

ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากมังคุดต่อเชื้อบางชนิดที่ทำให้เกิดโรคในช่องปาก



นางสาวพิราภรณ์ วิเชียรโรจน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาปริทัศน์ศาสตร์ ภาควิชาปริทัศน์วิทยา

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-6543-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CRUDE EXTRACT FROM *GARCINIA MANGOSTANA*  
AGAINST SELECTED ORAL PATHOGENS

Miss Piraporn Vichienroj

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Periodontics

Department of Periodontology

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-17-6543-6

481775

Thesis Title Antimicrobial activity of crude extract from *Garcinia mangostana* against selected oral pathogens.

By Miss Piraporn Vichienroj

Field of study Periodontics

Thesis Advisor Kitti Torrungruang, Ph.D.

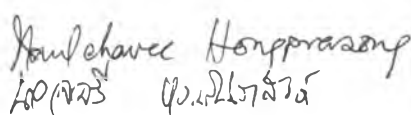
Thesis Co-advisor -

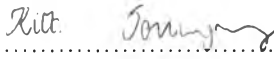
---

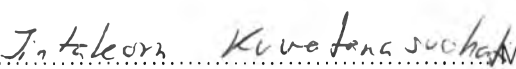
Accepted by the Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree


 ..... Dean of Faculty of Dentistry  
(Assistant Professor Thitima Pusiri)

THESIS COMMITTEE

 ..... Chairman  
(Associate Professor Naulchavee Hongprasong)

 ..... Thesis Advisor  
(Kitti Torrungruang, Ph.D.)

 ..... Member  
(Associate Professor Jintakorn Kuvatana suchati)

 ..... Member  
(Assistant Professor Mano Kuratana, Ph.D.)

 ..... Member  
(Assistant Professor Rangini Mahanonda, Ph.D.)

พิราภรณ์ วิเชียรโรจน์ : ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อเชื้อบางชนิดที่ทำให้เกิดโรคในช่องปาก (ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CRUDE EXTRACT FROM GARCINIA MANGOSTANA AGAINST SELECTED ORAL PATHOGENS) อ. ที่ปรึกษา: อ.ทพ.ดร.กิตติ ต. รุ่งเรือง, 66 หน้า. ISBN 974-17-6543-6.

มังคุดเป็นผลไม้ที่พบในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สารสกัดจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ต้านจุลชีพหลายชนิด ส่วนประกอบที่ออกฤทธิ์รุนแรงในการต้านจุลชีพคืออัลฟาแมงโกสทิน จุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด ต่อจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุอันได้แก่สเตรปโตคอกคัส มิวแทนส์ และจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคปริทันต์อีกเสบอันได้แก่พอร์ไฟโรโมนเนส จินจิวัลลิส และแอคติโนเบซิลลัส แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ สารสกัดหยาบจากมังคุดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ประกอบด้วยอัลฟาแมงโกสทินประมาณ 70-80 % ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบจากมังคุดมีประสิทธิภาพเท่ากับอัลฟาแมงโกสทินบริสุทธิ์ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอกคัส มิวแทนส์ และพอร์ไฟโรโมนเนส จินจิวัลลิส ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตและค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อสเตรปโตคอกคัส มิวแทนส์เท่ากับ 0.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเทียบเท่าฤทธิ์ของคลอเฮกซิดีน และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตและค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จินจิวัลลิสเท่ากับ 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าคลอเฮกซิดีน สารสกัดจากมังคุดไม่มีผลต่อการเติบโตของเชื้อแอคติโนเบซิลลัส แอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ คุณสมบัติฆ่าเชื้อตามระยะเวลาพบว่าสารสกัดหยาบจากมังคุดที่ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอกคัส มิวแทนส์ได้ทั้งหมดในเวลา 90 นาที ที่ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จินจิวัลลิสถูกฆ่าทั้งหมดภายในเวลา 30 นาที จากฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดจากมังคุดต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในช่องปาก สามารถนำไปสู่การพัฒนาสารตัวใหม่เพื่อนำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคฟันผุและโรคปริทันต์ต่อไป

ภาควิชา.....ปริทันตวิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต..... *ปิร่าภรณ์ วิเชียรโรจน์*  
 สาขาวิชา.....ปริทันตศาสตร์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *ก้อง วัชรวิเชียร*  
 ปีการศึกษา.....2548..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... —

# # 4576114032 : MAJOR PERIODONTICS

KEY WORD: *GARCINIA MANGOSTANA* / MANGOSTEEN / ANTIMICROBIAL / MANGOSTIN / ORAL PATHOGEN

PIRAPORN VICHENROJ : ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CRUDE EXTRACT FROM *GARCINIA MANGOSTANA* AGAINST SELECTED ORAL PATHOGENS. THESIS ADVISOR : KITTI TORRUNGRUANG, Ph.D., 66 pp. ISBN 974-17-6543-6.

*Garcinia mangostana* or mangosteen is a fruit plant found in South-East Asia. The extracts from its pericarp have broad-spectrum antimicrobial activity. One of its active ingredients,  $\alpha$ -mangostin, exerts strong antimicrobial activity. The purpose of this study was to examine the antimicrobial activity of mangosteen pericarp crude extract against cariogenic (*Streptococcus mutans*) and periodontopathic bacteria (*Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*). The mangosteen crude extract used in this study contained about 70-80%  $\alpha$ -mangostin. Results showed that mangosteen crude extract was as effective as purified  $\alpha$ -mangostin in inhibiting the growth of *S. mutans* and *P. gingivalis*. Both MIC and MBC against *S. mutans* were 0.625  $\mu$ g/ml which were comparable to those of chlorhexidine. The MIC and MBC against *P. gingivalis* were 20 and 40  $\mu$ g/ml respectively, which were higher than those of chlorhexidine. The mangosteen extract did not have effects on the growth of *A. actinomycetemcomitans*. Time-kill assays showed that mangosteen crude extract at 2.5  $\mu$ g/ml completely inactivated *S. mutans* in 90 minutes. At 80  $\mu$ g/ml, it completely killed *P. gingivalis* in 30 minutes. The antimicrobial activity of mangosteen extract against oral pathogenic bacteria makes it a promising new agent in prevention or treatment of dental caries and periodontal diseases.

Department.....Periodontology..... Student's signature.....  
 Field of study...Periodontics..... Advisor's signature.....  
 Academic year...2005..... Co-advisor's signature.....

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my thesis advisor, Dr. Kitti Torrungruang, for his kindness, encouragement, advice and consistent support throughout the course of my Master degree program. I would like to express my sincere appreciation to my thesis committee; Associate Professor Naulchavee Hongprasong, Associate Professor Jintakorn Kuvatanasuchati, Assistant Professor Dr. Mano Kuratana and Assistant Professor Dr. Rangsin Mahanonda for their kindness and valuable comments.

Sincere appreciation is expressed to Associate Professor Dr. Suchada Chutimaworapan, the Department of Pharmacy, the Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, for providing mangosteen crude extract and purified  $\alpha$ -mangostin. I also would like to thank Miss Vorratai Tan, a graduate student of the Department of Pharmacy, for her advice on the knowledge about the extract.

I am indebted to the Immunology Laboratory at the Faculty of Dentistry for providing *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and equipment. I would like to thank the Department of Microbiology, the Faculty of Dentistry for providing *S. mutans* and equipment. I would like to thank the Department of Pharmacology, the Faculty of Dentistry for chlorhexidine. I would like to thank the Oral Biology Research Center for technique support and for providing equipment and laboratory space. I would like to extend my gratitude to the faculty members at the Department of Periodontology, the Faculty of Dentistry, for their guidance and encouragement.

I would like to acknowledge the research grant from the Graduate School at Chulalongkorn University for the partial financial support of this study.

I greatly appreciate Mr. Noppadol Sa-ard-iam and Mr. Manop Pachantabut for their understanding, advice and assistance in the experiment procedures.

Finally, I would like to express my deepest appreciation to my mother, my father, my sister and my friends for their love, understanding, support and encouragement. Great appreciation is also expressed to my loving home, Thailand and His Majesty the King.

## TABLE OF CONTENT

Chapter	Page
Abstract (Thai) .....	iv
Abstract (English) .....	v
Acknowledgements .....	vi
Table of content .....	vii
List of tables .....	x
List of figures .....	xii
Chapters	
1. Introduction .....	1
1.1 Background and significance .....	1
1.2 Objectives .....	2
1.3 Scope of study .....	3
1.4 Inclusion criteria .....	3
1.5 Definitions used in this study .....	3
1.6 Contributions of this study .....	4
2. Literature review .....	5
2.1 Mangosteen pericarp extract and its therapeutic potentials.....	5
2.2 Cariogenic bacteria .....	9
2.3 Periodontopathic bacteria .....	9
2.4 Chlorhexidine .....	10
2.5 Anaerobic bacterial culture .....	11
2.6 Measuring bacterial growth .....	12
2.6.1 Viable cell count using a spread plate method.....	12
2.6.2 Degree of turbidity.....	13
3. Materials and methods .....	17
3.1 Preparation of mangosteen pericarp extract .....	17
3.1.1 Preparation of crude extract and purified $\alpha$ -mangostin...	17

## TABLE OF CONTENT (CONTINUE)

Chapter	Page
3.1.2 Testing solubility of mangosteen pericarp extract .....	18
3.2 Bacterial culture .....	18
3.2.1 Bacterial growth condition .....	18
3.2.2 Growth on liquid media .....	18
3.2.3 Growth on solid media .....	19
3.3 Optimizing bacterial growth condition .....	19
3.3.1 Degree of turbidity .....	19
3.3.2 Viable bacterial count .....	19
3.3.3 Plotting a standard curve .....	20
3.3.4 Optimizing growth condition for <i>P. gingivalis</i> .....	20
3.4 Preparation of test and control media for antimicrobial testing...	22
3.5 Identifying MIC .....	22
3.6 Identifying MBC .....	23
3.7 Time-kill kinetics .....	25
3.8 Statistical analyses .....	25
4. Results .....	26
4.1 Determining the mid-exponential phase of growth .....	26
4.2 Plotting the standard curve .....	28
4.3 Identifying MIC and MBC .....	30
4.4 Time-kill kinetics .....	32
4.4.1 Time-kill kinetics for <i>S. mutans</i> .....	32
4.4.2 Time-kill kinetics for <i>P. gingivalis</i> .....	35
5. Discussion and conclusion .....	38
5.1 Antimicrobial activity of mangosteen crude extract.....	38
5.2 Antimicrobial activity of mangosteen crude extract vs. $\alpha$ -mangostin .....	39



## TABLE OF CONTENT (CONTINUE)

Chapter	Page
5.3 Time-kill kinetics of mangosteen extract .....	39
5.4 Antimicrobial activity of mangosteen crude extract vs. chlorhexidine .....	41
5.5 Limitations of the study .....	42
5.6 Conclusions and applications of the results .....	43
References .....	44
Appendices .....	50
Biography .....	66

## LIST OF TABLES

Table		Page
Table 1	Antimicrobial activity of xanthones from mangosteen pericarp extract...	8
Table 2	MIC and MBC of mangosteen crude extract, $\alpha$ -mangostin and chlorhexidine against oral pathogens.....	31
Table 3	The number of remaining viable bacteria ( $\log_{10}$ CFU/ml) of <i>S. mutans</i> ATCC 25175 after exposed to mangosteen extract and chlorhexidine for 30, 60 and 90 minutes.....	33
Table 4	The number of remaining viable bacteria ( $\log_{10}$ CFU/ml) of <i>P. gingivalis</i> after exposed to mangosteen extract and chlorhexidine for 5, 15 and 30 minutes.....	36
Table 5	The growth pattern of <i>S. mutans</i> ATCC 25175 at varying time point after inoculated in the liquid media.....	57
Table 6	The growth pattern of <i>A. actinomycesetemcomitans</i> at varying time point after inoculated in the liquid media.....	58
Table 7	Effect of DMSO on the growth of <i>S. mutans</i> ATCC 25175.....	59
Table 8	Effect of DMSO on the growth of <i>P. gingivalis</i> .....	59
Table 9	Effect of DMSO on the growth of <i>A. actinomycesetemcomitans</i> and Identifying MIC and MBC of mangosteen extract .....	60
Table 10	Identifying MIC and MBC of mangosteen extract against <i>S. mutans</i> ATCC 25175.....	61
Table 11	Identifying MIC and MBC of mangosteen extract against <i>S. mutans</i> KPSK <sub>2</sub> .....	62
Table 12	Identifying MIC and MBC of mangosteen extract against <i>P. gingivalis</i> ..	63
Table 13	Time-kill kinetics of <i>S. mutans</i> ATCC 25175 when treated with mangosteen crude extract at 2x and 4x MBC compared to chlorhexidine at the same concentrations.....	64

## LIST OF TABLES

Table	Page
Table 14 Time-kill kinetics of <i>P. gingivalis</i> when treated with mangosteen crude extract at 2x and 4x MBC compared to chlorhexidine at the same concentrations.....	65

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
Figure 1 Chemical structures of xanthone ring and xanthone derivatives.....	6
Figure 2 Growth curve of a typical bacterial culture .....	14
Figure 3 Components of a spectrophotometer .....	14
Figure 4 Standard curve relating the absorbance at 600 nm to the number of viable bacteria.....	15
Figure 5 Determining bacterial growth pattern by viable cell count and degree of turbidity.....	21
Figure 6 Preparation of mangosteen extract for determining MIC and MBC.....	24
Figure 7 Growth curve of <i>S. mutans</i> and <i>A. actinomycetemcomitans</i> .....	27
Figure 8 Standard curve of <i>S. mutans</i> and <i>A. actinomycetemcomitans</i> .....	29
Figure 9 Time-kill kinetics of <i>S. mutans</i> ATCC 25175 when treated with mangosteen crude extract at 2x and 4x MBC compared to chlorhexidine at the same concentrations.....	34
Figure 10 Time-kill kinetics of <i>P. gingivalis</i> when treated with mangosteen crude extract at 2x and 4x MBC compared to chlorhexidine at the same concentrations.....	37
Figure 11 Photograph of mangosteen crude extract.....	51
Figure 12 Photograph of a GasPak 100 system.....	52
Figure 13 Colonies of <i>S. mutans</i> on trypticase soy agar.....	53
Figure 14 Colonies of <i>A. actinomycetemcomitans</i> on brain heart infusion agar....	54
Figure 15 Colonies of <i>P. gingivalis</i> on brucella blood agar.....	55