

ความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้ที่ผสมในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยช่องปาก

Cytotoxicity of *Melaleuca Cajuputi* Powell and *Cymbopogon Citratus* Essential Oil Formulated in Alcohol-free Mouthwash on Oral Fibroblast Cell

จิตรลดา ธนาภินันท์¹, จินตนา อิทธิเดชารณ², เพ็ญพิชชา วนจันทร์รักษ์³, ธนพัฒน์ ศาสตระรุจิ³

Jidlada Thanabhinunt¹, Chintana Itthidecharon², Phenpichar Wanachantararak³, Thanapat Sastraruji³

¹โรงพยาบาลศรีวิไล อำเภศรีวิไล จ.บึงกาฬ ประเทศไทย

¹Sriwilai hospital, Sriwilai district, Buengkan, Thailand

²ภาควิชาทันตกรรมครอบครัวและชุมชน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ ประเทศไทย

²Department of Family and Community Dentistry, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

³ศูนย์วิจัยทางทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ ประเทศไทย

³Dentistry Research Center, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้ที่ผสมในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยช่องปากชนิดเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์ ศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์ในงานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม หลุมละ 2.5×10^4 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มไม่มีซี ที่มีซีรัมจากลูกวัวในครรภความเข้มข้นร้อยละ 10 และยาปฏิชีวนะ แบ่งน้ำยาบ้วนปากเป็น 5 กลุ่มทดลอง ได้แก่ กลุ่มทดลองที่ 1 น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีเฉพาะส่วนผสมพื้นฐาน กลุ่มทดลองที่ 2 น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 $\mu\text{L/ml}$ กลุ่มทดลองที่ 3 น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว 8 $\mu\text{L/ml}$ กลุ่มทดลองที่ 4 น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 $\mu\text{L/ml}$ และเสม็ดขาว 8 $\mu\text{L/ml}$ และกลุ่มทดลองที่ 5 น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้น ร้อยละ 0.12 นำน้ำยาบ้วนปากทั้ง 5 กลุ่มทดลองเจือจางความเข้มข้นลงครึ่งละสองเท่าใส่ลงในจานเพาะเลี้ยง กำหนดกลุ่มควบคุมบวก คือ หลุมที่ใส่น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.12 กลุ่มควบคุมลบ คือ หลุมที่ใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มไม่มีซี นำงานเพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีทีและวิธีแอลดีเอช วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านความยาวคลื่นและคำนวณค่าความมีชีวิตของเซลล์ เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของน้ำยาบ้วนปากทั้ง 5 กลุ่มทดลอง โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวตามด้วยการเปรียบเทียบพหุคูณ (multiple comparison) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ผลการศึกษาเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที พบว่า ความเข้มข้นมากที่สุดที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของทั้ง 5 กลุ่มทดลองอยู่ที่ระดับความเข้มข้น 1:8, 1:16, 1:32, 1:32 และ 1:128 ตามลำดับ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนการทดสอบด้วยวิธีแอลดีเอช พบว่า ความเข้มข้นมากที่สุดที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์อยู่ที่ระดับความเข้มข้น 1:8, 1:16, 1:32, 1:32 และ 1:256 ตามลำดับ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สรุปได้ว่า น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีเฉพาะส่วนผสมพื้นฐานมีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์น้อยที่สุด น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 $\mu\text{L/ml}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว 8 $\mu\text{L/ml}$ น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวเพียงอย่างเดียว และน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.12 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด

คำสำคัญ: ความเป็นพิษ, เซลล์สร้างเส้นใยช่องปาก, ตะไคร้, น้ำมันหอมระเหย, น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์, เสม็ดขาว

Abstract

The aim of this study was to determine the cytotoxicity of *Melaleuca cajuputi* Powell and *Cymbopogon citratus* essential oil formulated in alcohol-free mouthwash on oral fibroblast cell; human gingival fibroblast cell. *In vitro* study, human gingival fibroblast cells were plated in 96-well plates with 2.5×10^4 cell/well and cultured in DMEM (no phenol red) containing 10% FBS and antibiotics. Mouthwashes were divided into 5 groups; alcohol-free mouthwash with basic ingredients, alcohol-free mouthwash with essential oil from *Cymbopogon citratus* 4 μ l/ml, alcohol-free mouthwash with essential oil from *Melaleuca cajuputi* Powell 8 μ l/ml, alcohol-free mouthwash supplemented with 4 μ l/ml *Cymbopogon citratus* and 8 μ l/ml *Melaleuca cajuputi* Powell mix essential oils and 0.12% chlorhexidine mouthwash. The concentration of all groups was prepared by two-folds dilution in 96-well plate; the positive control cultured in 0.12% chlorhexidine mouthwash and the negative control cultured in DMEM (no phenol red). Plates were incubated for 24 hours in incubator at 37 °C, 5% CO₂, 100% humidity and determined the cytotoxicity by MTT assay and LDH assay. Cell viability was measured by optical density and ELISA Reader machine was use to read the result. One-way ANOVA analysis follow by multiple comparison at 95 % confidence of interval to compare non-cytotoxic concentration of 5 groups. MTT assay showed that the maximum non-cytotoxic concentration of 5 groups was at 1:8, 1:16, 1:32, 1:32 and 1:128, respectively and statistically significant differences ($p < 0.05$). LDH assay showed the maximum non-cytotoxic concentration was at 1:8, 1:16, 1:32, 1:32 and 1:256, respectively and statistically significant differences ($p < 0.05$). In conclusion, the alcohol-free mouthwash with basic ingredients was least cytotoxicity to human gingival fibroblast cell. The alcohol-free mouthwash supplemented with 4 μ l/ml *Cymbopogon citratus* was less cytotoxicity than alcohol-free mouthwash with essential oil from *Melaleuca cajuputi* Powell 8 μ l/ml. The alcohol-free mouthwash supplemented with both mix essential oils and alcohol-free mouthwash with essential oil from *Melaleuca cajuputi* Powell was non-cytotoxicity at the same concentration. 0.12% chlorhexidine mouthwash was the most cytotoxicity.

Keywords: Cytotoxicity, Oral fibroblast cell, *Cymbopogon citratus*, Essential oil, Alcohol-free mouthwash, *Melaleuca cajuputi* Powell

Received Date: May 21, 2021

Revised Date: Jun 10, 2021

Accepted Date: Jul 23, 2021

doi: 10.14456/jdat.2022.18

ติดต่อเกี่ยวกับบทความ :

จินตนา อธิติเดชาธรณ ภาควิชาทันตกรรมครอบครัวและชุมชน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200 ประเทศไทย โทร: 053-944470, 086-920-1393 อีเมล: chintana.itt@cmu.ac.th

Correspondence to :

Chintana Itthidecharon, Department of Family and Community Dentistry, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200 Thailand Tel: 053-944470, 086-920-1393 E-mail: chintana.itt@cmu.ac.th

บทนำ

ผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายและมีหลากหลายชนิด American Dental Association (ADA)¹ แบ่งประเภทของน้ำยาบ้วนปากเป็น 2 ประเภทคือ น้ำยาบ้วนปากชนิดทั่วไป (cosmetic mouthwash) เป็นน้ำยาบ้วนปากที่ไม่สามารถกำจัด

เชื้อแบคทีเรียในช่องปาก ใช้เพื่อควบคุมกลิ่นปากชั่วคราวหรือใช้ในระยะเวลาสั้น ๆ เท่านั้น และน้ำยาบ้วนปากที่ใช้รักษาโรคในช่องปาก (therapeutic mouthwash) เป็นน้ำยาบ้วนปากที่มีสารออกฤทธิ์ (active ingredients) ควบคุมและลดคราบจุลินทรีย์ ลดการเกิด

เหงือกอักเสบ กลิ่นปากและฟันผุ สรรพคุณและประสิทธิภาพของ น้ำยาบ้วนปากแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ ถึงแม้ผลข้างเคียงจากการใช้น้ำยาบ้วนปากพบได้น้อยมาก แต่พบว่ามีรายงานการเกิดอาการแพ้จากส่วนผสมบางชนิดในน้ำยาบ้วนปากได้² ผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากที่นำมาใช้จึงต้องคำนึงถึงความปลอดภัยและความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย (biocompatibility) ต้องได้รับการประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ที่กำหนด การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในห้องปฏิบัติการ (cytotoxicity *in vitro*) จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biological evaluation)³ และเป็นเครื่องชี้ในการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากเป็นวิธีการทดสอบที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ⁴

ในช่องปากพื้นผิวบริเวณตัวฟันไม่ใช่เพียงส่วนเดียวที่เกิดการสร้างคราบจุลินทรีย์ แต่บริเวณเนื้อเยื่อช่องปาก และลิ้นก็เป็นแหล่งในการกักเก็บแบคทีเรียและเกิดการสร้างคราบจุลินทรีย์ได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นการใช้น้ำยาบ้วนปากเป็นประจำจึงช่วยเสริมการทำความสะอาดนอกเหนือจากการแปรงฟัน ลดเชื้อแบคทีเรียและคราบจุลินทรีย์ในช่องปากได้^{5,6} น้ำยาบ้วนปากที่นิยมใช้ในทางทันตกรรมได้แก่ น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของคลอร์เฮกซิดีน (chlorhexidine) เนื่องจากมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ลดการเกิดเหงือกอักเสบ ลดคราบจุลินทรีย์⁶ และมีฤทธิ์ในการต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์ (*C. albicans*)⁷ แต่เนื่องจากมีรสชาติที่ไม่ดี ใช้เป็นระยะเวลานานทำให้การรับรสเปลี่ยนแปลง และเกิดการติดสีน้ำตาล (brown staining) ที่ตัวฟัน เนื้อเยื่อช่องปาก และลิ้น^{6,7} มีรายงานการศึกษาพบว่า น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของคลอร์เฮกซิดีนมีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์และเซลล์เนื้อเยื่อบุผิว (epithelial cell) ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่นำมาใช้^{2,8} จากผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ต่าง ๆ เหล่านี้ ทำให้มีการนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาและป้องกันโรคที่เกิดในช่องปากมากขึ้น โดยนำสรรพคุณในการเป็นยารักษาโรคมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพช่องปากทั้งในรูปแบบของยาสีฟันหรือน้ำยาบ้วนปาก มีการนำสมุนไพรผสมในน้ำยาบ้วนปากในรูปแบบของน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในน้ำยาบ้วนปาก มีการศึกษาพบว่า น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ลดการเกิดเหงือกอักเสบ ลดการเกิดคราบจุลินทรีย์ และช่วยให้ลมหายใจสะอาด (fresh breath)⁶ รวมถึงน้ำมันหอมระเหยจากเสมีดขาวและตะไคร้ เสมีดขาวเป็นพืชที่พบได้ในพื้นที่ดินเค็มแถวชายฝั่งทะเล ในประเทศไทยพบต้นเสมีดขาวได้มากทางภาคตะวันตกเฉียงใต้ ภาคตะวันออก และภาคใต้ น้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด^{9,10} รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์¹¹ ตะไคร้เป็นพืชที่พบได้ทั่วไปใน

ประเทศไทย¹² น้ำมันหอมระเหยตะไคร้มีฤทธิ์ในการต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์^{13,14} ลดการเกิดคราบจุลินทรีย์¹⁵ มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์สร้างแผ่นชีวภาพ (biofilm) ที่สัมพันธ์กับการเกิดฟันผุ¹⁶ และช่วยลดกลิ่นปากได้¹⁷ มีการศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวและตะไคร้ที่ผสมในตำรับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์เพื่อต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์ ด้วยวิธี disc diffusion และ broth microdilution พบว่า ตำรับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ ส่วนผสมจากน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวความเข้มข้น 8 µl/ml และตะไคร้ความเข้มข้น 4 µl/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ¹⁸ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นตำรับน้ำยาบ้วนปากในอนาคต ทั้งนี้ ยังไม่พบรายงานการศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวและตะไคร้ที่ผสมในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ต่อเซลล์ในช่องปาก ดังนั้น ในการศึกษาวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวและตะไคร้ที่ผสมในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยช่องปาก

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์สร้างเส้นใยช่องปากที่ใช้ในการศึกษาเป็นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์มีหลักเกณฑ์การคัดเลือกคือ อาสาสมัครที่มารับการรักษา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 3 คน อายุระหว่าง 18-25 ปี ถอนฟันด้วยเหตุผลทางทันตกรรมจัดฟันหรือตามคำแนะนำของทันตแพทย์ ฟันแท้ซึ่งจะถอนเป็นฟันกรามซึ่งที่สามในขากรรไกรบนหรือขากรรไกรล่าง มีสภาพสมบูรณ์ ไม่มีโรคฟันผุ ไม่มีโรคของเนื้อเยื่อในฟัน และไม่มีอาการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ได้ เช่น ไซนัสอักเสบ ให้เก็บชิ้นเนื้อเยื่อเหงือก โดยโครงการนี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิสวัสดิภาพและป้องกันอันตรายของผู้ถูกวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (เอกสารเลขที่ 64/2562) และผ่านการรับรองด้านความปลอดภัยทางชีวภาพจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับส่วนงานชุดที่ 5 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Approval No. CMUIBC A-0563003) หลักเกณฑ์การคัดเลือกคือ อาสาสมัครที่มีโรคทางระบบ รับประทานยารักษาโรคใด ๆ เป็นประจำ ฟันซึ่งถอนเกิดความซับซ้อนขึ้นระหว่างการถอนฟันจนทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อเหงือกได้ นำฟันตัวอย่างมาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟต (phosphate buffer saline; PBS) ตัดชิ้นเนื้อเยื่อเหงือกที่ติดมากับฟันที่ถูกถอนให้มีขนาดประมาณ 1x1x1 มิลลิเมตร นำไปวางในจานเพาะเลี้ยง เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มเอ็ม (Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM) ที่มีซีรัมจากลูกวัวในครรภ์ความเข้มข้นร้อยละ 10 (fetal bovine serum ; FBS) และยาปฏิชีวนะเพนนิซิลินจีไซเตียม

(Penicillin G sodium) 10,000 หน่วยต่อมิลลิลิตร สเตรปโตไมซิน ซัลเฟต (Streptomycin sulfate) 100,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แอมโฟเทอริซินบี (Amphotericin B) 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอลกลูตามีน (L-glutamine) ความเข้มข้นร้อยละ 1 บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ทุก ๆ 2 วัน จนเซลล์เคลื่อนออกจากชั้นเนื้อเยื่อเหวี่ยงและเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยง จากนั้นถ่ายเซลล์ลงจานเพาะเลี้ยงอันใหม่และเริ่มนับเซลล์เป็นรุ่นที่ 1 การศึกษานี้จะใช้เซลล์รุ่นที่ 3 ถึง 5¹⁹

การเตรียมน้ำมันหอมระเหย

นำใบเสมีดขาวและตะไคร้สด 5 กิโลกรัมมาบดผสมกับน้ำสะอาด สกัดด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำในเครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหยขนาด 5 ลิตร จะได้น้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวมีลักษณะเขียวใส และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้มีลักษณะใส เก็บน้ำมันหอมระเหยที่ได้ในภาชนะปิดสนิทที่บ่งแสงในตู้เย็น²⁰

การเตรียมน้ำยาบ้วนปาก

เตรียมน้ำมันผสมพื้นฐานของน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ ประกอบด้วย โพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) ความเข้มข้นร้อยละ 12 โดยปริมาตร สารละลายซอร์บิทอลร้อยละ 70 (70% sorbitol solution) ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เมนทอล (menthol) ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนัก (0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) โซเดียมเบนโซเอต (sodium benzoate) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และน้ำกลั่น²¹

แบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทดลองที่ 1 คือ น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีเฉพาะส่วนผสมพื้นฐาน กลุ่มทดลองที่ 2 คือ น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml กลุ่มทดลองที่ 3 คือ น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาว 8 µl/ml กลุ่มทดลองที่ 4 คือ น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาว 8 µl/ml และตะไคร้ 4 µl/ml¹⁸ และกลุ่มทดลองที่ 5 คือ น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.12 ชนิดไม่มีสี โดยเจือจางความเข้มข้นลงครึ่งละสองเท่า ตั้งแต่ความเข้มข้น 1:2 ถึง 1:512 ในหลอดเอพเพ็นดอร์ฟ (eppendorf) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มไม่มีสี

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์ ด้วยวิธีเอ็มทีที

นำเซลล์ที่เตรียมไว้ถ่วงลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มไม่มีสี หลุมละ 200 ไมโครลิตร และมีเซลล์จำนวน 2.5×10^4 เซลล์/หลุม บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา

24 ชั่วโมง จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงออกมาดูอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง และเติมน้ำยาบ้วนปากทั้ง 5 กลุ่มทดลอง ใส่จานเพาะเลี้ยงหลุมละ 200 ไมโครลิตร กำหนดกลุ่มควบคุมลบ คือ หลุมที่ใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มไม่มีสี กลุ่มควบคุมบวก คือ หลุมที่ใส่น้ำยาบ้วนปาก คลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.12 ชนิดไม่มีสี เตรียมอีกหลุมใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มไม่มีสี 200 ไมโครลิตร และเติมสารละลายไตรตันเอ็กซ์-100 ความเข้มข้นร้อยละ 1 (1% Triton X-100) เพื่อใช้สำหรับการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีแอลดีเอชในขั้นตอนต่อไป นำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำจานเพาะเลี้ยง บั่นเหวี่ยงที่ 250 g เป็นเวลา 10 นาที ดูอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าใส่จานเพาะเลี้ยงใหม่ หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีแอลดีเอช ส่วนเซลล์ก้นหลุมในจานเพาะเลี้ยงเดิม นำไปทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีเอ็มทีที โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มไม่มีสีหลุมละ 150 ไมโครลิตร และเติมสารละลายเอ็มทีที (3 (4,5 dimethylthiazol-2-yl) 2,5 diphenyltetrazolium bromide) หลุมละ 50 ไมโครลิตร ที่ได้จากการเตรียมเตรียมสารละลายเอ็มทีที ความเข้มข้น 5 mg/ml ในสารละลายพีบีเอส และกรองด้วยตัวกรองปราศจากเชื้อ 0.22 µm นำจานเพาะเลี้ยงบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำจานเพาะเลี้ยงออกมาดูอาหารเลี้ยงเซลล์เก่า และสารละลายเอ็มทีทีที่เติมสารละลายดีเอ็มเอสโอ (Dimethylsulphoxide; DMSO) และเอทานอล (ethanol) ในอัตราส่วน 1:1 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านความยาวคลื่น (microplate reader TECAN Sunrise™, Switzerland) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์ ด้วยวิธีแอลดีเอช

การศึกษานี้ใช้ชุดทดสอบความเป็นพิษ LDH-Cytotoxicity Assay Kit (KA0785-Abnova) ประกอบด้วยสารกระตุ้น (catalyst) และสารละลายสีย้อม (dye solution) โดยผสมสารกระตุ้นและน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที ส่วนสารละลายสีย้อมนำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเตรียมผสมสารละลายรีแอคชัน มิกซ์เจอร์ (reaction mixture) สำหรับทดสอบความเป็นพิษให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับงานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม โดยผสมระหว่าง สารละลายกระตุ้น 250 ไมโครลิตร และสารละลายสีย้อม 11.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน²²

นำจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าหลุมละ 100 ไมโครลิตร เติมน้ำยาบ้วนปากหรือรีแอคชัน มิกซ์เจอร์หลุมละ 100 ไมโครลิตร กำหนดกลุ่ม low sample และ low control คือ หลุมที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์ด้วยวิธีเอ็มทีที

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์ด้วยวิธีเอ็มทีทีของน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีเฉพาะส่วนผสมพื้นฐาน น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว 8 µl/ml น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml และเสม็ดขาว 8 µl/ml และน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.12 พบว่าระดับความเข้มข้นมากที่สุดที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์อยู่ที่ระดับความเข้มข้น 1:8, 1:16, 1:32, 1:32 และ 1:128 ตามลำดับ แสดงในรูปค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ได้แก่ 97.46 ± 2.22 , 88.06 ± 4.74 , 75.80 ± 0.72 , 85.63 ± 0.89 และ 93.10 ± 2.85 ตามลำดับ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1 และรูปที่ 1)

ดีเอ็มอีเอ็มไม่มีสี กลุ่ม high sample คือ หลุมที่ใส่สารละลายไทรทัน เอ็กซ์-100 ความเข้มข้นร้อยละ 1 และกลุ่มทดสอบ คือน้ำยาบ้วนปากทั้ง 5 กลุ่มทดลอง นำงานเพาะเลี้ยงเก็บในที่ไม่มีแสง ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านความยาวคลื่นที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (% Cytotoxicity) จากนั้นนำมาหาค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์

การวิเคราะห์ทางสถิติ

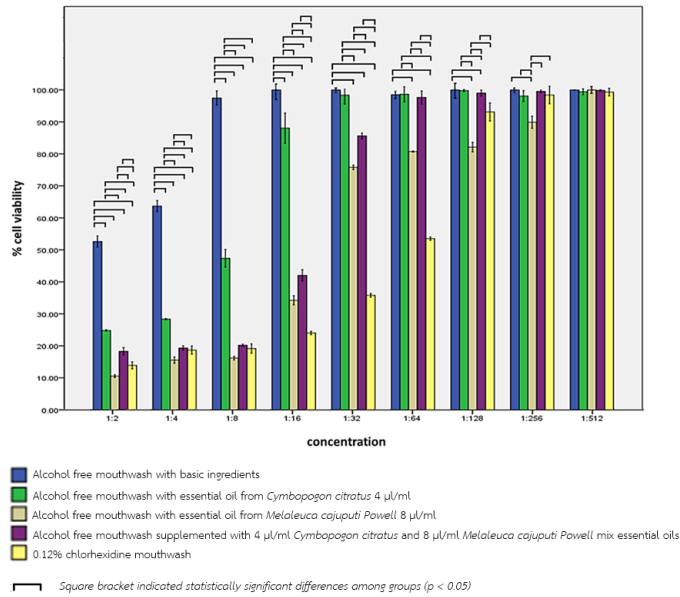
การศึกษานี้ทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรมเอพีเอสเอส สำหรับวินโดวส์รุ่น 17.0 (SPSS for Windows, Version 17.0., Chicago, SPSS Inc.) นำค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์มาทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลโดยใช้ Shapiro-Wilk Test นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยการทดสอบทางสถิติแบบ One way ANOVA แยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้การทดสอบทางสถิติแบบ Turkey multiple comparison ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กำหนดระดับนัยสำคัญ 0.05 กำหนดค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์มากกว่าร้อยละ 70 แสดงถึงไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์²³

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และความเข้มข้นของน้ำยาบ้วนปากจากการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีเอ็มทีที

Table 1 The relationship between mean \pm standard deviations of percent of cell viability and concentration of mouthwash determined by MTT cytotoxicity assay

Concentrations	Percent of cell viability (mean \pm SD)				
	Alcohol-free mouthwash				
	Basic ingredients	4 µl/ml Cymbopogon citratrus essential oil	8 µl/ml Melaleuca cajuputi Powell essential oil	4 µl/ml Cymbopogon citratrus, 8 µl/ml Melaleuca cajuputi Powell mix essential oils	0.12% chlorhexidine
1:2	52.63 \pm 1.73 ^e	24.82 \pm 0.23 ^d	10.53 \pm 0.48 ^a	18.29 \pm 1.22 ^c	13.39 \pm 1.10 ^b
1:4	63.71 \pm 1.75 ^d	28.37 \pm 0.19 ^c	15.55 \pm 1.00 ^a	19.35 \pm 0.70 ^b	18.67 \pm 1.30 ^b
1:8	97.46 \pm 2.22 ^c	47.38 \pm 2.77 ^b	16.18 \pm 0.58 ^a	20.18 \pm 0.33 ^a	19.16 \pm 1.48 ^a
1:16	98.90 \pm 1.91 ^e	88.06 \pm 4.74 ^d	34.22 \pm 1.46 ^b	42.04 \pm 1.80 ^c	24.02 \pm 0.54 ^a
1:32	99.68 \pm 0.56 ^d	98.39 \pm 2.79 ^d	75.80 \pm 0.72 ^b	85.63 \pm 0.89 ^c	35.79 \pm 0.59 ^a
1:64	99.36 \pm 1.11 ^c	98.64 \pm 2.36 ^c	80.76 \pm 0.21 ^b	97.65 \pm 2.04 ^c	53.53 \pm 0.53 ^a
1:128	98.34 \pm 2.42 ^c	99.77 \pm 0.35 ^c	82.13 \pm 1.51 ^a	99.03 \pm 0.93 ^b	93.10 \pm 2.85 ^c
1:256	99.58 \pm 0.72 ^b	98.03 \pm 1.71 ^b	89.89 \pm 1.90 ^a	99.54 \pm 0.41 ^b	98.41 \pm 2.76 ^b
1:512	99.95 \pm 0.08 ^a	99.45 \pm 0.96 ^a	99.41 \pm 1.02 ^a	99.85 \pm 0.27 ^a	99.31 \pm 1.20 ^a

Different small letters in row indicated statistically significant differences among groups ($p < 0.05$)



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์และความเข้มข้นของน้ำยาบ้วนปากจากการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีเอ็มทีที

Figure 1 The relationship between percent of cell viability and concentration of mouthwash determined by MTT cytotoxicity assay

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์ด้วยวิธีแอลดีเอช

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์ด้วยวิธีแอลดีเอชของน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีเฉพาะส่วนผสมพื้นฐาน น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว 8 µl/ml น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml และเสม็ดขาว 8 µl/ml

และน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.12 พบว่าระดับความเข้มข้นมากที่สุดที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์อยู่ที่ระดับความเข้มข้น 1:8, 1:16, 1:32, 1:32 และ 1:256 ตามลำดับ แสดงในรูปค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ได้แก่ 72.41 ± 1.54, 82.76 ± 2.65, 73.43 ± 1.50, 71.35 ± 0.86 และ 74.92 ± 1.59 ตามลำดับ และแตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2 และรูปที่ 2)

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และความเข้มข้นของน้ำยาบ้วนปากจากการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีแอลดีเอช

Table 2 The relationship between mean ± standard deviations of percent of cell viability and concentration of mouthwash determined by LDH cytotoxicity assay

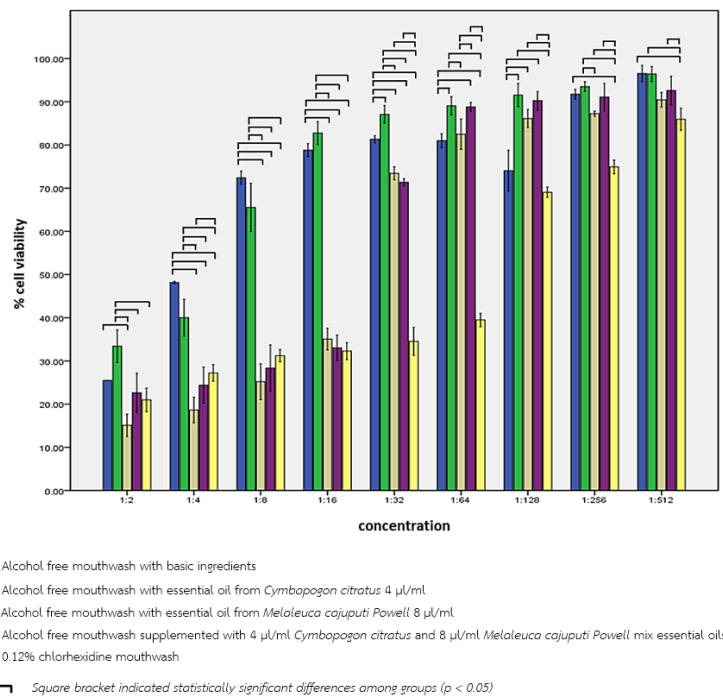
Percent of cell viability (mean ± SD)					
Alcohol-free mouthwash					
Concentrations	Basic ingredients	4 µl/ml Cymbopogon citratus essential oil	8 µl/ml Melaleuca cajuputi Powell essential oil	4 µl/ml Cymbopogon citratus, 8 µl/ml Melaleuca cajuputi Powell mix essential oils	0.12% chlorhexidine
1:2	25.49 ± 0.03 ^{bc}	33.41 ± 3.77 ^c	15.08 ± 2.58 ^a	22.64 ± 4.54 ^{ab}	20.98 ± 2.75 ^{ab}
1:4	48.18 ± 0.27 ^c	40.03 ± 4.26 ^c	18.64 ± 2.95 ^a	24.41 ± 4.19 ^{ab}	27.22 ± 1.93 ^b
1:8	72.41 ± 1.54 ^b	65.56 ± 5.59 ^b	25.19 ± 4.15 ^a	28.33 ± 5.38 ^a	31.23 ± 1.41 ^a
1:16	78.79 ± 1.52 ^b	82.76 ± 2.65 ^b	35.05 ± 2.54 ^a	33.04 ± 2.93 ^a	32.28 ± 1.97 ^a
1:32	81.32 ± 0.84 ^c	87.09 ± 2.02 ^d	73.43 ± 1.50 ^b	71.35 ± 0.86 ^b	34.54 ± 3.26 ^a

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และความเข้มข้นของน้ำยาบ้วนปากจากการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีแอลดีเอช (ต่อ)

Table 2 The relationship between mean ± standard deviations of percent of cell viability and concentration of mouthwash determined by LDH cytotoxicity assay (cont.)

Concentrations	Percent of cell viability (mean ± SD)				
	Alcohol-free mouthwash				0.12% chlorhexidine
	Basic ingredients	4 µl/ml <i>Cymbopogon citratus</i> essential oil	8 µl/ml <i>Melaleuca cajuputi</i> Powell essential oil	4 µl/ml <i>Cymbopogon citratus</i> , 8 µl/ml <i>Melaleuca cajuputi</i> Powell mix essential oils	
1:64	82.32 ± 1.84 ^b	89.07 ± 2.13 ^c	82.50 ± 3.52 ^b	88.79 ± 1.03 ^c	39.48 ± 1.55 ^a
1:128	74.05 ± 4.72 ^a	91.56 ± 2.68 ^b	86.12 ± 2.12 ^b	90.25 ± 2.14 ^b	69.06 ± 1.19 ^a
1:256	91.77 ± 1.11 ^{bc}	93.52 ± 1.13 ^c	87.26 ± 0.60 ^b	91.11 ± 3.16 ^{bc}	74.92 ± 1.59 ^a
1:512	96.55 ± 1.88 ^b	96.43 ± 1.75 ^b	90.45 ± 1.70 ^(ab)	92.61 ± 3.31 ^b	85.95 ± 2.58 ^a

Different small letters in row indicated statistically significant differences among groups ($p < 0.05$)



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์และความเข้มข้นของน้ำยาบ้วนปากจากการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีแอลดีเอช

Figure 2 The relationship between percent of cell viability and concentration of mouthwash determined by LDH cytotoxicity assay

บทวิจารณ์

การศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว และตะไคร้ที่ผสมในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยช่องปากด้วยวิธีเอ็มทีที เป็นการวัดความมีชีวิตของเซลล์จากการทำงานของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ในขณะที่เซลล์

ยังไม่ถูกทำลายด้วยพิษของสารทดสอบ ส่วนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีแอลดีเอช เป็นการวัดเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ที่ถูกทำลายหรือเซลล์ที่ตายหลังจากได้รับพิษของสารทดสอบ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้ง 2 วิธี เป็นวิธีที่มีความแม่นยำ และใช้ระยะเวลาทดสอบไม่นาน^{24,25} จากการศึกษาพบว่า การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหืองจากมนุษย์ของน้ำยาบ้วนปาก ทั้ง 5 กลุ่มทดลองจากทั้งสองวิธี มีผลการทดสอบความเป็นพิษไปในทิศทางเดียวกัน คือ น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีเฉพาะส่วนผสมพื้นฐานมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยที่สุด น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 $\mu\text{l/ml}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยสะมิ็ดขาว 8 $\mu\text{l/ml}$ น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยสะมิ็ดขาวเพียงอย่างเดียว และมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าน้ำยาบ้วนปากคลอรีนเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.12 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากมาตรฐานที่ใช้ในทางทันตกรรม มีรายงานการศึกษาพบว่า น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของคลอรีนเฮกซิดีนมีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหืองจากมนุษย์และเซลล์เนื้อเยื่อผิว^{2,8} อาจก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อช่องปาก เกิดอาการปากแห้ง หรือเกิดแผลในช่องปาก²⁶ กลไกความเป็นพิษต่อเซลล์ของคลอรีนเฮกซิดีนจะทำให้เซลล์เกิดการรั่วซึมหรือเกิดการตกตะกอนของส่วนประกอบภายในเซลล์ คลอรีนเฮกซิดีนเข้าทำปฏิกิริยาที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนที่เป็นประจุบวกของคลอรีนเฮกซิดีนเข้าจับกับส่วนที่เป็นประจุลบของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเปลี่ยนแปลง เกิดการรั่วซึมของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular-weight) ออกจากเซลล์ เมื่อสัมผัสกับคลอรีนเฮกซิดีนที่มีความเข้มข้นต่ำ แต่ถ้าเซลล์สัมผัสกับคลอรีนเฮกซิดีนที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายมากขึ้นจนเซลล์รั่วซึมและแตก²⁷ ส่วนกลไกความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหืองจากมนุษย์ของน้ำมันหอมระเหยสะมิ็ดขาวและตะไคร้ยังไม่ทราบชัดเจน เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยบริสุทธิ์ที่ถูกสกัดพบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด ทำให้ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ใดเซลล์หนึ่งแบบเฉพาะ แต่มีการศึกษาพบว่า น้ำมันหอมระเหยมีส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic) สามารถแทรกผ่านผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้โครงสร้างชั้นเซลล์แยกออกจากกัน มีรายงานพบว่า น้ำมันหอมระเหยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติเป็นของไหล (membrane fluidity) เพิ่มขึ้น เกิดการรั่วซึมของไอออน (ion) และโปรตีนออกจากเซลล์ ทำให้เซลล์แตกและตาย เมื่อส่องกล้องจุลทรรศน์พบว่าลักษณะรูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลง พบเซลล์มีลักษณะบวมหรือหดตัวและเหี่ยวลง หรือมีช่องว่างเกิดขึ้นภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำมันหอมระเหยทำหน้าที่เป็นโปรออกซิแดนต์ (prooxidant) ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายโปรตีนและดีเอ็นเอ (DNA) ของเซลล์ ทำให้เกิดเซลล์ตายและแสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์^{28,29} จากผลการศึกษา

น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 $\mu\text{l/ml}$ และสะมิ็ดขาว 8 $\mu\text{l/ml}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหืองจากมนุษย์น้อยกว่าน้ำยาบ้วนปากคลอรีนเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.12 ทำให้ผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ตัวรับนี้สามารถนำไปใช้โดยมีผลข้างเคียงจากอาการไม่พึงประสงค์ลดลงและลดการระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อในช่องปากได้

การเปรียบเทียบผลการศึกษากับการศึกษาค้นคว้าที่ทำการทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยสะมิ็ดขาวและตะไคร้ที่ผสมในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยช่องปากยังมีการศึกษาน้อยและมีข้อจำกัด เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยในการศึกษานี้อยู่ในรูปแบบของน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์จึงมีส่วนประกอบที่แตกต่างจากน้ำมันหอมระเหยบริสุทธิ์ แต่ผลการศึกษามีวิธีทดสอบความเป็นพิษแตกต่างกัน รวมถึงเซลล์ที่ใช้ทดสอบแตกต่างกัน จึงไม่สามารถนำผลการศึกษามาเปรียบเทียบกันได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม พบการศึกษาที่ทำการทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยบริสุทธิ์จากสมุนไพรทั้งสองชนิด ได้แก่ การศึกษาของ De Oliveira และคณะในปี ค.ศ. 2017¹⁶ ศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์สร้างแผ่นชีวภาพที่สัมพันธ์กับการเกิดฟันผุและทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต่อเซลล์ไลน์ human keratinocyte (HaCat) ด้วยวิธีเอ็มทีที พบว่า น้ำมันหอมระเหยตะไคร้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus acidophilus*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguinis* และ *S. sobrinus* สามารถลดจำนวนเชื้อ *Lactobacilli* และ *Streptococci* ในรูปของแผ่นชีวภาพ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อจุลินทรีย์สร้างแผ่นชีวภาพที่สัมพันธ์กับการเกิดฟันผุบนผิวเคลือบฟัน ส่วนการทดสอบความเป็นพิษ พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ human keratinocyte ในระดับต่ำ การศึกษาของ Ortega-Cuadros และคณะในปี ค.ศ. 2018³⁰ ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* และทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต่อเซลล์ keratinocyte และเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast cell) ด้วยวิธีเอ็มทีที พบว่า เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) และวัดร้อยละความตายของเซลล์ (% mortality) พบว่า มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* โดยมีค่าร้อยละความตายของเซลล์เท่ากับร้อยละ 96 ส่วนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ keratinocyte และเซลล์สร้างเส้นใยด้วยวิธีเอ็มทีที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 1, 0.1 และ 0.01 $\mu\text{g/ml}$ พบว่า ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้มีการศึกษาของ Nikolic และคณะในปี ค.ศ. 2017³¹ ศึกษาการเสริมฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และทดสอบความเป็นพิษของน้ำมัน

หอมระเหยจากมะนาว (*Citrus limon*) น้ำมันหอมระเหยจากพริกไทย (*Piper nigrum*) และน้ำมันหอมระเหยจากต้นทรีที (*Melaleuca alternifolia* หรือ tree tea) ซึ่งอยู่ในสกุลเดียวกับเสม็ดขาว ทำการทดสอบการเสริมฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปากหลายชนิดได้แก่ *S. pyogenes*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *L. acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* และ *Candida tropicalis* ทดสอบด้วยวิธี microdilution พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากต้นทรีทีมีฤทธิ์ต้านราได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำมันหอมระเหยจากมะนาวและพริกไทย ส่วนการทดสอบความเป็นพิษใช้เซลล์หลายชนิดได้แก่ human cervix carcinoma cells (HeLa), human myelogenous leukaemia cells (K562), lung adenocarcinoma cells (A549), colon cancer cells (LS-174), melanoma cells (FemX) และ human foetal lung fibroblast cells (MRC-5) ทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีเอ็มทีที โดยให้เซลล์สัมผัสน้ำมันหอมระเหยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และวัดความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ร้อยละ 50 (50% inhibitory concentration) พบว่า น้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิด มีความเป็นพิษน้อยกว่า cisplatin (CDDP) ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวกและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ การศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาวต่อเซลล์สร้างเส้นใยช่องปากพบว่าการศึกษาน้อย ส่วนมากเป็นการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็ง มีวิธีการทดสอบความเป็นพิษและเซลล์ที่ใช้แตกต่างกัน จึงอาจไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้อย่างชัดเจน

น้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้มีรายงานการศึกษาพบว่า มีสรรพคุณทางยาหลายอย่าง ทั้งฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด^{9,10} รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์¹¹ การใช้ น้ำมันหอมระเหยมากกว่าหนึ่งชนิดมาผสมกัน อาจทำให้เกิดการเสริมฤทธิ์ (synergistic) หรือการต้านฤทธิ์ (antagonistic) หรือมีฤทธิ์เท่าเดิม (addictive) ขึ้นอยู่กับสารที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด³² จากการศึกษาพบว่า น้ำมันบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml และเสม็ดขาว 8 µl/ml มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าน้ำมันบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว 8 µl/ml อย่างเดียวในเกือบทุกค่าความเข้มข้น แสดงว่าการนำน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว 8 µl/ml และตะไคร้ 4 µl/ml มาผสมในน้ำมันบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์จะมีการต้านฤทธิ์กัน จึงแสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าการใช้ น้ำมันหอมระเหย เสม็ดขาว 8 µl/ml เพียงอย่างเดียวในน้ำมันบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ ซึ่งผลการศึกษานี้สามารถนำระดับความเข้มข้นมากที่สุดที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยช่องปากชนิดเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจาก

มนุษย์มาใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์น้ำมันบ้วนปาก เพื่อเป็นทางเลือกเสริมในการดูแลสุขภาพช่องปาก โดยความเข้มข้นที่แนะนำใช้ได้อย่างปลอดภัยของน้ำมันบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว 8 µl/ml หรือน้ำมันบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml และเสม็ดขาว 8 µl/ml คือ ระดับความเข้มข้น 1:32 และน้ำมันบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml คือ ระดับความเข้มข้น 1:16 อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาสรรพคุณด้านอื่น ๆ ทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติม เช่น ฤทธิ์ต้านแผ่นชีวภาพ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ การทดสอบการคงตัวของน้ำมันบ้วนปาก รวมทั้งทำการศึกษาผลทางคลินิกก่อนนำไปใช้จริง

บทสรุป

การศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว และตะไคร้ที่ผสมในน้ำมันบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยช่องปากด้วยวิธีเอ็มทีทีและวิธีแอลดีเอช พบว่า น้ำมันบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีเฉพาะส่วนผสมพื้นฐานมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยที่สุด น้ำมันบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าน้ำมันบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว 8 µl/ml น้ำมันบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับน้ำมันบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวเพียงอย่างเดียว และน้ำมันบ้วนปากคลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.12 มีเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริวุฒิ สุขขี ที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัย ขอขอบพระคุณคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ สถานที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปีงบประมาณ 2563

เอกสารอ้างอิง

1. Mouthwash, (Mouthrinse) [Internet]. 2009 [cited 9 NOV 2018]. Available from: <http://www.ada.org/en/member-center/oral-health-topics/mouthrinse>.
2. Müller H-D, Eick S, Moritz A, Lussi A, Gruber R. Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of Oral Rinses *In Vitro*. *Biomed Res Int* 2017;1-9.
3. Vinken M, Blaauboer BJ. Review: *In vitro* testing of basal cytotoxicity:

- Establishment of an adverse outcome pathway from chemical insult to cell death. *Toxicol In Vitro* 2017;39:104-10.
4. Li W, Zhou J, Xu Y. Study of the *in vitro* cytotoxicity testing of medical devices. *Biomed Rep* 2015;3(5): 617-20.
 5. Barnett ML. The rationale for the daily use of an antimicrobial mouthrinse. *J Am Dent Assoc* 2006;137:16s-21s.
 6. Osso D, Kanani N. Antiseptic mouth rinses: An Update on Comparative Effectiveness, Risks and Recommendations. *J Dent Hyg* 2013;87(1):10-8.
 7. Ellepola AN, Samaranyake LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Dis* 2001;7(1):11-7.
 8. Rajabalian S, Mohammadi M, Mozaffari B. Cytotoxicity evaluation of Persica mouthwash on cultured human and mouse cell lines in the presence and absence of fetal calf serum. *Indian J Dent Res* 2009;20(2): 169-73.
 9. Tanit N. Potentiality of Melaleuca cajuputi Powell cultivation to develop for economic plantation purpose. *J of Sirindhorn Peat Swamp Forest Study and Res* 2002;3:93-100.
 10. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(1):50-62.
 11. Tanukham B, Itthidecharon C, Wanachantararak P. Antifungal Activity of Melaleuca cajuputi Powell essential oil alcohol-free mouthwash against Candida albicans. Proceeding of the 5th Annual Meeting of The Royal College of Dental Surgeons of Thailand by The Thai Association of Oral and Maxillofacial Surgery and The Endodontic Society of Thailand: Expanding Knowledge for Better Dental Practice. 2016 Sept 14-16; Bangkok, Thailand.
 12. Khonsung P. Review article: Cymbopogon citratus (DC) Stapf. *Thai J Pharmacol* 2012;34(2):37-51.
 13. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999;86(6):985-90.
 14. Taweekaisupapong S, Chitropas P, Khunkitti W. Inhibitory effect of lemongrass oil and its major constituents on Candida biofilm and germ tube formation. *S Afr J of Bot* 2012;81:95-102.
 15. Kukkamalla MA, Bhat GS, Pentapati KC, Goyal R. Antiplaque Efficacy of Lemongrass Oil Mouthwash – An *in vitro* study. *Glob J of Med Res* 2012;12:19-23.
 16. De Oliveira MAC, Borges AC, Brighenti FL, Salvador MJ, Gontijo AVL, Koga-Ito CY. Cymbopogon citratus essential oil: effect on polymicrobial caries-related biofilm with low cytotoxicity. *Braz Oral Res* 2017; 31(1): 1-12.
 17. Sattthanakul P, Taweekaisupapong S, Paphangkorakit J, Pesee M, Timabut P, Khunkitti W. Antimicrobial effect of lemongrass oil against oral malodour micro-organisms and the pilot study of safety and efficacy of lemongrass mouthrinse on oral malodour. *J Appl Microbiol* 2015;118(1):11-7.
 18. Raungsawat P, Itthidecharon C, Wanachantararak P. Influence of Melaleuca cajuputi Powell and Cymbopogon citratus essential oil formulated in alcohol-free mouthwash against Candida albicans culture. *CM Dent J* 2019;40(3):125-34.
 19. Pipatphatsakorn M, Temkitthawon P, Teenawong C, et al. Antifungal Activity and Cytotoxicity to Human Gingival Fibroblast of Terminalia Bellirica Compounds in Dichloromethane Fraction. *CM Dent J* 2018; 39(1): 61-74.
 20. Rassem HA, Nour AH, Yunus RM. Techniques for extraction of essential oils from plants: a review. *AJBAS* 2016;10(16):117-27.
 21. Industrial Product Standards Act, B.E. 2511 (1968). Notification of the Ministry of Industry No. 3749. Mouthwash. Vol. 124, special part 155 date 16th October B.E. 2550.
 22. LDH cytotoxicity assay, (LDH cytotoxicity assay) [Internet]. 2019 [cited 3 JUL 2019]. Available from: http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?catalog_id=KA0785.
 23. ISO 10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for *in vitro* Cytotoxicity. 2009.
 24. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm* 2005;288(2):369-76.
 25. Bahuguna A, Khan I, Bajpai VK, Kang SC. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh J Pharmacol* 2017; 12(2):115-8.
 26. Kumar SB. Chlorhexidine mouthwash-a review. *J Pharm Sci & Res* 2017;9(9):1450-52.
 27. Cortelli JR, Thénoux RELS. The effect of mouthrinses against oral microorganisms. *Braz Oral Res* 2007;21:23-8.
 28. Bhardwaj P, Alok U, Khanna A. *In vitro* cytotoxicity of essential oils: A review. *Int J Res Pharm Chem* 2013;3(3):675-81.
 29. Reichling J, Schnitzler P, Suschke U, Saller R. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties-an Overview. *Forsch Komplementmed* 2009;16:79-90.
 30. Ortega-Cuadros M, Tofiño-Rivera AP, Merini LJ, Martinez-Pabon MC. Antimicrobial activity of Cymbopogon citratus (Poaceae) essential oil on Streptococcus mutans biofilm and cytotoxic effect on keratinocytes and fibroblasts. *Int J Trop Biol* 2018;66(4):1519-29.
 31. Nikolic MM, Jovanović KK, Marković TL, Marković DL, Gligorijević NN, Radulovic SS, et al. Antimicrobial synergism and cytotoxic properties of Citrus limon L., Piper nigrum L. and Melaleuca alternifolia (Maiden and Betche) Cheel essential oils. *J Pharm Pharmacol* 2017;69:1-9.
 32. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. *Medicines (Basel)* 2017;4(3): 58.