บทวิทยาการ

ความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้ที่ผสมในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยช่องปาก

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

จิตรลดา ธนาภินันท์[1], จินตนา อิทธิเดชารณ[2], เพ็ญพิชชา วนจันทรรักษ์[3], ธนพัฒน์ ศาสตระรุจิ[3]

Jidlada Thanabhinunt[1], Chintana Itthidecharon[2], Phenphichar Wanachantararak[3], Thanapat Sastraruji[3]

[1]โรงพยาบาลศรีวิไล อำเภอศรีวิไล จ.บึงกาฬ ประเทศไทย

[1]Sriwilai hospital, Sriwilai district, Buengkan, Thailand

[2]ภาควิชาทันตกรรมครอบครัวและชุมชน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ ประเทศไทย

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

[3]ศูนย์วิจัยทางทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ ประเทศไทย

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

article in press

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้ที่ผสมในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยช่องปากชนิดเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์ ศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม หลุมละ 2.5 x10^4 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มไม่มีสี ที่มีซีรัมจากลูกวัวในครรภ์ความเข้มข้นร้อยละ 10 และยาปฏิชีวนะ แบ่งน้ำยาบ้วนปากเป็น 5 กลุ่มทดลอง ได้แก่ กลุ่มทดลองที่ 1 น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีเฉพาะส่วนผสมพื้นฐาน กลุ่มทดลองที่ 2 น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml กลุ่มทดลองที่ 3 น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว 8 µl/ml กลุ่มทดลองที่ 4 น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml และเสม็ดขาว 8 µl/ml และกลุ่มทดลองที่ 5 น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้น ร้อยละ 0.12 นำน้ำยาบ้วนปากทั้ง 5 กลุ่มทดลองเจือจางความเข้มข้นลงครึ่งละสองเท่าใส่ลงในจานเพาะเลี้ยง กำหนดกลุ่มควบคุมบวก คือ หลุมที่ใส่น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.12 กลุ่มควบคุมลบ คือ หลุมที่ใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มไม่มีสี นำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 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 ($p<0.05$) สรุปได้ว่าน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีเฉพาะส่วนผสมพื้นฐานมีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์น้อยที่สุด น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว 8 µl/ml น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวเพียงอย่างเดียว และน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.12 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด

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

article in press

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 x10^4 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 µl/ml, alcohol-free mouthwash with essential oil from *Melaleuca cajuputi Powell* 8 µl/ml, alcohol-free mouthwash supplemented with 4 µl/ml *Cymbopogon citratus* and 8 µl/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% CO_2, 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 µl/ml *Cymbopogon citratus* was less cytotoxicity than alcohol-free mouthwash with essential oil from *Melaleuca cajuputi Powell* 8 µl/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: **Revised date:** **Accepted date:**

Doi:

ติดต่อเกี่ยวกับบทความ :

จินตนา อิทธิเดชารณ ภาควิชาทันตกรรมครอบครัวและชุมชน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ ประเทศไทย 50200 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, Thailand, 50200, Tel: 053-944470, 086-920-1393 E-mail: chintana.itt@cmu.ac.th

บทนำ

ผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายและมีหลากหลายชนิด American Dental Association (ADA)[1] แบ่งประเภทของน้ำยาบ้วนปากเป็น 2 ประเภท คือ น้ำยาบ้วนปากชนิดทั่วไป (cosmetic mouthwash) เป็นน้ำยาบ้วนปากที่ไม่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก ใช้เพื่อควบคุมกลิ่นปากชั่วคราวหรือใช้ในระยะเวลาสั้น ๆ เท่านั้น และน้ำยาบ้วนปากที่ใช้รักษาโรคในช่องปาก (therapeutic mouthwash) เป็นน้ำยาบ้วนปากที่มีสารออกฤทธิ์ (active ingredients) ควบคุมและลดคราบจุลินทรีย์ ลดการเกิด

เหงือกอักเสบ กลิ่นปากและฟันผุ สรรพคุณและประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ ถึงแม้ผลข้างเคียงจากการใช้น้ำยาบ้วนปากพบได้น้อยมาก แต่พบว่ามีรายงานการเกิดอาการแพ้จากส่วนผสมบางชนิดในน้ำยาบ้วนปากได้[2] ผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากที่นำมาใช้จึงต้องคำนึงถึงความปลอดภัยและความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย (biocompatibility) ต้องได้รับการประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ที่กำหนด การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในห้องปฏิบัติการ (cytotoxicity *in vitro*) จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biological evaluation)[3] และเป็นเครื่องบ่งชี้ในการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากเป็นวิธีการทดสอบที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ[4]

ในช่องปากพื้นผิวบริเวณตัวฟันไม่ใช่เพียงส่วนเดียวที่เกิดการสร้างคราบจุลินทรีย์ แต่บริเวณเนื้อเยื่อช่องปาก และลิ้นก็เป็นแหล่งในการกักเก็บแบคทีเรียและเกิดการสร้างคราบจุลินทรีย์ได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นการใช้น้ำยาบ้วนปากเป็นประจำจึงช่วยเสริมการทำความสะอาดนอกเหนือจากการแปรงฟัน ลดเชื้อแบคทีเรียและคราบจุลินทรีย์ในช่องปากได้[5,6] น้ำยาบ้วนปากที่นิยมใช้ในทางทันตกรรม ได้แก่ น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของคลอร์เฮ็กซิดีน (chlorhexidine) เนื่องจากมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ลดการเกิดเหงือกอักเสบ ลดคราบจุลินทรีย์[6] และมีฤทธิ์ในการต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์ (*C. albicans*)[7] แต่เนื่องจากมีรสชาติที่ไม่ดี ใช้เป็นระยะเวลานานทำให้การรับรสเปลี่ยนแปลง และเกิดการติดสีน้ำตาล (brown staining) ที่ตัวฟัน เนื้อเยื่อช่องปาก และลิ้น[6,7] มีรายงานการศึกษาพบว่า น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของคลอร์เฮ็กซิดีนมีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์และเซลล์เนื้อเยื่อบุผิว (epithelial cell) ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่นำมาใช้[2,8] จากผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ต่าง ๆ เหล่านี้ ทำให้มีการนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาและป้องกันโรคที่เกิดในช่องปากมากขึ้น โดยนำสรรพคุณในการเป็นยารักษาโรคมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพช่องปากทั้งในรูปแบบของยาสีฟันหรือน้ำยาบ้วนปาก มีการนำสมุนไพรผสมในน้ำยาบ้วนปากในรูปแบบของน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในน้ำยาบ้วนปาก มีการศึกษาพบว่า น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ลดการเกิดเหงือกอักเสบ ลดการเกิดคราบจุลินทรีย์ และช่วยให้ลมหายใจสะอาด (fresh breath)[6] รวมถึงน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาวและตะไคร้ เสม็ดขาวเป็นพืชที่พบได้ในพื้นที่ดินเค็มแถวชายฝั่งทะเล ในประเทศไทยพบต้นเสม็ดขาวได้มากทางภาคตะวันตกเฉียงใต้ ภาคตะวันออก และภาคใต้ น้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพได้หลายชนิด[9,10] รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์[11] ตะไคร้เป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย[12] น้ำมันหอมระเหยตะไคร้มีฤทธิ์ในการต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์[13,14] ลดการเกิดคราบจุลินทรีย์[15] มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพสร้างแผ่นชีวภาพ (biofilm) ที่สัมพันธ์กับการเกิดฟันผุ[16] และช่วยลดกลิ่นปากได้[17] มีการศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้ที่ผสมในตำรับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์เพื่อต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์ ด้วยวิธี disc diffusion และ broth microdilution พบว่า ตำรับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ส่วนผสมจากน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวความเข้มข้น 8 µl/ml และตะไคร้ความเข้มข้น 4 µl/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[18] ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นตำรับน้ำยาบ้วนปากในอนาคต ทั้งนี้ ยังไม่พบรายงานการศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้ที่ผสมในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ต่อเซลล์ในช่องปาก ดังนั้น ในการศึกษาวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้ที่ผสมในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยช่องปาก

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์สร้างเส้นใยช่องปากที่ใช้ในการศึกษาเป็นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์มีหลักเกณฑ์การคัดเข้า คือ อาสาสมัครที่มารับการรักษา ณ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 3 คน อายุระหว่าง 18-25 ปี ถอนฟันด้วยเหตุผลทางทันตกรรมจัดฟันหรือตามคำแนะนำของทันตแพทย์ ฟันแท้ซี่ที่จะถอนเป็นฟันกรามซี่ที่สามในขากรรไกรบนหรือขากรรไกรล่าง มีสภาพสมบูรณ์ ไม่มีโรคฟันผุ ไม่มีโรคของเนื้อเยื่อในฟัน และไม่มีการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ ได้เซ็นใบยินยอมให้เก็บชิ้นเนื้อเยื่อเหงือก โดยโครงการนี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ์สวัสดิภาพและป้องกันภยันตรายของผู้ถูกวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (เอกสารเลขที่ 64/2562) และผ่านการรับรองด้านความปลอดภัยทางชีวภาพจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับส่วนงานชุดที่ 5 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Approval No. CMUIBC A-0563003) หลักเกณฑ์การคัดออก คือ อาสาสมัครที่มีโรคทางระบบ รับประทานยารักษาโรคใด ๆ เป็นประจำ ฟันซี่ที่ถอนเกิดความซับซ้อนขึ้นระหว่างการถอนฟันจนทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อเหงือกได้

นำฟันตัวอย่างมาล้างด้วยสารละลายพีบีเอส (phosphate buffer saline; PBS) ตัดชิ้นเนื้อเยื่อเหงือกที่ติดมากับฟันที่ถูกถอนให้มีขนาดประมาณ 1x1x1 มิลลิเมตร นำไปวางในจานเพาะเลี้ยง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM) ที่มีซีรัมจากลูกวัวในครรภ์ความเข้มข้นร้อยละ 10 (fetal bovine serum ; FBS) และยาปฏิชีวนะเพนนิซิลินจีโซเดียม

article in press

article in press

(Penicillin G sodium) 10,000 หน่วยต่อมิลลิลิตร สเตรปโตมัยซินซัลเฟต (Streptomycin sulfate) 100,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แอมโฟเทอริซินบี (Amphotericin B) 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอลกลูตามีน (L-glutamine) ความเข้มข้นร้อยละ 1 บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2 วัน จนเซลล์เคลื่อนออกจากชิ้นเนื้อเยื่อเหงือกและเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยง จากนั้นถ่ายเซลล์ลงจานเพาะเลี้ยงอันใหม่และเริ่มนับเซลล์เป็นรุ่นที่ 1 การศึกษานี้จะใช้เซลล์รุ่นที่ 3 ถึง 5[19]

การเตรียมน้ำมันหอมระเหย

นำใบเสม็ดขาวและตะไคร้สด 5 กิโลกรัมมาบดผสมกับน้ำสะอาดสกัดด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำในเครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหยขนาด 5 ลิตร จะได้น้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวมีลักษณะเขียวใส และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้มีลักษณะใส เก็บน้ำมันหอมระเหยที่ได้ในภาชนะปิดสนิททึบแสงในตู้เย็น[20]

การเตรียมน้ำยาบ้วนปาก

เตรียมส่วนผสมพื้นฐานของน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ 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) และน้ำกลั่น[21]

แบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทดลองที่ 1 คือ น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีเฉพาะส่วนผสมพื้นฐาน กลุ่มทดลองที่ 2 คือ น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml กลุ่มทดลองที่ 3 คือ น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว 8 µl/ml กลุ่มทดลองที่ 4 คือ น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว 8 µl/ml และตะไคร้ 4 µl/ml[18] และกลุ่มทดลองที่ 5 คือ น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.12 ชนิดไม่มีสี โดยเจือจางความเข้มข้นลงครั้งละสองเท่า ตั้งแต่ความเข้มข้น 1:2 ถึง 1:512 ในหลอดเอพเพ็นดอร์ฟ (eppendorf) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มไม่มีสี

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์ด้วยวิธีเอ็มทีที

นำเซลล์ที่เตรียมไว้ถ่ายลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มไม่มีสี หลุมละ 200 ไมโครลิตร และมีเซลล์จำนวน 2.5 x10^4 เซลล์/หลุม บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงออกมาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งและเติมน้ำยาบ้วนปากทั้ง 5 กลุ่มทดลอง ใส่จานเพาะเลี้ยงหลุมละ 200 ไมโครลิตร กำหนดกลุ่มควบคุมลบ คือ หลุมที่ใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มไม่มีสี กลุ่มควบคุมบวก คือ หลุมที่ใส่น้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.12 ชนิดไม่มีสี เตรียมอีกหลุมใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มไม่มีสี 200 ไมโครลิตร และเติมสารละลายไทรทันเอ็กซ์-100 ความเข้มข้นร้อยละ 1 (1% Triton X-100) เพื่อใช้สำหรับการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีแอลดีเอชในขั้นตอนต่อไป นำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำจานเพาะเลี้ยงปั่นเหวี่ยงที่ 250 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าใส่จานเพาะเลี้ยงใหม่ หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีแอลดีเอช ส่วนเซลล์ก้นหลุมในจานเพาะเลี้ยงเดิมนำไปทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีเอ็มทีที โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มไม่มีสีหลุมละ 150 ไมโครลิตร และเติมสารละลายเอ็มทีที (3 (4,5 dimethylthiazol-2-yl) 2,5 diphenyltetrazolium bromide) หลุมละ 50 ไมโครลิตร ที่ได้จากการเตรียมเตรียมสารละลายเอ็มทีทีความเข้มข้น 5 mg/ml ในสารละลายพีบีเอส และกรองด้วยตัวกรองปราศจากเชื้อ 0.22 µm นำจานเพาะเลี้ยงบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำจานเพาะเลี้ยงออกมาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่า และสารละลายเอ็มทีทีทิ้ง เติมสารละลายดีเอ็มเอสโอ (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)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์ด้วยวิธีแอลดีเอช

การศึกษานี้ใช้ชุดทดสอบความเป็นพิษ LDH-Cytotoxicity Assay Kit (KA0785-Abnova) ประกอบด้วยสารคะตะลิสต์ (catalyst) และสารละลายสีย้อม (dye solution) โดยผสมสารคะตะลิสต์และน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที ส่วนสารละลายสีย้อมนำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเตรียมผสมสารละลายรีแอคชั่นมิกซ์เจอร์ (reaction mixture) สำหรับทดสอบความเป็นพิษให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม โดยผสมระหว่างสารละลายคะตะลิสต์ 250 ไมโครลิตร และสารละลายสีย้อม 11.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน[22]

นำจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าหลุมละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายรีแอคชั่นมิกซ์เจอร์หลุมละ 100 ไมโครลิตร กำหนดกลุ่ม low sample และ low control คือ หลุมที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์

ดีเอ็มอีเอ็มไม่มีสี กลุ่ม high sample คือ หลุมที่ใส่สารละลายไทรทันเอ็กซ์-100 ความเข้มข้นร้อยละ 1 และกลุ่มทดสอบ คือ น้ำยาบ้วนปากทั้ง 5 กลุ่มทดลอง นำจานเพาะเลี้ยงเก็บในที่ไม่มีแสง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านความยาวคลื่นที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (% Cytotoxicity) จากนั้นนำมาหาค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การศึกษานี้ทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรมเอพีเอสเอส สำหรับวินโดว์รุ่น 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 แสดงถึงไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์[23]

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์ด้วยวิธีเอ็มทีที

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

ตารางที่ 1 *ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และความเข้มข้นของน้ำยาบ้วนปากจากการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีเอ็มทีที*

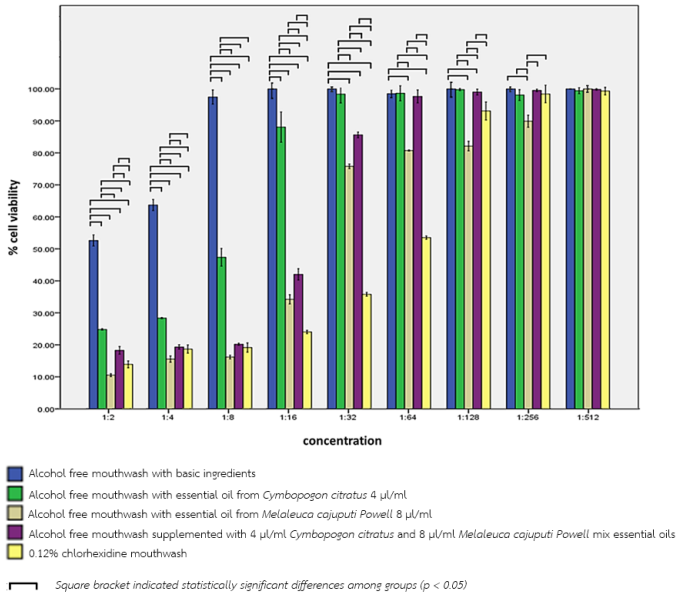
Table 1 *The relationship between mean ± standard deviations of percent of cell viability and concentration of mouthwash determined by MTT cytotoxicity assay*

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

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

article in press

article in press



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 และน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 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 และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (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*

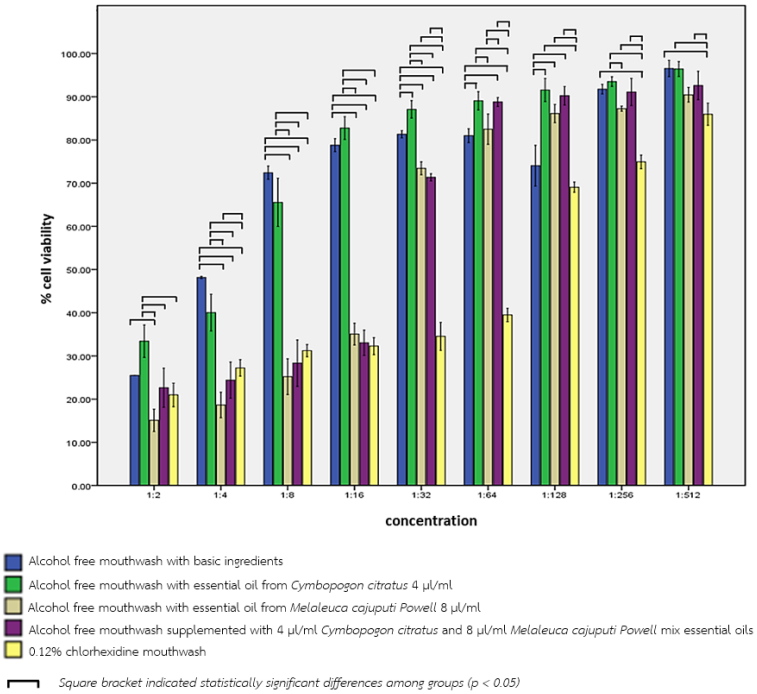
Concentrations	Percent of cell viability (mean ± SD)				
	Alcohol-free mouthwash				
	Basic ingredients	4 µl/ml *Cymbopogon citratus* essential oil	8 µl/ml *Melaleuca cajuputi Powell* essential oil	4 µl/ml *Cymbopogon citratus,* 8 µl/ml *Melaleuca cajuputi Powell* mix essential oils	0.12% chlorhexidine
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				
	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
1:64	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

การศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้ที่ผสมในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยช่องปากด้วยวิธีเอ็มทีที เป็นการวัดความมีชีวิตของเซลล์จากการทำงานของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ในขณะที่เซลล์ยังไม่ถูกทำลายด้วยพิษของสารทดสอบ ส่วนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีแอลดีเอช เป็นการวัดเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ที่ถูกทำลายหรือเซลล์ที่ตายหลังจากได้รับพิษของสารทดสอบ

article in press

article in press

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้ง 2 วิธี เป็นวิธีที่มีความแม่นยำและใช้ระยะเวลาทดสอบไม่นาน[24,25] จากการศึกษานี้พบว่า การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์ของน้ำยาบ้วนปากทั้ง 5 กลุ่มทดลองจากทั้งสองวิธี มีผลการทดสอบความเป็นพิษไปในทิศทางเดียวกัน คือ น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีเฉพาะส่วนผสมพื้นฐานมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยที่สุด น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว 8 µl/ml น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวเพียงอย่างเดียว และมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.12 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากมาตรฐานที่ใช้ในทางทันตกรรม มีรายงานการศึกษาพบว่า น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของคลอร์เฮ็กซิดีนมีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์และเซลล์เนื้อเยื่อบุผิว[2,8] อาจก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อช่องปาก เกิดอาการปากแห้ง หรือเกิดแผลในช่องปาก[26] กลไกความเป็นพิษต่อเซลล์ของคลอร์เฮ็กซิดีนจะทำให้เซลล์เกิดการรั่วซึมหรือเกิดการตกตะกอนของส่วนประกอบภายในเซลล์ คลอร์เฮ็กซิดีนเข้าทำปฏิกิริยาที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนที่เป็นประจุบวกของคลอร์เฮ็กซิดีนเข้าจับกับส่วนที่เป็นประจุลบของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเปลี่ยนแปลง เกิดการรั่วซึมของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular-weight) ออกจากเซลล์ เมื่อสัมผัสกับคลอร์เฮ็กซิดีนที่มีความเข้มข้นต่ำ แต่ถ้าเซลล์สัมผัสกับคลอร์เฮ็กซิดีนที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายมากขึ้นจนเซลล์รั่วซึมและแตก[27] ส่วนกลไกความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์ของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้ยังไม่ทราบชัดเจน เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยบริสุทธิ์ที่ถูกสกัดพบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด ทำให้ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ใดเซลล์หนึ่งแบบเฉพาะ แต่มีการศึกษาพบว่า น้ำมันหอมระเหยมีส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic) สามารถแทรกผ่านผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้โครงสร้างชั้นเซลล์แยกออกจากกัน มีรายงานพบว่าน้ำมันหอมระเหยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติเป็นของไหล (membrane fluidity) เพิ่มขึ้น เกิดการรั่วซึมของไอออน (ion) และโปรตีนออกจากเซลล์ ทำให้เซลล์แตกและตาย เมื่อส่องกล้องจุลทรรศน์พบว่าลักษณะรูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลง พบเซลล์มีลักษณะบวมหรือหดตัวและเหี่ยวย่น หรือมีช่องว่างเกิดขึ้นภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำมันหอมระเหยทำหน้าที่เป็นโปรออกซิแดนต์ (prooxidant) ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายโปรตีนและดีเอ็นเอ (DNA) ของเซลล์ ทำให้เกิดเซลล์ตายและแสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์[28,29] จากผลการศึกษาน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml และเสม็ดขาว 8 µl/ml มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์น้อยกว่าน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.12 ทำให้ผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ตำรับนี้สามารถนำไปใช้โดยมีผลข้างเคียงจากอาการไม่พึงประสงค์ลดลงและลดการระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อในช่องปากได้

การเปรียบเทียบผลการศึกษากับการศึกษาอื่นที่ทำการทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้ที่ผสมในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยช่องปากยังมีการศึกษาน้อยและมีข้อจำกัด เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยในการศึกษานี้อยู่ในรูปแบบของน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์จึงมีส่วนประกอบที่แตกต่างจากน้ำมันหอมระเหยบริสุทธิ์ แต่ละการศึกษามีวิธีทดสอบความเป็นพิษแตกต่างกัน รวมถึงเซลล์ที่ใช้ทดสอบแตกต่างกัน จึงไม่สามารถนำผลการศึกษามาเปรียบเทียบกันได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม พบการศึกษาที่ทำการทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยบริสุทธิ์จากสมุนไพรทั้งสองชนิด ได้แก่ การศึกษาของ De Oliveira และคณะในปี ค.ศ. 2017[16] ศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพสร้างแผ่นชีวภาพที่สัมพันธ์กับการเกิดฟันผุและทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต่อเซลล์ไลน์ 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 นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อจุลชีพสร้างแผ่นชีวภาพที่สัมพันธ์กับการเกิดฟันผุบนผิวเคลือบฟัน ส่วนการทดสอบความเป็นพิษ พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ human keratinocyte ในระดับต่ำ การศึกษาของ Ortega-Cuadros และคณะในปี ค.ศ. 2018[30] 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 ที่ระดับความเข้ม 1, 0.1 และ 0.01 µg/mL พบว่า ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้มีการศึกษาของ Nikolic และคณะในปี ค.ศ. 2017[31] ศึกษาการเสริมฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพและทดสอบความเป็นพิษของน้ำมัน

หอมระเหยจากมะนาว (Citrus limon) น้ำมันหอมระเหยจากพริกไทย (Piper nigrum) และน้ำมันหอมระเหยจากต้นทรีที (Melaleuca alternifolia หรือ tree tea) ซึ่งอยู่ในสกุลเดียวกับเสม็ดขาว ทำการทดสอบการเสริมฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพในช่องปากหลายชนิดได้แก่ *S. pyogenes, S. mutans, , S. salivarius, S. sangunis, 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 มีความเป็นเป็นพิษน้อยกว่า cisplatin (CDDP) ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวกและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ การศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาวต่อเซลล์สร้างเส้นใยช่องปากพบว่ามีการศึกษาน้อย ส่วนมากเป็นการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรค มีวิธีการทดสอบความเป็นพิษและเซลล์ที่ใช้แตกต่างกัน จึงอาจไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้อย่างชัดเจน

น้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้มีรายงานการศึกษาพบว่ามีสรรพคุณทางยาหลายอย่าง ทั้งฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพหลายชนิด[9,10] รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์[11] การใช้น้ำมันหอมระเหยมากกว่าหนึ่งชนิดมาผสมกัน อาจทำให้เกิดการเสริมฤทธิ์ (synergistic) หรือการต้านฤทธิ์ (antagonistic) หรือมีฤทธิ์เท่าเดิม (addictive) ขึ้นอยู่กับสารที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด[32] จากการศึกษานี้พบว่า น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml และเสม็ดขาว 8 µl/ml มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว 8 µl/ml อย่างเดียวในเกือบทุกค่าความเข้มข้น แสดงว่าการนำน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว 8 µl/ml และตะไคร้ 4 µl/ml มาผสมในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์จะมีการต้านฤทธิ์กัน จึงแสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว 8 µl/ml เพียงอย่างเดียวในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ ซึ่งผลการศึกษานี้สามารถนำระดับความเข้มข้นมากที่สุดที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยช่องปากชนิดเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกจากมนุษย์มาใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากเพื่อเป็นทางเลือกเสริมในการดูแลสุขภาพช่องปาก โดยความเข้มข้นที่แนะนำใช้ได้อย่างปลอดภัยของน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว 8 µl/ml หรือน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml และเสม็ดขาว 8 µl/ml คือ ระดับความเข้มข้น 1:32 และน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml คือ ระดับความเข้มข้น 1:16 อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาสรรพคุณด้านอื่น ๆ ทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติม เช่น ฤทธิ์ต้านแผ่นชีวภาพ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ การทดสอบการคงตัวของน้ำยาบ้วนปาก รวมทั้งทำการศึกษาผลทางคลินิกก่อนนำไปใช้จริง

บทสรุป

การศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้ที่ผสมในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยช่องปากด้วยวิธีเอ็มทีทีและวิธีแอลดีเอช พบว่า น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีเฉพาะส่วนผสมพื้นฐานมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยที่สุด น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4 µl/ml มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว 8 µl/ml น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวเพียงอย่างเดียว และน้ำยาบ้วนปากคลอร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 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:

article in press

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, Samaranayake 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. Taweechaisupapong 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. Satthanakul P, Taweechaisupapong 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, Gligorijevic 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.