยาบริเวณร่องเหงือกที่สูงกว่ายาต้านจุลชีพแบบรับประทาน ทำให้สามารถลดขนาดยา และลดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาแบบรับประทาน เช่น อาการคลื่นไส้ อาเจียน หรือการดื้อยาได้(37)

สารเคมีบำบัดเฉพาะที่ควรมีคุณสมบัติที่ดีดังนี้

1) สารจะกำจัดเฉพาะจุลชีพก่อโรค และไม่ทำให้เกิดการดื้อยาหรือสารดังกล่าว

2) สารสามารถออกฤทธิ์ในช่องปากได้นานและไม่ทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อช่องปากในระดับความเข้มข้นที่ใช้

3) ลดการเกิดคราบจุลินทรีย์และอาการอักเสบ

4) ไม่ทำให้เกิดสีที่ตัวฟันและเนื้อเยื่อในช่องปาก

5) สารจะไม่เปลี่ยนความรู้สึกรับรส

6) ใช้ง่าย และราคาถูก(40)

สารเคมีบำบัดเฉพาะที่ที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันมีหลายชนิด โดยสามารถแบ่งตามชนิดของสารออกฤทธิ์หลักได้ดังนี้

1. คลอร์เฮกซิดีน ถือว่าเป็นสารมาตรฐานที่ใช้ควบคุมคราบจุลินทรีย์(41) มีโครงสร้างโมเลกุล 1,6 bis (4-chlorophenyl diguanido) hexane การทำงานของคลอร์เฮกซิดีนเกิดขึ้น โดย

การแตกตัวให้ประจุบวกยึดกับประจุลบของพื้นผิวต่าง ๆ ในช่องปาก ได้แก่ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ของเคลือบฟัน คราบอินทรีย์สารของผิวฟัน เยื่อเมือกในช่องปาก โปรตีนในน้ำลายและแบคทีเรีย ใช้เวลาในการบ้วนหนึ่งนาที สามารถยึดเกาะอยู่ในช่องปากและค่อย ๆ ปล่อยสารออกมาได้นาน 8-12 ชั่วโมง คลอร์เฮกซิดีนออกฤทธิ์ยับยั้งและทำลายจุลชีพได้อย่างกว้างขวาง ทั้งเชื้อแบคทีเรีย แกรมบวก แกรมลบ และเชื้อรา โดยในความเข้มข้นต่ำคลอร์เฮกซิดีนจะดึงโพแทสเซียมและฟอสฟอรัสในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ ทำให้จุลชีพไม่แบ่งตัว แต่ที่ความเข้มข้นสูงตั้งแต่18-32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คลอร์เฮกซิดีนจะสามารถฆ่าจุลชีพได้โดยประจุบวกจะทำปฏิกิริยากับประจุลบของจุลชีพ ทำให้ผนังเซลล์ของจุลชีพฉีกขาด คลอร์เฮกซิดีนซึมผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ และทำปฏิกิริยาทำให้ไซโทพลาสซึมตกตะกอน และฆ่าจุลชีพได้อย่างรวดเร็ว(4) นอกจากนี้คลอร์เฮกซิดีนยังมีความสามารถยับยั้งการสะสมของคราบจุลินทรีย์ได้ จากการที่คลอร์เฮกซิดีนสามารถยึดกับกลุ่มประจุลบของไกลโคโปรตีนในน้ำลาย ทำให้ลดการสร้างคราบโปรตีน(acquired pellicle)(5) และสามารถแย่งจับกับบริเวณพื้นผิวที่เป็นตัวรับ(receptor site) กับแคลเซียมไอออน เป็นการป้องกันการสร้างสะพานแคลเซียม(calcium bridge)ระหว่างแบคทีเรียกับพื้นผิวต่างๆ ในช่องปาก หรือระหว่างแบคทีเรียด้วยกันเอง ทำให้การสะสมคราบจุลินทรีย์ลดลง(42)

การใช้คลอร์เฮกซิดีนทางปริทันต์บำบัดมักอยู่ในรูปของน้ำยาบ้วนปาก และน้ำยาชะล้างภายในร่องลึกปริทันต์ โดยในรูปของน้ำยาบ้วนปากความเข้มข้นร้อยละ 0.1 - 0.2 บ้วน 6 ครั้งต่อสัปดาห์ สามารถลดเหงือกอักเสบได้ร้อยละ 66.66 – 80(43) ส่วนในรูปของน้ำยาชะล้างภายในร่องลึกปริทันต์ จากการศึกษาของ Goodman และคณะ(44) พบว่าการใช้คลอร์เฮกซิดีนฉีดล้างภายในร่องลึกปริทันต์โดยใช้เป็นตัวเสริมเพิ่มเติมหลังการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันจะช่วยลดจำนวนจุลชีพ ลดการยึดเกาะระหว่างจุลชีพด้วยกันเอง และลดอาการอักเสบของเหงือก นอกจากนี้ยังมีการนำคลอร์เฮกซิดีนมาใช้ในรูปเจลความเข้มข้นร้อยละ 1 ทาวันละ 3 ครั้งเพื่อลดความรุนแรงของแผลแอปทัส(Apthous ulcer)(45) ระยะเวลาในการใช้คลอร์เฮกซิดีนมีหลายรูปแบบทั้งแบบระยะสั้นประมาณ 1-2 สัปดาห์ เช่น ภายหลังการทำศัลยกรรมปริทันต์ หรือการผ่าตัดอื่นๆ ในช่องปาก หรือใช้บ้วนก่อนการผ่าตัดเพื่อป้องกันการติดเชื้อในกระแสเลือดหรือในระหว่างการรักษาแผลแอปทัส, ปากอักเสบเนื่องจากฟันปลอม(Denture stromatitis)หรือในโรคเหงือกอักเสบเนื้อตายเป็นต้น หรือใช้นานประมาณ 2-3เดือน เช่นในผู้ป่วยที่พิการทางร่างกายและทางสมองที่ไม่สามารถทำความสะอาดช่องปากเองได้ หรือในผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงในการเกิดฟันผุสูง เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ในระยะยาวมากกว่า 6 เดือน ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว เอดส์ หรือผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน เป็นต้น(6)

อาการไม่พึงประสงค์ของคลอร์เฮกซิดีน คือ มีรสขม ทำให้การรับรสอาหารเปลี่ยนไประยะหนึ่งภายหลังการใช้ ฟันและวัสดุบูรณะติดสีน้ำตาลหรือดำ และอาจทำให้เยื่อบุผิวมีการลอกหลุดแล้วทำให้เกิดความรู้สึกปวดแสบปวดร้อนได้(5,6)

2.สารประกอบฟีนอล คือสารผสมของน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ ไทมอล, ยูคาลิปตอล เมนทอล และ เมทิลซาลิไซเลท มีกลไกการออกฤทธิ์ โดยสารประกอบฟีนอลจะเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลชีพแกรมลบ และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของจุลชีพ สารประกอบฟีนอลเป็นพิษต่อโพรโทพลาสซึมของเซลล์ จึงฆ่าจุลชีพได้ ลดการเกิดคราบจุลินทรีย์และโรคเหงือกอักเสบ(46)อาการไม่พึงประสงค์ คือ มีรสขม ทำให้การรับรสอาหารเปลี่ยนไประยะหนึ่งภายหลังการใช้ ฟันและวัสดุบูรณะติดสีน้ำตาลหรือดำ และอาจทำให้เยื่อบุผิวมีการลอกหลุดแล้วทำให้เกิดความรู้สึกปวดแสบปวดร้อนได้(47)

3. ธาตุฮาโลเจน ได้แก่ ฟลูโอไรด์ในรูปของสแตนนัสฟลูโอไรด์ ซึ่งจะจับกับผนังเซลล์ของจุลชีพ ทำให้จุลชีพรวมกลุ่มบนผิวฟันได้น้อยลง ลดคราบจุลินทรีย์ และการเกิดโรคเหงือกอักเสบ (48) อาการไม่พึงประสงค์ คือ ทำให้เกิดคราบดำที่ผิวฟัน(49)

4.สารประกอบแอมโมเนียมจตุรภูมิ เช่น เซทีลไพริดิเนียมคลอไรด์ และเบนซาลโคเนียมคลอไรด์ ซึ่งจะแตกตัวให้ประจุบวก จับกับโมเลกุลประจุลบของผิวฟันหรือคราบจุลินทรีย์ แล้วปล่อยเป็นโมเลกุลอิสระอย่างรวดเร็วจึงมีฤทธิ์ไม่คงทน(50) อาการไม่พึงประสงค์ คือ มีรสขม ทำให้การรับรสอาหารเปลี่ยนไประยะหนึ่งภายหลังการใช้ ฟันและวัสดุบูรณะติดสีน้ำตาลหรือดำ และอาจทำให้เยื่อบุผิวมีการลอกหลุดแล้วทำให้เกิดความรู้สึกปวดแสบปวดร้อนได้(51)

5. สารออกซิเจนอิ่มตัว ได้แก่ โซเดียมเพอร์ออกซีบอเรต, โซเดียมเพอร์ออกซีคาร์บอเนต และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ โดยออกซิเจนที่ถูกปล่อยออกมาจะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ โครโมโซม และสลายจุลชีพในที่สุด แต่สารออกฤทธิ์มักไม่คงทนและเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อ(52)

6. ยาปฏิชีวนะที่นำมาใช้ภายนอก ในรูปเส้นใยมีอณูของสารต้านจุลชีพ ซึ่งจะช่วยควบคุมการปล่อยสารเฉพาะที่อย่างช้าๆ หรือในรูปของยาปฏิชีวนะผสมกับพอลิเมอร์สลายตัวตามธรรมชาติ นำมาใช้โดยการฉีดเข้าไปในร่องเหงือก สามารถสลายตัวได้จึงไม่ขัดขวางต่อการหายของอวัยวะปริทันต์ ยาออกฤทธิ์นาน มีความเข้มข้นมากพอที่จะฆ่าจุลชีพ และไม่ก่อให้เกิดการดื้อ

ยา แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากวิธีการใช้ยังค่อนข้างยุ่งยากและมีราคาแพง ปัจจุบันจึงยังไม่ค่อยเป็นที่นิยมมากนัก(53)

ถึงแม้ว่าสารเคมีบำบัดเฉพาะที่จะมีประโยชน์อย่างมากในการควบคุมคราบจุลินทรีย์ และป้องกันการเกิดเหงือกอักเสบ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าสารออกฤทธิ์หลักมักทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์หลายประการดังกล่าวข้างต้น นอกจากนี้ยาบางชนิดยังมีราคาแพง ดังนั้นหากสามารถนำสารจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัย มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ สามารถหาได้ง่ายและมีในประเทศไทยมาใช้ทดแทนได้ ก็น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ

การใช้สมุนไพรในการป้องกันฟันผุ และโรคปริทันต์อักเสบ

สมุนไพรได้ถูกนำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคในช่องปากมาตั้งแต่ในอดีต เช่น การใช้กิ่งหรือรากไม้เคี้ยว หรือถูฟัน ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพิสูจน์ว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้จริง เช่น การศึกษาของ Clark และคณะ(54) พบว่าชาวแอฟริกาเคี้ยวยางอคาเซีย เพื่อลดการเกิดโรคในช่องปาก และเมื่อทำการศึกษาพบว่า การเคี้ยวยางอคาเซียช่วยลดการเกิดคราบจุลินทรีย์ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส และพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย เป็นต้น ส่วนสมุนไพรไทยหลายชนิดพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ได้ เช่น ใบข่อย (7) สารสกัดใบฝรั่ง(8) ฟ้าทะลายโจร(9) ใบและกิ่งของแก้ว(10) เป็นต้น ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 สมุนไพรไทยที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก

สมุนไพร	*S.mutans*	*S.salivarius*	*A. actinomycetemcomotans*	*P.gingivalis*	*P.intermedia*
ข่อย(Streblus asper)(7)(55)	+	+	+	+	+
ฝรั่ง (Psidium guajava)(9)	+	ND	+	+	ND
ฟ้าทะลายโจร (Andrographis paniculata)(8)	+	ND	ND	+	ND
ไม้จี้ (Harrisonia Perforata)(56)	+	ND	+	ND	ND
สีเสียดเหนือ (Acacia catchu)(57)	-	ND	+	+	ND
มังคุด (Garcinia mangostana)(58)	+	ND	+	+	ND
ทุเรียน (Durio zibethinus)(12,13)	+	ND	+	ND	ND
ใบแก้ว (Murraya paniculata)(leaf)(10)	ND	ND	+	+	+
ใบแก้ว (Murraya paniculata)(branch)(10)	ND	ND	+	-	+
ใบสะเดา (Azadirachta indica)(leaf)(10)	ND	ND	+	+	+
ใบสาบเสือ (Chromolaena odorata)(leaf)(10)	ND	ND	+	-	+

+ หมายถึง มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบ

- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบ

ND หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้น

ทุเรียนเป็นพืชในวงศ์ Bombacaceae อยู่ในสกุล Durio มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Durio zibethinus Linn*. ทุเรียนถือได้ว่าเป็นราชาของผลไม้ เป็นไม้ผลยืนต้นไม่ผลัดใบ ผลทุเรียนมีขนาดใหญ่และมีหนามแหลมปกคลุมทั่วเปลือก ผลอาจมีขนาดความยาวถึง 30 เซนติเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางถึง 15 เซนติเมตร โดยทั่วไปมีน้ำหนักประมาณ 1-1.5 กิโลกรัม เปลือกมีสีเขียวหรือน้ำตาล เนื้อในมีสีเหลืองซีดถึงแดง มีรสชาติหอมหวาน มีกลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว และถือได้ว่าเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งในแต่ละปีจะมีขยะเปลือกทุเรียนที่เหลืออยู่เป็นจำนวนมาก ทุเรียนมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น การทำเชื้อเพลิงอัดแท่งจากเปลือกทุเรียนผสมกับกากตะกอนโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษพบว่ามีประสิทธิภาพในการให้ความร้อนสูงกว่าถ่านไม้ยูคาลิปตัส หรือการนำมาผลิตเป็นกระดาษจากเปลือกทุเรียน เป็นต้น ต่อมา Pongsamart และ Panmaung(59) ได้ทำการสกัดสารจากเปลือกทุเรียนเฉพาะส่วนที่เป็นสีขาวด้านใน ได้สารสกัดโพลีแซคคาไรด์สีน้ำตาลอ่อน มีรสเปรี้ยวเล็กน้อย ค่าพีเอชประมาณ 3 สามารถละลายในน้ำได้ ลักษณะเป็นสารข้นหนืด จากการวิเคราะห์โครงสร้างพบว่าเป็นสารโมเลกุลใหญ่ของโพลีแซคคาไรด์ ประเภทเพกตินโพลีแซคคาไรด์ มีองค์ประกอบหลักเป็นกรดโพลีกาแลคทูโรนิค (polygalacturonic acid) ต่อกันเป็นสายยาวของ(1,4)แอลฟา-กาแลคทูโรนิค แอซิด (1,4 α-galacturonic acid) นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยน้ำตาลอื่น ๆ ได้แก่ กลูโคส อะราบิโนส ฟลุกโตส และแรมโนส(60)

เพกตินเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ของพืชชั้นสูงหลายชนิด เช่น ส้ม แอปเปิล เป็นต้น ทำหน้าที่เป็นสารที่ทำให้เกิดเจล สามารถละลายน้ำได้ เพกตินถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารด้วยคุณสมบัติในการก่อรูปเป็นเจล จึงนิยมนำมาใช้เพื่อทำแยมและเยลลี่ นอกจากนี้เพกตินยังถูกนำมาใช้ในทางเภสัชกรรม โดยใช้เป็นสารช่วยแขวนตะกอนในตำรับยาน้ำแขวนตะกอน หรือทำเป็นเม็ดเจล โดยใช้เพกตินเป็นสารก่อเมทริกซ์เพื่อควบคุมการปลดปล่อยยาให้ช้าลง นอกจากนี้ยังพบว่าเพกตินมีคุณสมบัติในการยึดติดกับเยื่อเมือกได้ดี จึงมีการนำมาเป็นตัวนำส่งยาเพื่อให้ยาสามารถยึดติดกับเยื่อเมือกในทางเดินอาหารได้นานขึ้น เพิ่มความเข้มข้นของยาในบริเวณเฉพาะที่ และเพิ่มระยะเวลาการสัมผัสของยา เป็นต้น(61)

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านเชื้อของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้หลายชนิด เช่น บาซิลัส ซับทิลิส(*Bacillus subtilis)*, ไมโครคอคคัส ลูเตียส*(Micrococcus luteus)*, สเตปไฟโรคอคคัส ออเรียส(*Staphylococcus aureus)*, *เอสเชอริเชีย คอไล(Escherichia coli)* และโพรเตียส วาลการิส *(Proteus valgaris)* (11)เป็นต้น ดังนั้นจึงได้มีการนำสารสกัดโพลีแซคคาไรด์มาใช้

ประโยชน์ในทางการแพทย์ เช่น การผลิตน้ำยาจุ่มเต้านมวัว เพื่อป้องกันการติดเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส อะกาแลคทิเอ*(Streptococcus agalactiae)* ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบของเต้านมวัว (62) ในทางทันตกรรมได้มีการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อโดยวิธีบรอทไดลูชั่น และวิเคราะห์การทำลายเชื้อด้วยวิธีไทม์คิลล์ พบว่าเจลโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 20 และ 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์ และเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์ แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ ตามลำดับ ในเวลา 24 ชั่วโมง(12)และที่ความเข้มข้นสูงขึ้นเป็น 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดตามลำดับภายในเวลาเพียง 1 นาที(13)

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน ทั้งแบบเฉียบพลัน และความเป็นพิษแบบเรื้อรังในหนูขาวและหนูถีบจักร พบว่าหนูทดลองสามารถกินสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ในครั้งเดียวในปริมาณที่สูงถึง 2 กรัม ต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม หรือให้กินติดต่อกันในขนาด 0.5 กรัม ต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัมต่อวัน เป็นระยะเวลา 100 วันได้ โดยไม่ทำให้เกิดพิษ (63) และจากการศึกษาของทัศนีและคณะซึ่งทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก และเซลล์ไลน์สร้างเคอราทินของมนุษย์พบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ทั้งสองชนิด(64) ต่อมาพสุธา และคณะ(14)ได้มีการพัฒนาสูตรน้ำยาบ้วนปากผสมสารโพลีแซคคาไรด์สกัดจากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก(20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งได้รับการจดสิทธิบัตรโดยสำนักงานทรัพย์สินทางปัญญา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่คำขอ 0801004570 ลงวันที่ 5 กันยายน 2551 จากการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่ามีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์ และเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์ แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ที่มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น $1x\ 10^6$ ซีเอฟยู/มล.ได้ร้อยละ 100 ภายในเวลา 1นาที ในขณะที่สูตรน้ำยาบ้วนปากเบสที่ปราศจากสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อเพียงประมาณร้อยละ 50 ซึ่งยังเหลือเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่ถึงประมาณ $1x10^5$ ซีเอฟยู/มล.และจากการทดสอบความระคายเคืองชนิดกึ่งเรื้อรังต่อเนื้อเยื่อช่องปากและความเป็นพิษต่อร่างกายในสัตว์ทดลองชนิดหนูแรท พบว่าไม่มีผลต่อเนื้อเยื่อช่องปาก ค่าเคมีในเลือด และการทำงานของตับและไตของสัตว์ทดลองที่ได้รับน้ำยาบ้วนปากดังกล่าวติดต่อกันเป็นเวลา 21 วัน ซึ่งสูตรน้ำยาบ้วนปากสูตรนี้ได้ผ่านการตรวจสอบคุณภาพตามมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก.) โดยไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โลหะหนัก หรือเชื้อราในน้ำยาบ้วนปาก

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไดร์จากเปลือกทุเรียน มีความสามารถในการยับยั้งและทำลายเชื้อแอกกริเกทิแบกเทอร์ แอกทิโนไมซีเทมคอมิแทนส์ ซึ่งเป็นสาเหตุก่อโรคปริทันต์อักเสบได้ แต่อย่างไรก็ตามนอกจากดังกล่าวแล้ว เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และ พรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ก็เป็นเชื้ออีกกลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญในการก่อโรคปริทันต์อักเสบ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงต้องการทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และ พรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นการศึกษานำร่องก่อนที่จะนำน้ำยาบ้วนปากดังกล่าวไปศึกษาในทางคลินิกต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สายพันธุ์ ATCC 33277

เชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย สายพันธุ์ ATCC 25611

วัสดุ

1.น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ที่ผ่านการเตรียมโดยวิธีของ พสุธา และคณะ ซึ่งได้รับการจดสิทธิบัตรโดยสำนักงานทรัพย์สินทางปัญญา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่คำขอ 0801004570 ลงวันที่ 5 กันยายน 2551

2. อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อชนิดเบรนฮาร์ทอินฟิวชัน (HiMedia Laboratories LTD, Vadhani, Mumbai,india)

3. เลือด (human whole blood;สภากาชาดไทย)

4. เฮมิน (Haemin)

5. วิตามินเค

6. อาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อชนิดบรูเซลลา(Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England)

7. น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ซึ่งผลิตโดยคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. น้ำเกลือ(normal saline) ปราศจากเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.9 สำหรับฉีดเข้าหลอดเลือดดำ (sodium chloride 0.9% for injection) ผลิตโดยบริษัท GHP (General Hospital Products Public Co.,Ltd)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. กระดาษกรองมาตรฐานปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร(Sterile blank disc, DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan USA)

10. Mix gas(ไนโตรเจน 75% ,ไฮโดรเจน 10% , คาร์บอนไดออกไซด์ 5%)

อุปกรณ์

1. ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน(Anaerobic chamber)

2. ตู้นึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน (autoclave)

3. เครื่องปั่นสาร (Centrifuge Model Mikro 20;Hettich,Germany)

4. เครื่องผสมสาร (Vortex mixure)

5. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ(plastic plate) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร

6. ออโต้ปิเปต (Autopipette)ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร

7. ปลายปิเปต (pipette tip) ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร

8. หลอดทดลอง

9. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร

10.บีกเกอร์(Beaker) ขนาด 50 และ 500 มิลลิลิตร

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดจากเปลือกทุเรียน

สารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน และสูตรในการเตรียมน้ำยาบ้วนปากได้รับความอนุเคราะห์จาก พสุธา ธัญญะกิจไพศาล ซึ่งทำการเตรียมตามกรรมวิธีที่ได้รับการจดสิทธิบัตรโดยสำนักงานทรัพย์สินทางปัญญา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่คำขอ 0801004570 ลงวันที่

5 กันยายน 2551 ซึ่งมีส่วนผสมของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก(20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)และมีการทำให้ปราศจากเชื้อด้วยตู้นึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาครั้งนี้ใช้อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อชนิดเบรนฮาร์ทอินฟิวชัน(Brain Heart Infusion, BHI) และอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อชนิดบรูเซลลา (Brucella agar) อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อชนิดเบรนฮาร์ทอินฟิวชันเตรียมโดยการละลายเบรนฮาร์ทอินฟิวชัน 3.7 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อ ด้วยตู้นึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ส่วนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อชนิดบรูเซลลา เตรียมโดยการละลายบรูเซลลา(Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) 4.5 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นเติมเลือด (human whole blood;สภากาชาดไทย) 10 มิลลิลิตรต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร, เฮมิน 100 ไมโครลิตรต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และวิตามินเค 20 ไมโครลิตรต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส สายพันธุ์ ATCC 33277 และพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย สายพันธุ์ ATCC 25611 โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อชนิดเบรนฮาร์ทอินฟิวชันและนำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 5 วัน เพื่อเป็นเชื้อตั้งต้น และทำการปรับความขุ่น ให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland เพื่อให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 1×10^8 ซีเอฟยู/มิลลิลิตร

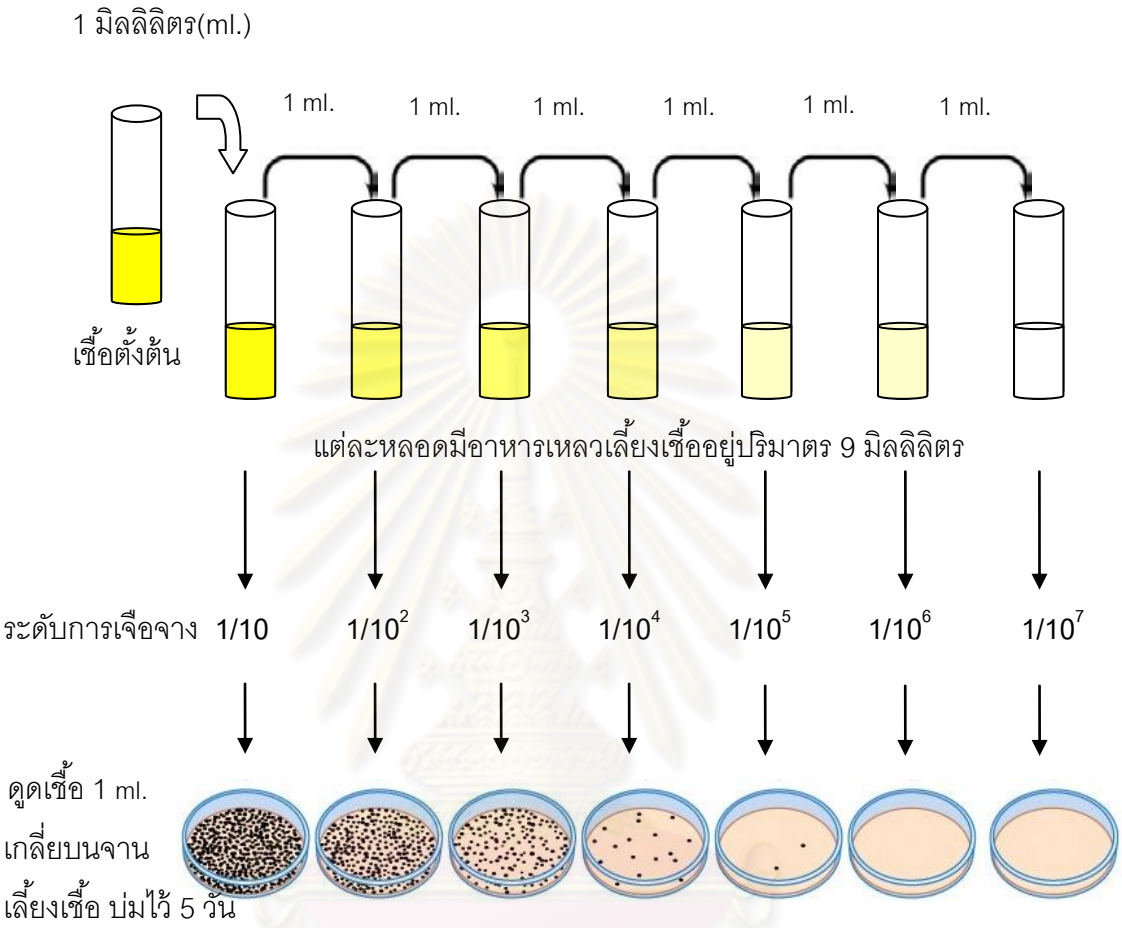
การนับจำนวนเชื้อตั้งต้น

นำเชื้อที่ปรับความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland มาทำการเจือจางเป็นลำดับทีละ 10 เท่า (10-fold serial dilution) โดยการดูดเชื้อที่ปรับความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland มา 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และทำการเจือจางลงเรื่อยๆด้วยวิธีเดียวกัน จากนั้นดูดสารในแต่ละระดับการเจือจางมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาเกลี่ย

ให้ทั่วผิวหน้าอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อบรูเซลลา และทำการเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจนเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เห็นได้ชัดเจนขนาดประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตรที่เกิดในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 20 -200 โคโลนี และทำการคำนวณหาจำนวนเชื้อตั้งต้น (65) ดังแสดงในรูปที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 แสดงวิธีการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์โดยการเจือจางทีละ 10 เท่า



นับจำนวนโคโลนีที่เห็นได้ชัดเจนขนาดประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตรที่เกิดในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 20 -200 โคโลนี และทำการคำนวณหาจำนวนเชื้อตั้งต้นดังนี้

จำนวนเชื้อตั้งตั้น = จำนวนโคโลนี x ส่วนกลับของระดับการเจือจาง

เช่น ที่ระดับการเจือจาง $1/10^3$ นับเชื้อได้ 120 โคโลนี

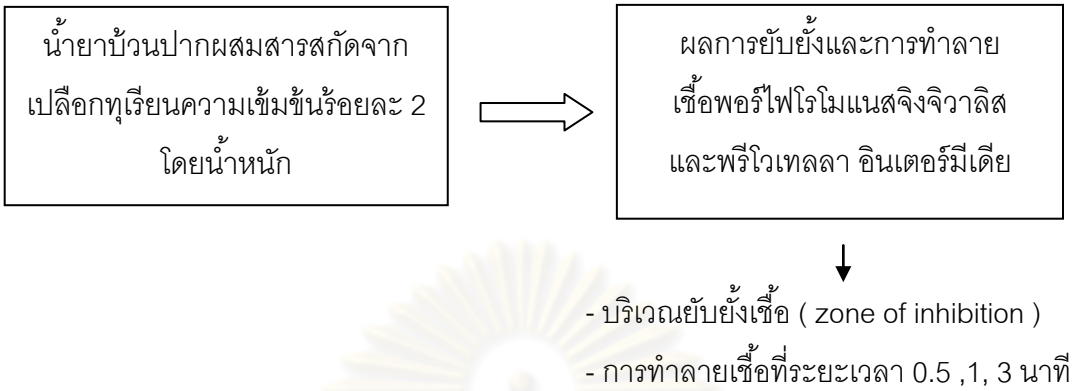
แสดงว่ามีเชื้อตั้งต้นเท่ากับ $120 \times 10^3 = 1.2 \times 10^5$ **Colony forming unit ต่อ มล.**

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก

การทดสอบด้วยวิธี ดิส ดิฟฟิวชั่น (disc diffusion)(66) เริ่มจากนำเชื้อแบคทีเรียพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ที่ปรับความขุ่นเรียบร้อยแล้วเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยให้มีความสม่ำเสมอจนทั่วผิวหน้าอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อชนิดบรูเซลลา จากนั้นนำแผ่นกระดาษกรองมาตรฐานที่ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Sterile blank disc, DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan USA)ที่ได้รับการหยดน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดจากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 30 ไมโครลิตรไว้แล้ว วางลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ โดยมีน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นตัวควบคุมบวก และน้ำเกลือเป็นตัวควบคุมลบ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อปราศจากออกซิเจนเป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อโดยทดลองซ้ำ 30 ครั้ง สำหรับเชื้อแต่ละชนิด

การวิเคราะห์ผลการทำลายเชื้อแบบไทม์คิลล์ (Time kill analysis)(67) เริ่มจากใส่น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 1000 ไมโครลิตรในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อชนิดเบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส หรือพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ที่ปรับความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland แล้วปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร(Vortex mixure) นานประมาณ 5 วินาที ซึ่งภายหลังจากการผสมจะทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักและมีเชื้อประมาณ $1x10^7$ ซีเอฟยู/มล. จากนั้นทำเก็บผลการทดลองที่ 30 วินาที 1นาที และ 3 นาที โดยการดูดสารออกมา 100 ไมโครลิตร เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อบรูเซลลา ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อปราศจากออกซิเจนเป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด โดยมีน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นตัวควบคุมบวกและน้ำเกลือเป็นตัวควบคุมลบ โดยทดลองซ้ำ 10 ครั้ง สำหรับเชื้อแต่ละชนิด

กรอบแนวคิดในการวิจัย



ปัจจัยที่ต้องควบคุม

ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปาก

การปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่น

การควบคุมสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อให้ปราศจากออกซิเจน

การเก็บรวบรวมข้อมูล

การทดลองด้วยวิธี ดิส ดิฟฟิวชั่นจะวัดผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อที่เกิดขึ้น

การวิเคราะห์ผลการทำลายเชื้อแบบไทม์คิลล์ จะวัดผลโดยการบันทึกจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เก็บผลการทดลองที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที และ 3 นาที

การวัดผลทำโดยผู้ทำวิจัยซึ่งผ่านการฝึกหัดจากผู้เชี่ยวชาญแล้ว และทำการปรับมาตรฐานการวัดด้วยการวัดซ้ำกัน 2 ครั้ง (Intra calibration) และเปรียบเทียบผลการวัดกับผู้วัดมาตรฐาน (Gold standard) (Inter calibration) นำมาหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficients)พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ภายในตัวผู้วิจัยเท่ากับ 0.989 และ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เปรียบเทียบกับผู้วัดมาตรฐานเท่ากับ 0.999 ซึ่งแสดงว่า ผลการวัดนั้นสอดคล้องกันและมีความน่าเชื่อถือสูง

การวิเคราะห์ข้อมูล

บริเวณยับยั้งเชื้อที่เกิดขึ้นจากการทดลองโดยวิธีดิส ดิฟฟิวชั่นจะแสดงในรูปค่าเฉลี่ย (Mean)มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร และจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์ผลการทำลายเชื้อแบบไทม์คิลล์จะแสดงอยู่ในรูปค่ามัธยฐาน(Median)ลอคซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร($\log_{10}$ CFU/ml) และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรมเอสพีเอสเอส บนเครื่องคอมพิวเตอร์ระบบปฏิบัติการวินโดวส์ (SPSS for Windows, version 17.0) ดังนี้

1. เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อที่เกิดขึ้น จากน้ำยาบ้วนปากจากสารสกัดเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก , น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และน้ำเกลือ โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) และการทดสอบเชิงซ้อนบอนเฟอโรนี(Bonferroni) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

2. เปรียบเทียบความสามารถในการทำลายเชื้อของน้ำยาบ้วนปากจากสารสกัดเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก , น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และน้ำเกลือ โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ามัธยฐานลอคซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ใช้การทดสอบแบบนอนพาราเมตริก (non parametric test) โดยการเปรียบเทียบลำดับด้วยวิธีแมนวิทนีย์ (Mann-Whitney *U*-test) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3. เปรียบเทียบความสามารถในการทำลายเชื้อของน้ำยาบ้วนปากจากสารสกัดเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที และ 3 นาที โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ามัธยฐานลอคซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ใช้การทดสอบแบบนอนพาราเมตริก (non parametric test) โดยการเปรียบเทียบลำดับด้วยวิธีแมนวิทนีย์(Mann-Whitney *U*-test) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และวัดประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อโดยนำมาคำนวณเป็นร้อยละของการทำลายเชื้อดังนี้

$$\text{ร้อยละของการทำลายเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนเชื้อตั้งต้น} - \text{จำนวนเชื้อที่เหลืออยู่}}{\text{จำนวนเชื้อตั้งต้น}} \times 100$$

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก

จากการศึกษาด้วยวิธีดิส ดิฟฟิวชั่น (ตารางที่ 2) พบว่าน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักสามารถยับยั้งเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และ พรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดียได้ โดยทำให้เกิดบริเวณยับยั้งเชื้อรอบแผ่นกระดาษซับกว้าง 11.0 และ15.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยมีความกว้างของบริเวณยับยั้งเชื้อมากกว่าน้ำเกลือซึ่งไม่เกิดบริเวณยับยั้งเชื้อเลยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนพบว่ามีความกว้างน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.001$) โดยน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งเชื้อกว้าง 18.3, 22.2 ตามลำดับ (รูปที่ 2และ 3)

ผลการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก

จากการวิเคราะห์ผลการทำลายเชื้อแบบไทม์คิลล์ (ตารางที่ 3) พบว่าน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดจากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก มีความสามารถในการฆ่าเชื้อทั้งสองชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.001$) เมื่อเทียบกับน้ำเกลือ โดยพบว่าเมื่อน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดจากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก สัมผัสกับเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 30 วินาที 1 และ 3 นาที พบว่าสามารถฆ่าเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และ พรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดียได้ร้อยละ 100 โดยความสามารถในการฆ่าเชื้อที่ระยะเวลา 30 วินาที 1 นาที และ 3 นาทีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนพบว่าน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดจากเปลือกทุเรียนสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้ไม่แตกต่างจากคลอร์เฮกซิดีน

ตารางที่ 2 แสดงความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อจากการทดสอบด้วยวิธีดิส ดิฟฟิวชั่น

แบคทีเรีย	ค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน(มม.)		
	น้ำเกลือ	น้ำยาบ้วนปากเปลือกทุเรียน	0.1% คลอร์เฮกซิดีน
Pg	0	11.0 ± 1.17(*)	18.3± 1.86 (*,**)
Pi	0	15.5 ± 1.81(*)	22.2± 1.72(*,**)

Pg หมายถึง เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส

Pi หมายถึง เชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย

* หมายถึง ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก และน้ำยาคลอร์เฮกซิดีน กับน้ำเกลือที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.001$

** หมายถึง ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักกับน้ำยาคลอร์เฮกซิดีนที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.001$

ใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) และการทดสอบเชิงซ้อนบอนเฟอโรนี(Bonferroni)

รูปที่ 2 แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อจากการทดสอบด้วยวิธีดิส ดิฟฟิวชั่นของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อจากการทดสอบด้วยวิธีดิส ดิฟฟิวชั่นของเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่รอดชีวิตในรูปของ log_{10}(CFU/ml) ภายหลังการสัมผัสกับน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก เป็นระยะเวลานาน 0.5 ,1 และ 3 นาที

แบคทีเรีย	ระยะเวลาที่สัมผัส(นาที)	จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่รอดชีวิตในรูปค่ามัธยฐานของ Log_{10} CFU/ml		
		น้ำเกลือ	น้ำยาบ้วนปากเปลือกทุเรียน	0.1% คลอร์เฮกซิดีน
Pg	0.5	7.0	0*	0*
	1	7.0	0*	0*
	3	7.0	0*	0*
Pi	0.5	6.8	0*	0*
	1	6.97	0*	0*
	3	6.92	0*	0*

Pg หมายถึง เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส

Pi หมายถึง เชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย

* หมายถึง ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก และน้ำยาคลอร์เฮกซิดีน กับน้ำเกลือที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.001$

ใช้สถิติ Mann-Whitney *U*-test

บทที่ 5

การอภิปรายและสรุปผล

อภิปรายผลการวิจัย

สารสกัดจากธรรมชาติในประเทศไทยหลายชนิดได้รับการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งและการทำลายเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก โดยหวังที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ช่วยในการดูแลและรักษาโรคในช่องปากต่อไป เช่น ใบข่อย(7)(55),ใบฝรั่ง(9),ฟ้าทะลายโจร(8),ไม้จิ้(56),ใบสะเดา(10) และใบสาบเสือ(10)เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดบางชนิดนั้นหาได้ค่อนข้างยาก บางชนิดมีรสชาติไม่ดี เช่น ใบข่อยซึ่งมีรสชาติเบื่อเมา จึงมักนำมาทำยาไล่แมลง โดยสารสกัดที่สนใจศึกษาในครั้งนี้ คือสารสกัดจากเปลือกทุเรียนที่เป็นวัสดุธรรมชาติซึ่งเป็นขยะทางการเกษตรที่มีจำนวนมาก, หาได้ง่ายและสารสกัดที่ได้มีรสชาติดีคือมีรสหวานอมเปรี้ยว ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการนำขยะทางการเกษตรมาพัฒนาให้เกิดประโยชน์และลดปัญหาสิ่งแวดล้อม

การศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากที่มีโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนในการยับยั้งและทำลายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ โดยผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ พสุธา และคณะ(14) ซึ่งพบว่าน้ำยาบ้วนปากผสมสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์ และเชื้อแอกทิโนบาซีลัส แอกทิโนไมซีเทมโคมิแทนส์ ที่มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1x 10^6 ซีเอฟยู/มล. ได้ร้อยละ100 ภายในเวลา 1 นาที และจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าน้ำยาบ้วนปากผสมสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากเปลือกทุเรียนสามารถทำลายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดียที่มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 1x 10^7 ซีเอฟยู/มล. ได้ร้อยละ 100 ภายในเวลา 30 วินาที ซึ่งเป็นการสนับสนุนประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากที่มีสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ในการยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุก่อโรคปริทันต์อักเสบ

สำหรับกลไกในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนนั้นปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจน แต่จากการศึกษาของ Thunyakitpisal และคณะ(68)พบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่ความเข้มข้น 100 มก./มล. สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียสเตร็ปโตค็อกคัส มิวแทนส์ และเชื้อแอกทิโนบาซีลัส แอกทิโนไมซีเทมโคมิแทนส์ได้ร้อยละ 100

ภายในเวลา 1 นาที และเมื่อนำมาตรวจดูด้วยกล้องอิเล็กตรอนไมโครสโคปชนิดส่องกราด พบว่าผนังเซลล์ของเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัส มิวแทนส์ และแอกทิโนบาซีลัส แอกทิโนไมซีเทมโคมิแทนส์มีการพองตัวขึ้นเป็นฟอง บางเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและบางเซลล์มีการแตกออก ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเมื่อเชื้อแบคทีเรียสัมผัสกับน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีน ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนน่าจะไปทำปฏิกิริยากับผนังเซลล์แบคทีเรียจนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์และเกิดการตายในที่สุด โดยจากการศึกษาโครงสร้างของสารโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนพบว่ามีโครงสร้างเป็นเพกตินโพลีแซคคาไรด์(60) ซึ่งจากการศึกษาสารสกัดโพลีแซคคาไรด์กลุ่มเพกตินพบว่ามีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและเชื้อฉวยโอกาสได้หลายชนิด โพลีแซคคาไรด์กลุ่มนี้มีองค์ประกอบย่อยเป็นสายของกรดกาแลกทูโรนิกยึดกันด้วยไกลโคซิดิก สามารถละลายน้ำได้และเมื่อละลายน้ำแล้วส่วนกรดกาแลกทูโรนิกจะแตกตัว เกิดปลายด้านที่เป็นกลุ่มคาร์บอกซิล ซึ่งมีประจุเป็นลบ สามารถจับกับประจุบวกที่ผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถของผนังเซลล์ในการปล่อยให้สารผ่านเข้าออกจากเซลล์ จึงส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตต่อได้ (69) หรือเกิดจากการที่กรดกาแลกทูโรนิกไปจับกับโปรตีนพอรินทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการคัดกรองสารของพอริน โมเลกุลที่เหลือของโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนจะผ่านเข้าไปในเซลล์ทำให้เกิดการเสียสมดุลของเซลล์ และตายไปในที่สุด (70) นอกจากนี้ยังมีสารศึกษาในไคโตซาน ซึ่งเป็นสารสกัดกลุ่มเพกตินที่ได้จากสัตว์ ซึ่งในปัจจุบันถูกนำมาเป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์หลายชนิด พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้จากการที่ประจุบวกของกลุ่มอะมิโนของสายพอลิเมอร์สามารถจับกับประจุลบที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียในส่วนไลโปพอลิแซคคาไรด์, กรดทิโคอิก, กรดทิคูโรนิค หรือโพลีแซคคาไรด์ที่แคปซูลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการปล่อยให้สารและแร่ธาตุต่างๆ ผ่านเข้าออกจากเชื้อแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ หรืออาจเกิดจากไคโตซานแทรกเข้าไปภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียและมีผลรบกวนการอ่านรหัสของยีน ทำให้ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย(71) ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่าโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนน่าจะมีกลไกการฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยการแตกตัวให้ประจุต่างๆ ทั้งประจุบวก และประจุลบ หรือแตกตัวให้กรดกาแลกทูโรนิก ซึ่งจะไปจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียจนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ของผนังเซลล์ แล้วทำให้โมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์แทรกเข้าไปในเซลล์แล้วทำให้เซลล์เกิดการแตกและตายในที่สุด ซึ่งกลไกที่กล่าวมานี้เป็นเพียงส่วนหนึ่ง คาดว่าน่าจะมีกลไกอื่นๆ ที่อาจเกิดขึ้นได้อีก เช่น จากการศึกษาสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ในกลุ่มเพกตินอีกชนิดหนึ่ง คือ ยางอะคาเซีย ซึ่งเป็นพืชที่พบว่ามีการใช้มาตั้งแต่อดีตในแถบทวีปแอฟริกาและเอเชีย พืชชนิดนี้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส ที่มีความสำคัญในกระบวนการสร้างอาหารของเชื้อทำให้เชื้อหยุดเจริญเติบโตและตายในที่สุด(54)

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ทำการทดสอบความสามารถของน้ำยาบ้วนปากจากสองวิธีคือ การทดสอบด้วยวิธีดิส ดิฟฟิวชั่นและวิเคราะห์การทำลายเชื้อแบบไทม์คิลล์ โดยการทดสอบการยับยั้งเชื้อด้วยวิธีดิส ดิฟฟิวชั่น ซึ่งอาศัยการแพร่ของยาหรือสารทดสอบจากแผ่นกระดาษกรองสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีดิส ดิฟฟิวชั่นเป็นการทดสอบที่ทำได้ง่าย และราคาถูกเมื่อเทียบกับวิธีอื่น แต่อย่างไรก็ตามผลที่ได้จะเป็นการวัดในเชิงคุณภาพ เนื่องจากการแปลผลบ่งชี้ว่ายาหรือสารทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อหรือไม่เท่านั้น ไม่แสดงค่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ นอกจากนี้การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนและน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนโดยการพิจารณาจากความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อที่เกิดขึ้นรอบกระดาษกรองนั้นอาจไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง เนื่องจากบริเวณยับยั้งเชื้อที่เกิดขึ้น นอกจากจะแปรผันตามความสามารถในการยับยั้งเชื้อแล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆอีกด้วย เช่น ความสามารถในการแพร่ของยาหรือสารทดสอบบนอาหารวุ้น เป็นต้น(72) ดังนั้นหากต้องการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาต่างชนิดกันโดยพิจารณาจากความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น จะต้องมีการศึกษาถึงอัตราการแพร่ของยาแต่ละชนิดก่อน และใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม (Analysis of Covariance: ANCOVA)แทนสถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) ซึ่งจะช่วยลดปัจจัยความผันแปรหรือความแตกต่างของสารแต่ชนิดได้

สำหรับการวิเคราะห์การทำลายเชื้อแบบไทม์คิลล์ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียจะสัมผัสกับสารทดสอบโดยตรงนั้น พบว่าน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดียที่มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 1x 10^7 ซีเอฟยู/มล. ได้ร้อยละ 100 ภายในเวลา 30 วินาที ซึ่งให้ผลเทียบเท่ากับน้ำยาคลอร์เฮกซิดีน ซึ่งเป็นสารเคมีบำบัดเฉพาะที่ ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการควบคุมคราบจุลินทรีย์ แต่ก็มักก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์หลายประการ(5,6)นอกจากนี้สารสกัดจากธรรมชาติที่มีอยู่ในปัจจุบัน เช่น น้ำมันหอมระเหย(50) ได้แก่ ไทมอล, ยูคาลิปตอล, เมนทอลและเมทิลซาลิไซเลท หรือสารสกัดจากสมุนไพร เช่น แซงกวินารีน(73) ก็มักก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ เช่น มีรสขม ฟันและวัสดุบูรณะติดสีน้ำตาลหรือดำ และอาจทำให้เยื่อบุผิวมีการลอกหลุดแล้วทำให้เกิดความรู้สึกปวดแสบปวดร้อนได้เช่นกัน ดังนั้นการนำน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดจากเปลือกทุเรียนที่ไม่มีรสขม มีความปลอดภัย ไม่มีกลิ่นทุรียนและไม่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์มาใช้ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคราบจุลินทรีย์ ก็น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ นอกจากนี้ยังเป็นการนำขยะทางการเกษตรมาพัฒนาให้เกิดประโยชน์และลดปัญหาสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

การศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษานำร่องในห้องปฏิบัติการเท่านั้นซึ่งผลของการใช้สารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนต่อเชื้อแบคทีเรียในช่องปากมนุษย์นั้น อาจไม่เป็นไปตามผลที่ได้จากห้องปฏิบัติการ เนื่องจากในร่องเหงือกและร่องลึกปริทันต์มีน้ำเหลืองเหงือกและในช่องปากมีน้ำลายที่คอยชะล้างและลดความเข้มข้นของสารลง รวมทั้งไกลโคโปรตีนในน้ำลายอาจจับกับสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ได้ ทำให้สารสกัดไม่สามารถสัมผัสกับแบคทีเรียในช่องปากได้โดยตรงทั้งหมด โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดียซึ่งเจริญได้ดีในสภาวะปราศจากออกซิเจน และมักอยู่ภายในร่องลึกปริทันต์ ดังนั้นการบ้วนปากด้วยน้ำยาบ้วนปากซึ่งน้ำยาจะแทรกลงไปใต้เหงือกได้เพียง0.2 มิลลิเมตรเท่านั้น(74) จึงไม่สามารถสัมผัสกับเชื้อทั้งสองชนิดได้เต็มที่ ดังนั้นการนำน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนมาใช้ทางคลินิกเพื่อหวังผลฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดนั้นอาจไม่ได้ผลเหมือนการทดลองในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงอาจจะนำมาใช้ในรูปแบบของน้ำยาชะล้างภายในร่องลึกปริทันต์ ซึ่งจากการศึกษาของ Braun และ Ciancio(75) พบว่าการฉีดล้างภายในร่องลึกปริทันต์โดยหลอดยาพลาสติกพร้อมเข็มปลายที่อ่อนลึกประมาณ 1 มิลลิเมตร สามารถทำให้น้ำยาลงไปได้ลึกถึงร้อยละ 90 ของร่องลึกปริทันต์ที่ลึกน้อยกว่า 6 มิลลิเมตร และลงไปได้ลึกร้อยละ 64 ของร่องลึกปริทันต์ที่ลึกมากกว่า 6 มิลลิเมตร แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียในช่องปากซึ่งมีการดำรงชีวิตอยู่ในรูปของไบโอฟิล์มและมีไกลโคแค็ลลิกซ์คลุมที่ผิวป้องกันการผ่านเข้าออกของสารเคมี(20)ซึ่งอาจทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อลดลงได้ ดังนั้นการนำน้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนมาใช้จึงควรต้องมีการศึกษาต่อไปถึงรูปแบบและวิธีการนำมาใช้ทางคลินิกที่เหมาะสม เช่น อาจนำมาใช้ชะล้างภายในร่องลึกปริทันต์ร่วมกับการขูดหินน้ำลายและเกลารากฟันเป็นต้น นอกจากนี้ควรต้องมีการศึกษาถึงผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้เมื่อนำมาใช้ในช่องปากมนุษย์เพื่อเปรียบเทียบผลกับน้ำยาที่มีใช้ในปัจจุบัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการวิจัย

น้ำยาบ้วนปากผสมสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักสามารถยับยั้งและทำลายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสและพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดียได้โดยสามารถทำลายเชื้อทั้งสองชนิดได้ถึงร้อยละ 100 ภายในเวลา 30 วินาที

รายการอ้างอิง

(1) สาธารณสุข,กระทรวง,กรมอนามัย,กองทันตสาธารณสุข.ผลการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติ ครั้งที่ 6 ,2549-2550.

(2) Consensus report for periodontal disease,pathogenesis and microbial factors. Annals of Periodontology (1996): 926-32.

(3) Boutaga, K., van Winkelhoff, A.J., Vanderbroucke-Grauls, C.M. and Savelkoul, P.H. The additional value of real –time PCR in the quantitive detection of periodontal pathogens. Journal of Clinical Periodontology 33(June 2006): 427-33.

(4) Loesche, W.J., Syed, S.A., Laughon, B.E. and Stoll, E. The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. Journal of Periodontology 53(April 1982): 223-30.

(5). Greenstein, G., Berman, C. and Jaffin, R. Chlorhexidine an adjunct to periodontal therapy. Journal of Periodontology 57(June 1995):370-7.

(6). Lang, N.P and Brecx, M.C. Chlorhexidine digluconate – an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. Journal of Periodontal Research 21(November 1986):74-89.

(7) Taweechaisupapong, S. Singhara, S. and Choopan, T. Antimicrobial effect of *Streblus asper* leaf exact on selected anaerobic bacteria. The Journal of the Dental Association of Thailand 52(July-August 2002):227-34.

(8) ชลธิชา อมรฉัตร, เพชรรัตน์ ไกรวพันธุ์, วีระชัย ไกรวพันธุ์ และ เทอดพงษ์ ตรีรัตน์. ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในช่องปากของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร.วารสารทันตแพทยศาสตร์ 41(กรกฎาคม-สิงหาคม 2534):178-85.

(9) Kraivaphan, V., Kraivaphan, P., Amornchat, C., Triratana, T. and Pobruksa, C. The clinical effect of a mouthrinse containing *Psidium guajava* extract on

plaque formation. The Journal of the Dental Association of Thailand 44 (March-April 1994):56-60.

(10) Rodanant, P., Sae-Lim, P., Suksamrarn, A. and Kuvatanasuchati, J. Antimicrobial activity of Thai medical plants (*Murraya paniculata, Azadirachta indica var. Siamensis,Chromolaena odorata*) against periodontopathic bacteria. Mahidol Dental Journal 30(2010):63-72.

(11) Lipipun, V., Nantawanit, N. and Pongsamart, S. Antimicrobial activity (in vitro) of polysaccharide gel from durian fruit-hulls. The Songklanakarin Journal of Science and Technology 24(January-March 2002): 31-8.

(12) Musikapong, P., Thunyakitpisal, P. and Pongsamart, S. Antimicrobial activity of polysaccharide gel from durian fruit-hulls against *Streptococcus mutans* and *Actinomyces actinomycetemcomitans*. Chulalongkorn University Dental Journal 28(2005):137-44.

(13) Saladyanant, T., Hongprasong, N., Ponsamart, S., Apinhasmit, W. and Thunyakitpisal, P. Polysaccharide gel from durian fruit-hall extracts: antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Chulalongkorn University Dental Journal 30 (September-December 2007): 235-44.

(14) พสุธา ธัญญะกิจไพศาล, สุนันท์ พงษ์สามารถ และ วิจิตร บรรลุนารา. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบยาสีฟันและน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่มีส่วนผสมของสารโพลีแซคคาไรด์สกัดจากเปลือกทุเรียน ระยะที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.2551.(เอกสารไม่ตีพิมพ์)

(15) Loe, H., Theilade, E. and Jensen, S.B. Experimental gingivitis in man. Journal of Periodontology 36(May-June 1965):177-87.

(16) Genco, R.J., Evans, R.T. and Ellison, S.A. Dental research in microbiology with emphasis on periodontal disease. The Journal of the American Dental Association 78(May 1969):1016-36.

(17) Socransky, S.S. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. Journal Dental Research 49(March-April 1970): 203-22.

(18) Page, C. Pathogenic mechanism. In Periodontal Disease.pp.221-62 Philadelphia: Lea and Febiger,1989.

(19) Page, R.C. and Schroeder, H.E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. Laboratory Investigation 34(March 1976) :235-49.

(20) Socransky, S.S. and Haffajee, A.D. Dental biofilm:difficult therapeutic targets. Periodontology 2000 28(January 2002):12-55

(21) Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cgini, M.A., Smith, C. and Kent, R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. Journal of Clinical Periodontology 25 (February 1998):134-44.

(22) Paster, B.J., Olsen, I., Aas, J.A. and Dewhirst, F.E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. Periodontology 2000 42(October 2006):80-7.

(23) Socransky, S.S. and Haffajee, A.D. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000 38(June 2005):135-87.

(24) Mombilli, A., Lang, N. P., Bürgin, W. B. and Gusberti, F. A. Microbial changes associated with the development of puberty gingivitis. Journal of Periodontal Research 25 (November 1990):331-8.

(25) Moore, W.E.C., et al. Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. Infection and Immunology 42(November 1983):510-5.

(26) Socransky, S.S. and Haffajee, A.D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. Journal of Periodontology 63(April 1992):322–31.

(27) van Winkelhoff, A.J., Loos, B.G., van der Reijden, W..A. and van der Velden, U. *Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. Journal of Clinical Periodontology 29(November 2002) :1023-8.

(28) Kawada, M., et al. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in relation to periodontal status assessed by real-time PCR. Oral Microbiology and Immunology 19 (October 2004): 289-92.

(29) Haffajee, A.D and Socransky, S.S. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease.Periodontology 2000 5(June 1994): 78-111.

(30) Holt, S.C. and Ebersole, J.L. *Porphyromonas gingivalis* , *Treponema denticola,* and *Tannerella forsythia* : the "red complex", a prototype polybacteria pathogenic consortia in periodontitis," Periodontology 2000 38(June 2005): 72-122.

(31) Sandros, J., Papapanou, P.N. and Dahlen, G. *Porphyromonas gingivalis* invades oral epithelial cell in vitro. Journal of Periodontal Research 28(January-November1993): 219-26.

(32) Dzink, J.L., Gibbons, R.J., Childs III, W.C. and Socransky, S.S. The predominant cultivable microbiota of crevicular epithelial cells. Oral Microbiology and Immunology 4 (March1989):1-5.

(33) Madianos, P.N., Papapanou, P.N. and Sandros, J. *Porphyromonas gingivalis* infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. Infection and Immunology 65 (October 1997): 3983-90.

(34) Soder, B., Airila Mansson, S., Soder, P.O., Kari, K. and Meurman, J. Level of matrix metalloproteinase-8 and 9 with simultaneous presence of periodontal pathogens in gingival crevicular fluid as well as matrix metalloproteinase-

9 and cholesterol in blood. Journal of Periodontal Research 41(January 2006): 411-7.

(35) Dorn, B.R., Leung, K.L. and Progulske-Fox, A. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. Infection and immunology 66 (December 1998): 6054-7.

(36) Van dr Velden, U.F. and Abbas Winkel, E.G. Probing considerations in relation to susceptibility to periodontal breakdown. Journal of Clinical Periodontolo gy13 (November 1986):894-9.

(37) ชนินทร์ เตชะประเสริฐวิทยา.โรคปริทันต์และกระบวนการรักษา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร:เยียร์บุ๊คพับลิชเชอร์.2544

(38) Gürkan, A., Emingil, G., Cınarcık, S. and Berdeli, A. Post-treatment effects of subantimicrobial dose doxycycline on clinical parameters and gingival crevicular fluid transforming growth factor-β_1 in severe, generalized chronic periodontitis. International Journal of Dental Hygiene 6(May 2008):84-92.

(39) Addy, M., Hassan, H., Moran,J., Wade, W. and Newcombe, R. Use of antimicrobials containing acrylic strips in treatment of chronic periodontal disease. A three month follow-up study. Journal of Periodontology 59(September 1988):557-64.

(40) Mandel, I.D. Chemotheraputic agents for controlling plaque and gingivitis. Journal of Clinical Periodontology 15(September 1988):488-98.

(41) Moran, J.M. Home-use oral hygiene products: mouthrinses. Periodontol 2000 48(October 2008): 42-53.

(42) Gjermo, P. Chlorhexidine and related compound. Journal of Periodontal Research 68(Spec.Iss) (1989):1602-8.

(43) Lang, N.P. et al. Effects of supervised chlorhexidine mouthrinses in children. Journal of Periodontal Research 7(January 1982):101-11.

(44) Goodman, C.H. and Robinson, P.J. Periodontal therapy: reviewing subgingival irrigations and future considerations. The Journal of the American Dental Association 121(October 1990):541-3.

(45) Addy, M. Hibitane in treatment of aphthous ulceration. Journal of Clinical Periodontology 4 (December 1977) :108-16.

(46) Gordon, J.M., Lamster, I.B. and Seiger, M.C. Efficacy of Listerine antiseptic in inhibiting the development of plaque and gingivitis. Journal of Clinical Periodontology 12 (September 1985): 697-704.

(47) Siegrist, B.E., Gusberti, F.A., Brecx, M.C., Weber, H.P. and Lang, N.P. Efficacy of supervised rinsing with chlorhexidine digluconate in comparison to phenolic and plant alkaloid compounds. Journal of Periodontal Research 21(suppl) (1986):60-73.

(48) Camosci, D.A. and Tinanoff, N. Anti-bacterial determinants of stannous fluoride. Journal of Dental Research 63(September 1984):1121-5.

(49) Wolff, L.F., Pihlstrom, B.L., Bakdash, B.M., Aeppli, D.M. and Bandt, C.L. Effect of toothbrushing with 0.4% stannous fluoride and 0.22% sodium fluoride gel on gingivitis for 18 months. The Journal of the American Dental Association 199(1989):283-9.

(50) Bonesvoll, P. and Gjermo, P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque inhibiting effect in the human mouthrinse. Archives of Oral Biology 23(1978): 289-94.

(51) Lobene, R.R. Clinical studies of plaque control agents: an overview. Journal of Dental Research 58(December 1979):2381-8.

(52) Muruniak, J., Clark, W.B. and Walker, C.B. The effect of 3 mouthrinses on plaque and gingivitis development. Journal of Clinical Periodontology 19 (January 1992): 19-23.

(53) Needleman, I.G., Pandya, N.V., Smith, S.R. and Foyle, D.M. The role of antibiotics in the treatment of periodontitis.(Part 2- Controlled drug delivery) European Journal of Prosthodontics and Restorative Dentistry 3(March 1995):111-7.

(54) Clark, D.T, Gazi, M.I., Cox, S.W., Eley, B.M. and Tinsley, G.F. The effects of *Acacia Arabica* gum on the *in vitro* growth and protease activities of periodontopathic bacteria. Journal of Clinical Periodontology 20(April 1993):238-43.

(55) เทอดพงษ์ ตรีรัตน์ และ บุญนิตย์ ทวีบูรณ์. การทดสอบประสิทธิภาพส่วนสกัดของข่อยต่อเชื้อสเตร็ปโตค็อกคัส มิวแตนส์ และสเตร็ปโตค็อกคัส ซาไลวาเรียส. วารสารทันตแพทยศาสตร์ 41(2553):178-85.

(56) กัลยา ตัณฑชุณห์, เทอดพงษ์ ตรีรัตน์ และ สุรินทร์ สูอำพัน. การทดสอบสารประกอบสกัดจากไม้จี้ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแตนส์ และ แอกติโนบอซิลลัสแอคติโนมัยซิเต็ม โคมิแตนส์. วารสารทันตแพทยศาสตร์ 43 (พฤศจิกายน-ธันวาคม2536):336-40.

(57) เพชรรัตน์ ไกรวพันธุ์, ชลธิชา อมรฉัตร, เทิดพงษ์ ตรีรัตน์, กัลยา ตัณฑชุณห์ และสุรินทร์ สูอำพัน. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสีเสียดเหนือต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส แอคทิโนแบซิลลัส แอคทิโนไมซีเทมโคมิแทนส์ และสเตร็ปโตค็อกคัส มิวแทนส์. วารสารทันตแพทยศาสตร์ 43(พฤศจิกายน-ธันวาคม 2536):175-82.

(58) Torrungruang, K., Vichienroj, P. and Chutimaworapan, S. Antibacterial activity of mangosteen pericrap extract against cariogenic *Streptococcus mutans*. Chulalongkorn University Dental Journal 30(2007):1-10.

(59) Pongsamart, S. and Panmaung, T. Isolation of polysaccharide from fruit-hulls of durian (*Durio zibethnus L.*). The Songklanakarin Journal of Science and Technology 20(July-September 1998): 323-32.

(60) Hokputsa, S. et al. Water soluble polysaccharides with pharmaceutical importance from Durian rinds (*Durio zibethnus Murr.*): isolation, fractionation, characterization and bioactivity. Carbohydrate Polymers 56(May 2004): 471-81.

(61) พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์. เพกทิน: พอลิเมอร์ชีวภาพทางเภสัชกรรม. นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร.2551.

(62) Maktrirat, R., Phaunfoong, T., Ajariyakhajorn, K., Lipipun, V. and Sunanta Pongsamart. Antibacterial activity of polysaccharide gel from durian rinds against field isolates of *Streptococcus spp.* causing mastitis in dairy cows and it application as a teat dip. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology. 2005.pp.18 – 22.

(63) Pongsamart, S., Tawatsin, A. and Sukrong, S. Long-term consumption of polysaccharide gel from durian fruit-hulls in mice. The Songklanakarin Journal of Science and Technology 23(2001): 56-62.

(64) ทัศนี สลัดยะนันท์. การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและความเป็นพิษของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์ เจลจากเปลือกทุเรียนในห้องปฏิบัติการ.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ,สาขาบริทันต์,ภาควิชาบริทันต์,คณะทันตแทพยศาสตร์,จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ,2549.

(65) Benson, H.J, International edition microbiological applications laboratory manual in general microbiology. 8th ed. Mc Graw-Hill: Mc Graw-Hill company,Inc, 2003.

(66) Jorgensen, J.H. and Turnidge, J.D. Susceptibility test methods: Dilution and disk diffusion methods. In Manual of Clinical Microbiology.pp.1108-27.Washington, D.C: Murray 2003.

(67) Credito, K.L., Jacobs, M.R. and Appelbaum, P.C. Time-kill studies of the antianaerobe activity of garenooxacin compared with those of nine other agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47(April 2003):1399-402.

(68) Thunyakitpisal, P., Saludyanant, T., Hongprasong, N., Pongsamart, S., and Apinhasmit, W. Antibacterial activity of polysacchaside gel extract from fruit rinds of *Durio zibethinus Murr*. against oral pathogenic bacteria. Journal of Investigative and Clinical Dentistry 1 (November 2010) :1-6.

(69) El-Nakeeb, M.A. and Yousef, R.T. Study of antimicrobial action of pectin.I. Antibacterial and antifungal activities of pectin.Planta Medical 18 (May 1970) :201-9.

(70) Young, D.H., Kohle, H. and Kauss, H. Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured Glycine max and Phaseolus vaigaris cells. Plant Physiology 70(November 1982):1449-54.

(71) Muzzarelli, R. et al. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitsan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 34(October 1990):2019-23.

(72) ภัทรชัย กีรติสิน. Antimicrobial susceptibility testing.วิทยาแบคทีเรียการแพทย์, กรุงเทพมหานคร,วี เจ พริ้นติ้ง.2549.

(73) Ciancio, S.G. Agents for management of plaque and gingivitis. Journal of Dental Research 71(July 1992):1450-54.

(74) Pitcher, G.R., Newman, H.N. and Strahan, J.D. Access to subgingival plaque by disclosing agents using mouthrinsing and direct irrigation. Journal of Clinical Periodontology 7(August 1980):300-8.

(75) Braun, R. and Ciancio,S. Subgingival delivery by an oral irrigation device. Journal of Periodontology 63(May 1992):469-72.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวรัชนู รูปทรง เกิดวันที่ 19 กันยายน 2525 ที่จังหวัดสุโขทัย จบปริญญาทันตแพทยศาสตรบัณฑิต จากมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ปีการศึกษา 2550 ปัจจุบันทำงานเป็นอาจารย์ประจำภาควิชาทันตกรรมป้องกัน สาขาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย