



การพัฒนาสูตรตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยกานพลู
และมะแขว่นต่อการยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์

DEVELOPMENT OF HERBAL MOUTHWASH CONTAINING *SYZYGIUM*
AROMATICUM L. AND *ZANTHOXYLUM LIMONELLA* ALSTON
ESSENTIAL OILS AGAINST *STREPTOCOCCUS MUTANS*

วาทีณี สุริยพันธุ์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2568

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

การพัฒนาสูตรตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยกานพลู
และมะแขว่นต่อการยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์

DEVELOPMENT OF HERBAL MOUTHWASH CONTAINING *SYZYGIUM*
AROMATICUM L. AND *ZANTHOXYLUM LIMONELLA* ALSTON
ESSENTIAL OILS AGAINST *STREPTOCOCCUS MUTANS*

วาทีณี สุริยพันธุ์

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2568

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง



หน้าอนุมัติการค้นคว้าอิสระ
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

การค้นคว้าอิสระเรื่อง การพัฒนาสูตรตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยกานพลู
และมะเขวนต่อการยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์

Development of Herbal Mouthwash Containing *Syzygium aromaticum*
L. and *Zanthoxylum limonella* Alston Essential Oils Against
Streptococcus mutans

ผู้ประพันธ์ วาทีณี สุริยพันธุ์

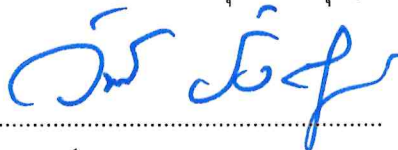
คณะกรรมการสอบ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรिता สังข์ทอง	ประธานกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัญญาวัฒน์ ปินตาทอง	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธาวุฒิ จิตติปราโมทย์	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มนตรา ศรีษะแย้ม	กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา


.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ)

คณบดี


.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสีจิตรประภา)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ อาจารย์ที่ปรึกษาเป็นอย่างยิ่งที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา ความช่วยเหลือ และคำแนะนำที่ดีจนทำให้การค้นคว้าอิสระครั้งนี้สำเร็จและลุล่วงไปได้ด้วยดี อีกทั้งยังช่วยตรวจทานและแก้ไขเล่มการค้นคว้าอิสระเล่มนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณประธานและคณะกรรมการผู้คุมสอบ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สริตา สังข์ทอง ประธานกรรมการสอบ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัญญาวัฒน์ ปินตาทอง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธราวุฒิ ฐิติปราชญ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มนตรา ศรีชะแย้ม กรรมการสอบ ที่ช่วยให้ข้อเสนอแนะที่มีประโยชน์และช่วยให้การสอบในครั้งนี้สำเร็จลุล่วง ผ่านไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงทุกท่าน ที่ถ่ายทอดความรู้จนทำให้การค้นคว้าอิสระนี้สำเร็จได้เป็นอย่างดี รวมถึงเจ้าหน้าที่ และบุคลากรประจำสำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง โดยเฉพาะ คุณโสภิน เตศรีบุรพกุล และคุณธนัชชา ประเสริฐ ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ ให้กำลังใจและอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้านจนทำให้การค้นคว้าอิสระนี้สำเร็จได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณบริษัท เทฟไทย โปรดักต์ จำกัด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และศูนย์วิจัยสุขภาพและความงาม มาโนเช่ รวมไปถึงครอบครัวและเพื่อน ๆ ทุกคนที่ให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจอย่างดีเสมอมา ผู้วิจัยหวังว่าการค้นคว้าอิสระนี้จะเป็นประโยชน์ให้แก่ผู้ที่สนใจ หากมีข้อผิดพลาดประการใดขออภัยไว้ ณ ที่นี้

วาทีณี สุริยพันธุ์

ชื่อเรื่องการค้นคว้าอิสระ	การพัฒนาสูตรตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหย
ผู้ประพันธ์	กานพลูและมะแขว่นต่อการยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์
ผู้ประพันธ์	วาทีณี สุริยพันธุ์
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากจากสมุนไพรโดยใช้น้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชสองชนิด ได้แก่ กานพลูและมะแขว่น เพื่อศึกษาการเสริมฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่มีต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ จากผลการศึกษาพบว่า น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น ให้ผลผลิตเฉลี่ยร้อยละ 13.68 ± 1.61 ส่วนน้ำมันหอมระเหยกานพลู ให้ผลผลิตเฉลี่ยร้อยละ 16.80 ± 0.27 โดยองค์ประกอบทางเคมีหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น ประกอบด้วย ดีลิมอนีนในปริมาณร้อยละ 100, ซิซาจินีนร้อยละ 81.97, ไตรคารีนร้อยละ 27.22, ทุเจนร้อยละ 19.94 และเทอร์พีนีนโพรออล ร้อยละ 19.44 ขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูมีองค์ประกอบสำคัญ ได้แก่ ยูจินอลในปริมาณร้อยละ 100, ยูจินอลอะซีเตตร้อยละ 58.25 และคาร์โอฟิลีนร้อยละ 65.90 สำหรับน้ำมันหอมระเหยผสมจากกานพลูและมะแขว่น มีองค์ประกอบหลักของสารสำคัญจากกานพลู คือ ยูจินอลพบในปริมาณร้อยละ 100 และจากมะแขว่น คือ ดีลิมอนีน ซึ่งพบในปริมาณร้อยละ 90.88 ในการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูเพียงอย่างเดียวสามารถยับยั้งเชื้อได้ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 7.81 มก./มล. ส่วนน้ำมันหอมระเหยมะแขว่นมีค่าดังกล่าวที่ 125 มก./มล. และน้ำมันหอมระเหยผสมมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 62.5 มก./มล. โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู, น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และน้ำมันหอมระเหยผสมมีค่าเท่ากับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ สำหรับการประเมินประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่พัฒนาจากน้ำมันหอมระเหยผสมระหว่างกานพลูและมะแขว่น แสดงให้เห็นว่า สูตรตำรับที่หนึ่ง ซึ่งมีส่วนผสมของน้ำมันร้อยละ 6.25 โดยน้ำหนัก สามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียจากค่าเริ่มต้น 5.30 ล็อกของจำนวนโคโลนีต่อมิลลิเมตร (log CFU/ml) เหลือ 4.94 ล็อกของจำนวนโคโลนีต่อมิลลิเมตร คิดเป็นการลดลงของเชื้อร้อยละ 56.75 ภายใน 4 นาที ในขณะที่สูตรตำรับที่สอง ซึ่งมีปริมาณน้ำมันผสมร้อยละ 12.5 โดยน้ำหนัก สามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียลงเหลือ

4.52 ลีอกของจำนวนโคลนีต่อมิลลิลิตร คิดเป็นการลดลงของเชื้อร้อยละ 83.50 แสดงให้เห็นว่าสูตรตำรับที่สอง ให้ผลในการลดจำนวนเชื้อได้ดีกว่าสูตรตำรับแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยกานพลูและมะแขว่น สามารถนำไปพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ได้

คำสำคัญ: กานพลู, เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวเทนส์, น้ำยาบ้วนปาก, น้ำมันหอมระเหย, มะแขว่น



Independent Study Title Development of Herbal Mouthwash Containing *Syzygium aromaticum* L. and *Zanthoxylum limonella* Alston Essential Oils Against *Streptococcus mutans*

Author Wathinee Suriyapan

Degree Master of Science (Cosmetic Science)

Advisor Assistant Professor Phanuphong Chaiwut, Ph. D.

ABSTRACT

This study aimed to develop herbal mouthwash formulation using essential oils extracted from two medicinal plants, *Syzygium aromaticum* and *Zanthoxylum limonella* to investigate the synergistic effects of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oils on enhancing the antibacterial activity of Makhwan (*Zanthoxylum limonella*) essential oil against *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). The results showed that the average yield of Makhwan essential oil was $13.68 \pm 1.61\%$, whereas clove essential oil exhibited $16.80 \pm 0.27\%$. The main chemical components found in Makhwan essential oil included D-Limonene (100%), Cis-sabinene (81.97%), 3-Carene (27.22%), 4(10)-Thujene (19.94%), and Terpinen-4-ol (19.44%). Meanwhile, the major chemical constituents of clove essential oil were Eugenol (100%), Eugenol acetate (58.25%), and Caryophyllene (65.90%). For the mixed essential oil from clove and Makhwan, Eugenol (100%) and D-Limonene (90.88%) were identified as the predominant constituents. The evaluation of antibacterial activity against *S. mutans* revealed that clove essential oil alone exhibited the lowest minimum inhibitory concentration (MIC) at 7.81 mg/ml, while Makhwan essential oil showed an MIC of 125 mg/ml and the MIC of the mixed essential oil was 62.5 mg/ml. The minimum bactericidal concentrations (MBC) of clove, Makhwan, and the combined oil were found to be the same as their respective MIC values. In the assessment the bactericidal activity of herbal mouthwash formulations developed from a combination of clove and Makhwan essential oils, the first formula containing 6.25% (w/w) of the mixed essential oil was able to reduce the number of *S. mutans* from 5.30 to 4.94 log CFU/mL.

within 4 minutes, corresponding to a reduction of 56.75%. Meanwhile, the second formulation, which contained 12.5% (w/w) of the oil mixture reduced the bacterial counts to 4.52 log CFU/mL, representing a 83.50% reduction. It can be implied that, the second formula demonstrated significantly greater antibacterial efficacy than the first formula. Therefore, mouthwash containing clove and Makhwan essential oils could be developed to enhance efficacy of commercial products.

Keywords: *Syzygium aromaticum*, *Streptococcus mutans*, Mouthwash, Essential Oil, *Zanthoxylum limonella*



สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
1.1 ที่มาของปัญหาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2 ทบทวนวรรณกรรม	4
2.1 เชื้อจุลินทรีย์ภายในช่องปากและการเกิดโรคฟันผุ	4
2.2 เชื้อ <i>Streptococcus mutans</i>	5
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ภายใน	6
2.4 กลไกการก่อโรคฟันผุของเชื้อ <i>Streptococcus mutans</i>	8
2.5 การป้องกันการเกิดโรคฟันผุ	10
2.6 กานพลู	12
2.7 มะแขว่น	16
3 วิธีดำเนินงานวิจัย	20
3.1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	20
3.2 เชื้อสำหรับทดสอบในงานวิจัย	21
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย	21
3.4 สมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย	22
3.5 เครื่องมือและอุปกรณ์	22
3.6 วิธีดำเนินงานวิจัย	23
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	31
4.1 การเตรียมน้ำมันหอมระเหยกานพลูและมะแขว่น	31
4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี Gas Chromatography-mass Spectrometry (GC-MS)	32
4.3 การทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Streptococcus mutans</i> ด้วยวิธี Disc Diffusion	40

สารบัญ

บทที่	หน้า
4.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยสมุนไพรที่สามารถยับยั้ง การเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) แบคทีเรีย <i>Streptococcus mutans</i> ด้วยวิธี Broth Dilution Test	43
4.5 การเตรียมตำรับน้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันหอมระเหยผสม	47
4.6 การวิเคราะห์ความคงตัวของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร	49
4.7 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหย กานพลูผสมมะแขว่น ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	52
4.8 การทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย <i>Streptococcus mutans</i> DMST 18777 ของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยกานพลู ผสมมะแขว่นต่อหน่วยเวลา (Time-kill Assay)	54
4.9 อภิปรายผล	59
5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	62
5.1 สรุปผลการวิจัย	62
5.2 ข้อเสนอแนะ	63
รายการอ้างอิง	65

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่พบได้ในช่องปาก	5
3.1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	20
3.2 เชื้อที่ใช้ทดสอบในงานวิจัย	21
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย	21
3.4 สมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย	22
3.5 เครื่องมือและอุปกรณ์ใช้ในงานวิจัย	22
3.6 ความเข้มข้นสุทธิของน้ำมันหอมระเหยจากานพลู น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น น้ำมันหอมระเหยจากานพลูผสมมะแขว่น (1:1) และยาต้านเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน Erythromycin ที่ใช้ในการทดสอบ	26
3.7 ส่วนประกอบในตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยจากานพลู ผสมมะแขว่นตำรับที่ 1 (F1) และตำรับที่ 2 (F2)	27
4.1 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยบริสุทธิ์ ที่ได้จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และจากานพลู	31
4.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากานพลู ด้วยเครื่อง GC-MS	33
4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่น ด้วยเครื่อง GC-MS	35
4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากานพลูผสมมะแขว่น ด้วยเครื่อง GC-MS	37
4.5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขอบเขตการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>S. mutans</i> (มม.) ของตัวอย่าง น้ำมันหอมระเหย ที่ปริมาณต่าง ๆ และสารควบคุมด้วยวิธี Disc Diffusion	40
4.6 ความเข้มข้นสุทธิของน้ำมันหอมระเหยจากานพลู น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และน้ำมัน หอมระเหยจากานพลูผสมมะแขว่น และยาต้านเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน Erythromycin ที่ใช้ในการทดสอบ	43
4.7 ลักษณะทางกายภาพและค่า pH ของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรทั้ง 2 ตำรับก่อน และหลังการทดสอบความคงตัว จำนวน 7 รอบ ที่สภาวะอุณหภูมิห้องและสภาวะ เร่งความร้อนสลับเย็น	49
4.8 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของตัวอย่างน้ำยาบ้วนปาก ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>S. mutans</i> ATCC 25175	53

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
4.9 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทดสอบ <i>S. mutans</i> DMST 18777 และเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อทดสอบในตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยกลีบพลูสมมะแขว่นตำรับที่ 1 (F1) เมื่อสัมผัสเชื้อที่ 0 (เริ่มต้น), 1, 2 และ 4 นาที	55
4.10 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทดสอบ <i>S. mutans</i> DMST 18777 และเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อทดสอบในตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยกลีบพลูสมมะแขว่น ตำรับที่ 2 (F2) เมื่อสัมผัสเชื้อที่ 0 (เริ่มต้น), 1, 2 และ 4 นาที	55



สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
2.1 ลักษณะของดอกกานพลูสด (ก) และดอกกานพลูแห้ง (ข)	13
2.2 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบสำคัญที่พบในกานพลู	15
2.3 ลักษณะของผลมะแขว่นสด (ก) และผลมะแขว่นแห้ง (ข)	17
2.4 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบสำคัญที่พบในผลมะแขว่น	18
4.1 โครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยกานพลู	32
4.2 โครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่น	35
4.3 โครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่น	37
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>S. mutans</i> ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู (CL oil) เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Erythromycin ด้วยวิธี Disc Diffusion	41
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>S. mutans</i> ของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่น (MK oil) เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Erythromycin ด้วยวิธี Disc Diffusion	42
4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>S. mutans</i> ของน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่น (CL oil:MK oil; 1:1) เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Erythromycin ด้วยวิธี Disc Diffusion	42
4.7 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) เชื้อแบคทีเรีย <i>S. mutans</i> โดยวิธี Broth microdilution ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู (CL oil) และยาด้านเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน Erythromycin	44
4.8 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) เชื้อแบคทีเรีย <i>S. mutans</i> โดยวิธี Broth microdilution ของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่น (MK oil) และน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่น (CL oil: MK oil; 1:1)	44
4.9 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่า (MBC) เชื้อแบคทีเรีย <i>S. mutans</i> โดยวิธี Drop plate ของยามาตรฐาน Erythromycin	45
4.10 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่า (MBC) เชื้อแบคทีเรีย <i>S. mutans</i> โดยวิธี Drop plate ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู (CL oil)	46
4.11 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่า (MBC) เชื้อแบคทีเรีย <i>S. mutans</i> โดยวิธี Drop plate ของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่น (MK oil)	46

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
4.12 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่า (MBC) เชื้อ <i>S. mutans</i> โดยวิธี Drop plate ของน้ำมันหอมระเหยจากพลูผสมมะแขว่น (CL oil:MK oil; 1:1)	47
4.13 ลักษณะทางกายภาพของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยจากพลูผสมมะแขว่นตำรับที่ 1 (F1) (1MIC) (ก) และตำรับที่ตำรับที่ 2 (F2) (2MIC) (ข)	48
4.14 น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยจากพลูผสมมะแขว่นตำรับที่ 1 (F1) (ก) และตำรับที่ตำรับที่ 2 (F2) (ข)	52
4.15 C20 chlorhexidine antiseptic mouthwash (0.12% chlorhexidine gluconate)	53
4.16 ความสัมพันธ์ของเวลากับเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อทดสอบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เมื่อสัมผัสเชื้อ <i>Streptococcus mutans</i> DMST 18777 เปรียบเทียบกับเกณฑ์ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อตามเกณฑ์ CLSI M26-A	58

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาปัญหาและความสำคัญ

โรคฟันผุ (dental caries) เป็นโรคติดเชื้อเรื้อรังของเคลือบฟันหรือเนื้อฟัน การเกิดฟันผุเป็นกระบวนการที่เกิดจากการสูญเสียแร่ธาตุ (demineralization) ของเคลือบฟันหรือเนื้อฟัน (Featherstone, 2000) โดยเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดออกมาทำลายเคลือบฟัน ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่สัมพันธ์กับการเกิดฟันผุมีอยู่หลายชนิด แต่เชื้อที่มีบทบาทสำคัญมากที่สุดของการเกิดฟันผุในระยะเริ่มต้น คือ เชื้อ เสตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) โดยเป็นเชื้อที่พบได้โดยทั่วไปในช่องปากโดยเฉพาะบริเวณผิวฟัน และเป็นสาเหตุหลักในการทำให้เกิดโรคฟันผุ โดยเฉพาะในเด็กและวัยรุ่น

นอกจากนี้ *S. mutans* ยังสามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติก (lactic acid) ทำให้สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะที่เป็นกรดได้ดี โดยกรดที่เชื้อสร้างขึ้นส่งผลให้เกิดการสลายแร่ธาตุของฟัน ทำให้เกิดฟันผุในที่สุด เชื้อนี้สามารถเกาะติดบนผิวฟันได้โดยการสร้างกลูแคน (glucan) ซึ่งเป็น extracellular polysaccharide จากน้ำตาลซูโครส (sucrose) โดยกลูแคนทำหน้าที่ยึดแบคทีเรียไว้ด้วยกันจนเกิดเป็นคราบจุลินทรีย์ (dental plaque) หรือไบโอฟิล์ม (biofilm) บนผิวฟัน (Loesche, 1986) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดปัญหาสุขภาพของช่องปาก และเป็นจุดเริ่มต้นของโรคฟันผุ กลิ่นปาก และเลือด ออกตามไรฟันได้

ในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์นอกจากการแปรงฟันแล้ว การใช้ยาบ้วนปากสามารถช่วยเสริมการดูแลสุขภาพของช่องปากได้ ยาบ้วนปากบางชนิดมีการเติมสารเคมี เช่น แอลกอฮอล์ หรือคลอเฮกซีดีน เพื่อให้มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ ซึ่งมีข้อเสียบางประการ คือ ทำให้เกิดการระคายเคืองของเนื้อเยื่อภายในช่องปาก และก่อให้เกิดอาการแสบร้อน ทำให้ปุ่มรับรสทำงานผิดปกติ หรือเกิดคราบสีน้ำตาลบนตัวฟัน และเกิดแผลในช่องปากและเหงือกได้หากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน (Ciancio, 2003)

ปัจจุบันมีการนำน้ำมันหอมระเหยมาใช้ประโยชน์ทางทันตกรรมมากขึ้น ดังนั้นการผสมน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในยาบ้วนปากจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เนื่องจากมีความปลอดภัย และไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียง มีงานวิจัยที่ศึกษาว่า การเพิ่มส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยในยาบ้วนปาก สามารถเพิ่มการยับยั้งการทำงานของคราบหินปูนและไบโอฟิล์มได้

โดยน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของคราบจุลินทรีย์นั้นมียู่อหลายชนิด อย่างไรก็ตามการใช้ น้ำมันหอมระเหยร่วมกันสามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่า เนื่องมาจากมีการเสริมฤทธิ์กัน นอกจากนี้ยังมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน ทำให้การต้านเชื้อแบคทีเรียมีประสิทธิภาพมากขึ้น และช่วยลดความเป็นไปได้ของการติดยาจากสารเคมี

ในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. mutans* ของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry) และผลมะแขว่น (*Zanthoxylum limonella* Alston) โดยในน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู จะมีสารประกอบหลัก คือ ยูจีนอล (eugenol) ซึ่งมีงานวิจัยที่ศึกษาว่ายูจีนอล สามารถยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ได้ (Nassiba et al., 2021) และในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากผลมะแขว่นมีองค์ประกอบหลักอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ sabinene, terpine-4-ol และ limonene ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและต้านจุลินทรีย์ได้ (Tangjitjaroenkun et al., 2012) โดยจากการศึกษาเกี่ยวกับน้ำยาบ้วนปากที่มีน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่น พบว่าสามารถลดคราบไบโอฟิล์มและลดการอักเสบของเหงือกได้ แต่ยังมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. mutans* อยู่บ้าง (Vachirarojpisan et al., 2021)

ดังนั้น การใช้ น้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* อาจเป็นทางเลือกที่ได้ผลแทนการใช้สารต้านแบคทีเรียอื่น ๆ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการควบคุมทั้งแบคทีเรียและยีสต์ที่ก่อให้เกิดโรคในช่องปากได้ และควรคำนึงว่าการใช้เอทานอล ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายและทำให้ส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่อยู่ในน้ำยาบ้วนปากเสถียร อาจทำให้เกิดความรู้สึกแสบร้อนและอาจนำไปสู่การพัฒนาของโรคมะเร็งคอหอยในช่องปาก (oropharyngeal cancer) (Quintas et al., 2017) ดังนั้นงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ของน้ำยาบ้วนปากที่ปราศจากแอลกอฮอล์ และมีส่วนผสมจากน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและมะแขว่น เพื่อนำมาพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากที่มีความคงตัว และสามารถนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมในการดูแลสุขภาพช่องปากต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและมะแขว่น

1.2.2 เพื่อศึกษาการเสริมฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูที่มีต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่นในการยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ในตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1.3.1 สกัดน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและมะแขว่นด้วยวิธี Hydrodistillation
- 1.3.2 วิเคราะห์องค์ประกอบเคมีในน้ำมันหอมระเหยด้วยเครื่อง GC-MS
- 1.3.3 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและมะแขว่นด้วย วิธี Disc diffusion และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และฆ่าเชื้อ (MBC)
- 1.3.4 พัฒนารับน้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันหอมระเหยกานพลูและมะแขว่น
- 1.3.5 ทดสอบความคงตัวของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร
- 1.3.6 ประเมินประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรในช่วงเวลา 4 นาที

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและมะแขว่น มีความคงตัวทั้งในด้านกายภาพและเคมี และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- 1.4.2 ตำรับยาบ้วนปากสมุนไพรที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียได้อย่างต่อเนื่องเมื่อสัมผัสกับเชื้อในระยะเวลาที่เหมาะสม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อจุลินทรีย์ภายในช่องปากและการเกิดโรคฟันผุ

โรคฟันผุเป็นโรคที่พบบ่อยในช่องปาก จัดเป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น ภายในช่องปาก โดยกระบวนการพื้นฐานในการเกิดโรคฟันผุเกิดจากการสลายแร่ธาตุ (demineralization) อันเนื่องมาจากกรดซึ่งเกิดจากการย่อยสลายอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียบางชนิดในคราบจุลินทรีย์ (dental plaque) หรือไบโอฟิล์ม ได้แก่ *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* และ *Lactobacilli* (Loesche, 2007) โดยกระบวนการเกิดคราบจุลินทรีย์เป็นกระบวนการพลวัต กล่าวคือ ร่างกายจะมีการซ่อมแซมเคลือบฟันโดยการคืนกลับของแร่ธาตุ (remineralization) ทำให้เกิดสมดุลระหว่างการสูญเสีย และการคืนกลับของแร่ธาตุที่เคลือบฟัน การเกิดฟันผุจะเกิดเมื่อการสลายแร่ธาตุ (demineralization) มากกว่าการคืนกลับแร่ธาตุ (Featherstone, 2000) ซึ่งเป็นการสูญเสียสมดุล ส่งผลให้เกิดฟันผุในระยะเริ่มแรก (initial caries) ระบบนิเวศวิทยาภายในช่องปากจะทำหน้าที่ควบคุมชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ภายในปาก โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่พบภายในช่องปากจะประกอบด้วยไวรัส แบคทีเรีย และโปรโตซัว ดังแสดงในตารางที่ 2.1 การที่มีเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้องในระบบนิเวศนี้ เนื่องจากในแต่ละบริเวณภายในช่องปากมีคุณสมบัติเฉพาะที่ไม่เหมือนกัน การมีชนิดจำกัดในเรื่องของอาหารที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละบริเวณก็มีปัจจัยทางนิเวศวิทยาที่มีความสำคัญภายใต้ภาวะดังกล่าว จึงทำให้ไม่มีประชากรของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียวที่ได้ประโยชน์ (จินตกร คุวัฒนาสุชาติ, 2549)

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่พบได้ในช่องปาก

Gram - Positive Genera	Gram - Negative Genera
<i>Streptococcus</i>	<i>Neisseria</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Moraxella</i>
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Veillonella</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Haemophilus</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Actinobacillus</i>
<i>Arachnia</i>	<i>Capnocytophaga</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>Eikenella</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>Eubacterium</i>	<i>Selenomonas</i>
<i>Rothia</i>	<i>Centipeda</i>
<i>Bacterionema</i>	<i>Treponema</i>
	<i>Bacteroides</i>
	<i>Fusobacterium</i>
	<i>Leptotrichia</i>
	<i>Wolinella</i>

ที่มา จินตกร คุ้มตันสุชาติ (2549)

2.2 เชื้อ *Streptococcus mutans*

S. mutans เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (Gram-positive cocci) ขนาด 0.5-0.75 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นสายสั้น ๆ หรือสายยาวปานกลาง หากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสภาวะเป็นกรดหรืออาหารแข็ง เซลล์จะมีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ๆ ขนาด 1.5-3.0 ไมโครเมตร โดยเฉพาะเชื้อที่แยกได้จากช่องปากจะพบรูปร่างแบบนี้ได้บ่อย แบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (non-motile) เมื่อทดสอบ catalase จะให้ผลลบ ถ้าเพาะเลี้ยงบนอาหาร blood agar (BA) และบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 2 วัน โคโลนีจะมีสีขาวหรือสีเทา รูปร่างกลมหรือไม่แน่นอน ขนาด 0.5-1.0 ไมโครเมตร บางครั้งโคโลนีค่อนข้างแข็ง และมีแนวโน้มที่จะเกาะติดบนผิวอาหารไม่สลายเมื่อดัดเล็ดแดง (alpha or non-hemolytic) แต่มีโอกาสพบ beta-hemolytic บนอาหารที่มีส่วนผสมของ sucrose เช่น Mitis Salivarius Agar (MSA) หรือ Tryptone, Yeast extract, Cystine (TYC) Agar ซึ่งโคโลนี

จะมีรูปร่างขรุขระและกองทับกัน มีขนาด 1.0 ไมโครเมตร บ่อยครั้งจะพบโคโลนีมีที่ลักษณะคล้ายเม็ดปิตส์, droplets หรือมีลักษณะเป็นของเหลว ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อสร้าง extra-cellular polysaccharide หรือ glucan ที่ไม่สามารถละลายน้ำได้อยู่รอบ ๆ โคโลนี แต่บางครั้งจะพบเป็นลักษณะเรียบหรือเป็นเมือก (Sneath, 1986) *S. mutans* ส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีอากาศ หรือมี N_2+CO_2 หรือ CO_2 เป็นหลัก แต่จะเจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยอุณหภูมิที่ทำให้เชื้อสามารถเจริญได้ดี คือ 37 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 45 องศาเซลเซียส และต่ำสุด 10 องศาเซลเซียส (Sneath, 1986) มีงานวิจัยจำนวนมากพบว่าเชื้อ *S. mutans* มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคฟันผุในระยะเริ่มต้น และสามารถพบเชื้อชนิดนี้ได้บ่อยในผู้ป่วยที่มีฟันผุหรือรอยโรคฟันผุ และเมื่อให้สัตว์ทดลองกินน้ำตาล sucrose เป็นอาหาร พบว่าเชื้อสามารถเหนียวน้ำให้เกิดฟันผุในสัตว์ทดลอง ซึ่งเหตุผลเหล่านี้เป็นที่ยืนยันว่าเชื้อ *S. mutans* มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดโรคฟันผุที่ผิวฟันและรากฟัน (Takahashi & Nyvad, 2010)

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ภายใน

2.3.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อการใช้พลังงานของแบคทีเรีย การทำงานของเอนไซม์ รวมถึงความเป็นอยู่ของแบคทีเรีย อุณหภูมิภายในช่องปากจะค่อนข้างคงที่ อยู่ระหว่าง 35-36 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด (จินตกร คุวัฒนาสุชาติ, 2549)

2.3.2 การอยู่รอดได้โดยไม่ต้องพึ่งพาออกซิเจน (Anaerobiosis)

เชื้อจุลินทรีย์ภายในปากมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันระหว่างพวกที่ต้องการออกซิเจนกับพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจน โดยดูที่ความสามารถการมีชีวิตรอดในสภาวะที่มีออกซิเจนซึ่งเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มีทั้งพวกที่เจริญเติบโตได้ดีทั้งในที่ที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องมีออกซิเจนอยู่ด้วยเท่านั้นจึงจะเจริญเติบโตได้ และพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต หากมีการรบกวนสภาพแวดล้อมที่ละน้อยในบริเวณที่เชื้อจุลินทรีย์อาศัยอยู่ จะส่งผลต่อทั้งชนิดและปริมาณของชุมชนจุลินทรีย์ (จินตกร คุวัฒนาสุชาติ, 2549)

2.3.3 สภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ความเป็นกรด-ด่างภายในช่องปากส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับน้ำลาย ในสภาวะที่ไม่ได้ถูกรกระตุ้นค่าเฉลี่ยของ pH อยู่ที่ 6.75 ในขณะที่มีของหวานอยู่ในปากความเป็นกรด-ด่างจะลดลงอย่างรวดเร็วเหลือแค่ 5 ซึ่งเกิดจากการเผาผลาญอาหารของจุลินทรีย์ ทำให้เกิดกรดแลคติก จากนั้นความเป็นกรด-ด่างจะคืนกลับสู่ระดับความเป็นกลางอย่างช้า ๆ น้ำลายมีหน้าที่ลดปริมาณของกรดที่เกิดจากคราบ

จุลินทรีย์ แต่เนื่องจากการรวมกลุ่มของแบคทีเรียทำให้คราบจุลินทรีย์มีลักษณะที่หนาแน่นและซับซ้อน จึงทำให้น้ำลายไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างที่บริเวณชั้นที่อยู่ลึกลงไปได้ ดังนั้นความเป็นกรด-ด่างภายในคราบจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับรอยผุของฟันอาจมีค่าต่ำกว่าความเป็นกลาง จึงทำให้มีเฉพาะกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทนกรดเท่านั้นที่สามารถอยู่รอดในสภาวะนี้ได้ ซึ่งในสภาวะนี้เหมาะกับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด เช่น เชื้อในกลุ่มสเตรปโตคอคไค (*Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus*) และแลคโตบาซิลไล (*Lactobacilli*) (จินตกร คุวัฒินสุชาติ, 2549)

2.3.4 โภชนาการ

อาหารจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของประชากรจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก ซึ่งอาหารที่แบคทีเรียในปากนำไปใช้มาจากน้ำลายและน้ำเหลืองเหงือก โดยในน้ำลายจะประกอบด้วยสารพวกไนโตรเจน วิตามิน คาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายน้ำได้ สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่อยู่ในปากหลายชนิด ส่วนในน้ำเหลืองเหงือกประกอบด้วย ปัจจัยที่ช่วยในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่สำคัญหลายชนิด ในคราบจุลินทรีย์มีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถผลิตโพลีแซคคาไรด์จากน้ำตาล ซูโครสทั้งภายในเซลล์และผลิตออกสู่นอกเซลล์ ซึ่งโพลีเมอร์เหล่านี้จะถูกแบคทีเรียหลายชนิดนำไปใช้เมื่อเกิดการขาดแคลนอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต (จินตกร คุวัฒินสุชาติ, 2549)

2.3.5 การเกาะติดแน่น (Adhesion)

ในขณะเคี้ยวอาหารและมีการไหลเวียนของน้ำลายนั้น เชื้อจุลินทรีย์ที่เกาะติดไม่แน่นกับผิวภายในปากจะถูกกำจัดออกจากปากได้ ดังนั้นการกลืนอาหารแต่ละครั้งจึงเป็นการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ออกจากปากได้เป็นอย่างดี เชื้อส่วนใหญ่จึงตั้งถิ่นฐานในบริเวณที่สามารถป้องกันไม่ให้ถูกกำจัดออกได้ เช่น บริเวณร่องฟัน ร่องเหงือก และบริเวณซอกฟัน มีเชื้อเพียงไม่กี่ชนิดที่มีคุณสมบัติพิเศษที่ช่วยในการยึดเกาะ กล่าวคือ เชื้อเหล่านี้จะจับโพลีแซคคาไรด์ชนิดที่ไม่ละลายน้ำออกมานอกตัวเซลล์ ซึ่งสามารถช่วยในการยึดเกาะได้ดี (จินตกร คุวัฒินสุชาติ, 2549)

2.3.6 ระบบภูมิคุ้มกัน (Immune System)

แอนติบอดีที่ทำหน้าที่ในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในปากนั้น จะมียู่อื่นทั้งในน้ำลายและในน้ำเหลืองเหงือก ซึ่งในน้ำเหลืองเหงือกยังมีภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ลูลาร์อิมมูนิตีอยู่ด้วย ดังนั้นเชื้อในช่องปากจึงถูกควบคุมด้วยระบบภูมิคุ้มกันเหล่านี้ หลักฐานที่สนับสนุนทฤษฎีดังกล่าวมาจากการศึกษาพวก *S. mutans* ซึ่งพบว่าในช่องปากบางตำแหน่งจะไม่มีเชื้อจุลินทรีย์พวกนี้เลย เพราะตำแหน่งดังกล่าวถูกควบคุมด้วยระบบภูมิคุ้มกัน (จินตกร คุวัฒินสุชาติ, 2549)

2.4 กลไกการก่อโรคฟันผุของเชื้อ *Streptococcus mutans*

2.4.1 Adhesion

ความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อ *S. mutans* เป็นปัจจัยหลักในการเกิดคราบจุลินทรีย์ หรือ biofilm ที่ผิวฟันซึ่งทำให้เกิดฟันผุตามมา โดยขึ้นกับปัจจัยหลัก 3 ประการ ดังนี้

2.4.1.1 Sucrose-independent adhesion

เป็นการยึดเกาะโดยใช้โปรตีนที่เรียกว่า antigen I/II เป็นโปรตีนที่มีขนาด 185 กิโลดาลตัน โปรตีนชนิดนี้สามารถพบได้ในเชื้อ streptococci ที่อยู่ในช่องปากสายพันธุ์อื่น ๆ ได้ด้วย (Ma et al., 1991) โดยมีชื่อเรียกต่างกันไป เช่น P1, Spa, P, Sr, Pac และ antigen B โปรตีนในกลุ่ม antigen I/II จะมีโครงสร้างบางส่วนที่เหมือนกัน แต่มีบางส่วนที่ต่างกัน จึงทำให้ความสามารถในการยึดเกาะกับโปรตีนต่าง ๆ ในน้ำลายแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของเชื้อ (Petersen et al., 2002) ส่วนสำคัญของโปรตีน antigen I/II ที่ใช้ยึดเกาะกับโปรตีนอื่น ๆ ในน้ำลาย คือ alanine-rich และ proline-rich ซึ่งจะยึดเกาะกับเยื่อผิวหรือ pellicle ที่เป็นส่วนสำคัญในการเกิดคราบจุลินทรีย์ (Yu et al., 1997) และมีรายงานการศึกษาพบว่า เชื้อ *S. mutans* สายพันธุ์กลาย P1 ที่ไม่สามารถสร้างโปรตีน antigen I/II จะมีความสามารถในการยึดเกาะกับ hydroxyapatite ที่เคลือบน้ำลายได้ลดลง การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า หากเชื้อขาดโปรตีน antigen I/II เชื้อจะยึดเกาะกับโปรตีนในน้ำลายที่เคลือบบนผิว hydroxyapatite ซึ่งเป็นส่วนประกอบของฟันได้ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าการขาดโปรตีน P1 ทำให้การสร้าง biofilm ในหลอดทดลองผิดไป ซึ่งอาจมีผลให้การก่อโรคเปลี่ยนไปเช่นกัน เช่น อาจจะไม่ก่อโรคเลยก็ได้ (Lee et al., 1989)

2.4.1.2 Sucrose-dependent adhesion

S. mutans เป็นแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ glucosyltransferase (GTF) จากการใช้ sucrose เพื่อสังเคราะห์ glucan โดยการย่อยสลาย sucrose เป็น glucose และ fructose และ glucose จะเชื่อมต่อกันเป็น polymer ของ glucan ซึ่งใน *S. mutans* จะมียีน *gtf* 3 ชนิดที่ควบคุมการสร้าง glucan ได้แก่

1. *gtfB* โดยทั่วไปเรียกว่า *gtfI* ควบคุมการสังเคราะห์ glucan ชนิดที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble glucan) ที่มีโครงสร้างเป็นกิ่งก้านของ alpha-1,3 glycosidic
2. *gtfC* โดยทั่วไปเรียกว่า *gtfIS* ควบคุมการสังเคราะห์ glucan ทั้งชนิดที่ไม่ละลายน้ำและสามารถละลายน้ำ (soluble glucan) ได้ ส่วนมากเป็น glucan ที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรงของ alpha-1,6 glycosidic

3. *gtfD* โดยทั่วไปเรียกว่า *gtfS* ควบคุมการสังเคราะห์ glucan ชนิดที่สามารถละลายน้ำได้ มีโครงสร้างเป็นเส้นตรงของ alpha-1,6 glycosidic

glucan มีความสำคัญในการทำให้เชื้อ *S. mutans* ยึดเกาะและตั้งถิ่นฐาน (colonization) บนผิวฟันได้ รวมทั้งเป็นตัวกลางให้แบคทีเรียชนิดอื่นมาเกาะติดและรวมตัวกันที่ผิวฟันด้วย จึงก่อให้เกิดเป็นคราบจุลินทรีย์หรือ biofilm ที่ยากต่อการกำจัดออก (Bowen & Koo, 2011)

2.4.1.3 Glucan binding protein (GBP)

เป็นโปรตีนที่ยึดเกาะอยู่กับ glucan ซึ่ง *S. mutans* มีโปรตีนนี้ 3 ชนิด คือ GBP A, GBP B และ GBP D ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีความสำคัญในการสร้าง biofilm ของเชื้อและมีส่วนในการก่อโรคฟันผุ (Banas & Vickerman, 2003; Matsumura et al., 2003)

2.4.2 Acidogenicity

S. mutans มีความสามารถในการสร้างกรดจากการใช้น้ำตาลโดยผ่านกระบวนการ glycolytic และการหมัก ทำให้เกิดกรดต่าง ๆ ได้แก่ lactic, formic, propionic, butyric และ acetic acid นอกจากนี้ยังทำให้เกิดเอทานอลอีกด้วย ปริมาณกรดที่สร้างได้จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะการเจริญเติบโต ในสภาวะที่มี glucose จำนวนมากจะได้กรด lactic เป็นส่วนใหญ่ (Paes et al., 2006) จากรายงานการศึกษาพบว่า *S. mutans* ที่มีเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) ลดลง ความสามารถในการก่อโรคฟันผุจะลดลง และหากขาดเอนไซม์ LDH อย่างสิ้นเชิง *S. mutans* ก็จะตายในที่สุด เนื่องจากในขั้นตอนการเปลี่ยนจาก pyruvate เป็นกรด lactic และได้พลังงานออกมา จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ LDH ดังนั้นการขาดเอนไซม์ชนิดนี้จึงมีผลต่อการสร้างกรดและการอยู่รอดของ *S. mutans* ด้วย (Hillman et al., 1996) จึงมีรายงานการนำสายพันธุ์ของเชื้อที่ถูกทำให้ขาดเอนไซม์ LDH มาใช้รักษาและป้องกันโรคฟันผุ เพราะเชื้อไม่สามารถสร้างกรดไปสลายผิวฟันได้ การมีเชื้ออยู่จึงไม่ทำให้เกิดฟันผุ (Hillman, 2002) เชื้อ *S. mutans* มีความสามารถในการสร้างกรดได้มากกว่า streptococci สายพันธุ์อื่น ๆ ภายในช่องปาก เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างกรดได้มากในสภาวะที่ pH เป็นกลาง (pH 7) และยังคงความสามารถในการสร้างกรดได้ในสภาวะที่เป็นกรด (pH 5) ในขณะที่ streptococci สายพันธุ์อื่น ๆ จะสร้างกรดได้ลดลง (de et al., 2000) ดังนั้นการสร้างกรดของเชื้อ *S. mutans* ในคราบจุลินทรีย์หรือ biofilm จะทำให้สภาวะแวดล้อมใน biofilm มีความเป็นกรดมาก จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมให้เชื้อตัวมันเองและแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่สร้างกรดและทนกรดได้เจริญเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้น และหากสภาพความเป็นกรดใน biofilm มี pH ต่ำกว่า 5.5 จะทำให้เกิดกระบวนการสูญเสียแร่ธาตุและเกิดฟันผุตามมา (Loesche, 1986)

2.4.3 Aciduricity หรือ Acid-tolerance

S. mutans มีความสามารถในการทนกรด จึงสามารถมีชีวิตรอดได้ใน biofilm แม้ว่าสภาพ pH ใน biofilm จะต่ำกว่า 4.0 และแบคทีเรียที่สร้างกรดและทนกรดสายพันธุ์อื่น ๆ ก็ยังสามารถเจริญเติบโตได้ด้วย (McNeill & Hamilton, 2003; Svensater et al., 1997) โดยความสามารถในการทนกรดขึ้นกับกลไกต่าง ๆ ดังนี้

2.4.3.1 การรักษาสภาพกรด-ด่างในเซลล์

S. mutans สามารถทนกรดได้โดยการขับกรดออกจากเซลล์ผ่านผนังเซลล์จากการใช้เอนไซม์ ATPase หรือ F-ATPase เนื่องจากกรดมีความเป็นพิษต่อการทำงานของเซลล์ ทำให้ความสามารถในการทนกรดขึ้นกับระดับเอนไซม์ F-ATPase ซึ่งมีความแตกต่างกันใน streptococci สายพันธุ์ต่าง ๆ ในช่องปาก (Bender et al., 1986) ถ้าระดับเอนไซม์ F-ATPase เพิ่มขึ้นจะทำให้สภาวะความเป็นกรดในเชื้อ *S. mutans* ลดต่ำลง pH เพิ่มขึ้น และมีการเปลี่ยนแปลงที่เยื่อหุ้มเซลล์เพื่อลดการนำเข้าของประจุบวก รวมทั้งขับสารที่เป็นกรดออกสู่ภายนอกเซลล์ เชื้อจึงรักษาสภาพความเป็นกรด-ด่างได้ (Matsui & Cvitkovitch, 2010)

2.4.3.2 การเหนี่ยวนำการทำงานของ DNA และการสร้างโปรตีน

สภาวะความเป็นกรดมีผลในการเหนี่ยวนำการทำงานของยีนบางตัวและการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ การมีผลต่อเอนไซม์ที่ใช้สร้างกรด lipoteichoic และเอนไซม์เคลื่อนย้ายโปรตีน (protein translocation) โดยเอนไซม์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ สภาวะความเป็นกรดจึงมีผลต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย เช่น ในสภาวะที่ค่า pH ต่ำกว่า 5.0 จะทำให้ลดประสิทธิภาพในการเพิ่มกลุ่ม D-alanine esters มีผลทำให้โครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป เกิดการเพิ่มการส่งออกประจุบวกมากขึ้น pH จึงลดต่ำลง (Hanna et al., 2001; Matsui & Cvitkovitch, 2010)

2.5 การป้องกันการเกิดโรคฟันผุ

การรักษาอนามัยภายในช่องปากเป็นกลไกอย่างหนึ่งในการกำจัดคราบจุลินทรีย์ การป้องกันฟันผุทำได้โดยการควบคุมการบริโภคน้ำตาล และยังมีวิธีการป้องกันฟันผุอื่น ๆ ซึ่งทำได้โดย

2.5.1 การเคลือบร่องฟัน (Fissure Sealants)

ตำแหน่งที่เกิดการผุได้ง่าย ได้แก่ บริเวณหลุมและร่องฟันบดเคี้ยวที่อยู่ด้านบน เป็นบริเวณที่ทำความสะอาดได้ยาก จึงมีการนำวัสดุที่เป็นพลาสติกมาเคลือบปิดร่องฟัน ซึ่งมีคุณสมบัติในการยึด

เกาะกับผิวฟันได้เหนียวแน่น ป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์เข้ามาอยู่อาศัยในร่องฟันได้ (จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2549)

2.5.2 ฟลูออไรด์ (Fluoride)

หากมีการใช้ฟลูออไรด์ระหว่างกระบวนการสร้างผิวเคลือบฟันของเด็ก ฟลูออไรด์จะแทนที่กลุ่มไฮดรอกซิลเกิดการสร้างฟลูออโรอะพาไทต์ ซึ่งละลายในกรดได้ยากกว่าไฮดรอกซีอะพาไทต์ นอกจากนี้ฟลูออไรด์ช่วยในกระบวนการคืนแร่ธาตุ (remineralization) ของฟันในระยะเริ่มต้น ซึ่งเกิดที่ผิวเคลือบฟันและเนื้อฟัน นอกจากนี้ฟลูออไรด์ยังขัดขวางการสร้างคราบจุลินทรีย์ โดยการขัดขวางกระบวนการต่าง ๆ ที่จุลินทรีย์ใช้ในการสร้างอาหารและคราบจุลินทรีย์ แต่ฟลูออไรด์มีข้อเสียคือ ทำให้เกิดการตกกระที่ฟัน ในกรณีที่ดื่มน้ำที่มีฟลูออไรด์ปริมาณมาก ปัจจุบันฟลูออไรด์มักจะผสมอยู่ในรูปของยาสีฟัน น้ำยาล้างปาก เพื่อป้องกันการตกกระ (Islam et al., 2007)

2.5.3 น้ำตาลเทียม (Artificial Sweetener)

สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีความหวานมากกว่าน้ำตาลซูโครส และกลุ่มที่มีความหวานน้อยกว่าน้ำตาลเทียมกลุ่มแรก ได้แก่ ไซคลาเมท (Cyclamate) ซัคคาริน (Saccharine) ปัจจุบันไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากการทดลองในสัตว์ทดลอง พบว่าปริมาณน้ำตาลที่สูงทำให้หนูเป็นมะเร็ง ส่วนน้ำตาลอีกกลุ่มหนึ่ง ได้แก่ แมนนิทอล ซอลบิทอล และไซลิทอล ซึ่งน้ำตาลกลุ่มนี้แบคทีเรียไม่สามารถดูดซึมเข้าไป เพื่อให้เกิดการเมแทบอลิซึมจนกลายเป็นกรดได้ แต่เชื้อ *S. mutans* สามารถเมแทบอลิซึมพวกโพลีออล ของน้ำตาลเทียมแมนนิทอล และซอลบิทอลได้ และผลิตกรดอินทรีย์ออกมาได้ แต่ไม่สามารถเมแทบอลิซึมไซลิทอล ได้ เนื่องจากความแตกต่างของโครงสร้างโมเลกุล (จินตกร คูวัฒนสุชาติ, 2549)

2.5.4 ยาปฏิชีวนะและสารต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antibiotic and Anti-microbial Agents)

เป็นที่ยอมรับในปัจจุบันว่า การนำยาปฏิชีวนะมาใช้ในการควบคุมคราบจุลินทรีย์ที่ก่อโรค เนื่องจาก มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้กว้าง ซึ่งจะทำให้เชื้อมีการปรับตัวและเกิดการดื้อยาขึ้น อย่างไรก็ตามยังมีการใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมคราบจุลินทรีย์เฉพาะรายเท่านั้น ซึ่งสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิดที่นำมาใช้ร่วมในการควบคุมคราบจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ คือ คลอเฮกซิดีน (Chlorhexidine) ซึ่งจัดเป็นสารต้านคราบจุลินทรีย์และต้านเหงือกอักเสบที่มีมาตรฐานสูงสุด (Matthijs & Adriaens, 2002) โดยการใช้ยาบ้วนปากคลอเฮกซิดีนเป็นประจำทุกวัน สามารถลดปริมาณคราบจุลินทรีย์และการอักเสบของเหงือก และลดการผุของฟันลงได้ การใช้ความเข้มข้นที่สูงสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ แต่มีผลข้างเคียง คือ ทำให้เกิดคราบสีน้ำตาลที่บริเวณฟันและลิ้น รอยโรคฟันผุ และวัสดุอุดฟัน จากการใช้น้ำยาบ้วนปาก การใช้คลอเฮกซิดีนจะมีผลต่อการรับรู้รส โดยทำให้การรับรู้ (perceptual intensity) รสเค็มและรสขมลดลง และอาจมีผลต่อการหลุดลอกของเซลล์บุผิวและเกิดเป็นแผลที่เยื่อเมือกช่องปาก (oral mucosa) (Ciancio, 2003)

2.5.5 วัคซีนป้องกันฟันผุ (Dental Caries Vaccine)

หน้าที่และกลไกการทำงานในการป้องกันฟันผุของวัคซีนนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด อาจกล่าวได้เพียงว่าวัคซีนจะเข้าไปขัดขวางการตั้งถิ่นฐานของเชื้อแบคทีเรีย และอาจลดการฟอर्मตัวของคราบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น สำหรับการศึกษาวัคซีนด้านประสิทธิภาพยังต้องการข้อมูลในมนุษย์ต่อไป (จินตกร คุ้มณสุชาติ, 2549)

2.5.6 การเกาะติดแน่นระหว่างเชื้อจุลินทรีย์กับพื้นผิวในปาก (Adherence between Microorganism and Oral Surface)

การเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการในการเกาะติดของเชื้อจุลินทรีย์ต่อผิวปากจะสามารถป้องกันโพลีเมอร์ที่จะมาเกาะติดบนผิวฟันได้ โดยการทำให้พื้นผิวฟันไม่เอื้อต่อการเข้ามาเกาะติดของเชื้อจุลินทรีย์ เป็นการดึงเอาความรู้ด้านจุลชีววิทยาเข้ามาใช้เป็นประโยชน์ (จินตกร คุ้มณสุชาติ, 2549)

ปัจจุบันสารจากธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ใช้กับช่องปากมากขึ้น เนื่องจากมีความปลอดภัยและมีผลข้างเคียงกับผู้ใช้ต่ำเมื่อเทียบกับสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้น มีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชในการต้านแบคทีเรียก่อโรคฟันผุ เช่น ฤทธิ์ของสารสกัดจาก *Caesalpinia ferrea* (Sampaio et al., 2009), *Allium sativum* (Bakri & Douglas, 2005) *Harungana madagascariensis* (Moulari et al., 2006) และ เมล็ดองุ่นแดง (Smullen et al., 2007) ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. mutans* ในงานวิจัยนี้จึงได้คัดเลือกสมุนไพรมาศึกษาประสิทธิภาพการต้านเชื้อ *S. mutans* ในช่องปาก เพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากที่ปราศจากแอลกอฮอล์ โดยสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ กานพลู และ มะแขว่น

2.6 กานพลู

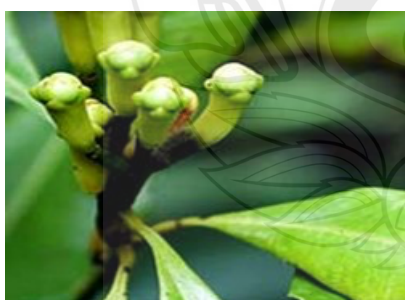
2.6.1 ข้อมูลทั่วไป

กานพลูมีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ คือ *Syzygium aromaticum* (Linn.) Merr & Perry มีชื่อพ้องคือ *Eugenia caryophyllata* Thunb, *Eugenia caryophyllus* (Spreng) Bullock & Harrison, *Eugenia aromatica* Kuntze ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Myrtaceae มีชื่อสามัญที่เรียกกันทั่วไป คือ Clove, Clove tree ประโยชน์ทางยาของกานพลู โดยใบจะมีรสร้อน แก้ปวดมวน เปลือกต้น มีรสร้อนปร่า แก้ปวดท้อง แก้ลม คุมธาตุ ดอกมีรสเผ็ดร้อนปร่า เป็นยาแก้พิษโลหิต แก้ปวดท้อง แก้ลมเป็นเหน็บชา แก้พิษน้ำเหลือง แก้อุจจาระให้เป็นปกติ แก้เลือดออกตามไรฟัน แก้ปวดฟัน แก้หืด ละลายเสมหะ

ดับกลิ่นปาก เป็นต้น ดอกเมื่อตากแห้งแล้วจะเป็นสีน้ำตาล นำมากลั่นใช้ 0.12-0.3 กรัม จะเป็นยาแก้ท้องขึ้น ธาตุพิการ ขับผายลมในลำไส้ เป็นยาบำรุง ผลมีรสร้อนปร่า เป็นตัวช่วยให้มีกลิ่นหอม นิยมใช้เป็นเครื่องเทศในการประกอบอาหาร น้ำมันกานพลู มีรสเผ็ดร้อนปร่า เป็นยาระงับการชักกระตุก แก้ปวดท้อง ขับผายลม และแก้อาการปวดฟัน ทำให้ผิวหนังชา (สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2551) ซึ่งสามารถนำไปใช้ทางด้านเภสัชกรรม เครื่องสำอาง อาหาร และเกษตรกรรม มีการศึกษาที่ฤทธิ์ทางชีวภาพของกานพลูและยูจินอล พบว่ากานพลูมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านจุลชีพสูงกว่าผลไม้ ผัก และเครื่องเทศอื่น ๆ หลายชนิด (Cortés-Rojas et al., 2014)

2.6.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กานพลูเป็นไม้ต้นขนาดเล็ก สูงประมาณ 4–12 เมตร ลำต้นมีลักษณะเป็นทรงพุ่มรูปกรวย มีกิ่งก้านเป็นจำนวนมาก มีกิ่งกระโดงหรือกิ่งใหญ่ประมาณ 3–5 กิ่ง เปลือกเรียบ ลำต้นมีสีเหลืองน้ำตาล ใบเป็นใบเดี่ยว ออกตรงข้ามกันเป็นคู่ ๆ ลักษณะใบรูปขอบขนานเป็นมัน ปลายใบเรียวแหลม โคนใบสอบเรียว ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่นเล็กน้อย ใบอ่อนมีสีชมพูหรือสีส้ม และเมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียว หนาและมัน มีกลิ่นหอม และมีจุดน้ำมันอยู่ทั่วไปบนใบ ดอกเป็นช่อกระจุก ลักษณะคล้ายดอกชมพู เกิดบริเวณปลายกิ่งหรือปลายยอดหรือซอกใบหนึ่งช่อประกอบด้วยดอกย่อยประมาณ 10–15 ดอก กลีบเลี้ยงสีเขียวอมเหลือง มีสีแดงกระจาย เชื่อมติดกันเป็นรูปท่อ ปลายแยกเป็นแฉกรูปสามเหลี่ยมแกมรูปไข่ 4 กลีบ กลีบดอกสีขาว ร่วงง่าย เกสรตัวผู้จำนวนมาก ผลสดรูปไข่กลับแกมรูปรี สีแดงเข้ม ดอกตูมอ่อนจะมีสีเขียวและก่อนที่ดอกจะบานสีของดอกจะค่อย ๆ จางลงจนเป็นสีเหลืองและสีชมพูอ่อน ดังภาพที่ 2.1 ขณะที่ดอกตูมจะมีสีชมพูอมแดง ผล เป็นผลเดี่ยวเนื้อหนา ผลที่สุกมีสีม่วงคล้ำคล้ายลูกหว้า เมล็ดจะเป็นเมล็ดเดี่ยว มีลักษณะค่อนข้างนิ่ม ด้านหนึ่งของเมล็ดเป็นร่องลึกลงไป



(ก)



(ข)

ที่มา เมดไทย (2563)

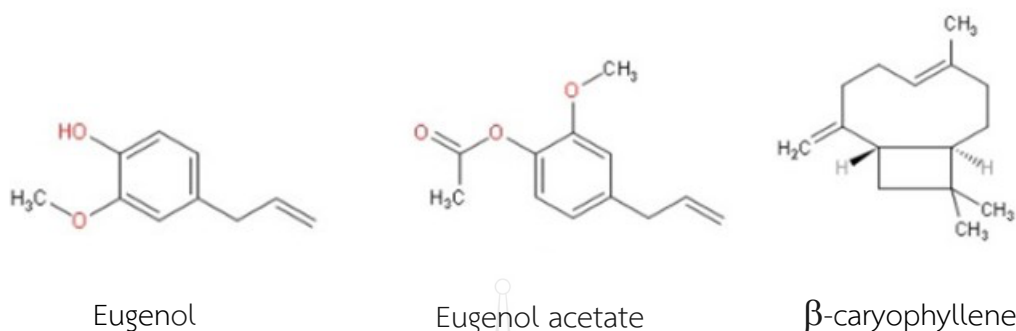
ภาพที่ 2.1 ลักษณะของดอกกานพลูสด (ก) และดอกกานพลูแห้ง (ข)

กานพลู เป็นหนึ่งในเครื่องเทศที่มีค่าที่สุด ซึ่งถูกใช้มานานหลายศตวรรษในการถนอมอาหาร และเพื่อวัตถุประสงค์ทางยามากมาย กานพลูมีถิ่นกำเนิดในอินโดนีเซีย มักปลูกในพื้นที่ชายฝั่งที่ระดับความสูงสูงสุด 200 เมตร จากระดับน้ำทะเล การเกิดดอกตูม (flower buds) ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้ทำการค้าจะเริ่มหลังจากปลูกได้ 4 ปี ดอกตูมจะถูกเก็บในระยะแก่ง่อนที่จะออกดอก ในการเก็บดอกตูมสามารถทำได้โดยรอให้ดอกแก่เองหรือการใช้สารเคมีเร่ง โดยใช้ไฟโตฮอร์โมนตามธรรมชาติซึ่งจะปล่อยเอทิลีนไปในเนื้อเยื่อของพืช ทำให้ดอกเกิดการแก่ง่อนกำหนด (Cortés-Rojas et al., 2014) ปัจจุบันประเทศที่มีการผลิตกานพลูรายใหญ่ ได้แก่ อินโดนีเซีย อินเดีย มาเลเซีย ศรีลังกา มาดากัสการ์ และแทนซาเนีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกาะแซนชิบาร์ (Kamatou et al., 2012) ในบราซิลมีการเพาะปลูกกานพลูในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในรัฐบาเอียในแคว้นวาเลนซา อิตาลี เบราตาเปโรอา กามาโม และนิโล เปชานา ซึ่งมีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 8 พันล้านเฮกตาร์ และผลิตได้เกือบ 2,500 ตันต่อปี (Oliveira et al., 2007)

2.6.3 องค์ประกอบทางเคมีของกานพลู

กานพลูเป็นหนึ่งในแหล่งพืชสำคัญที่อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอล เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดไฮดรอกซีซินามิก และไฮดรอกซีฟีนิลโพรเพน ยูจินอล (eugenol) เป็นสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักของกานพลู ซึ่งพบได้ในความเข้มข้นตั้งแต่ 9381.70 ถึง 14650.00 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักพืชสด สำหรับกรดฟีนอลิก (phenolic acids) กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารประกอบที่พบในความเข้มข้นที่สูงกว่า (783.50 มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักพืชสด) อย่างไรก็ตาม กรดแกลลิกอื่น ๆ ที่เป็นสารของกลุ่มแทนนินที่ละลายน้ำได้นั้นมีอยู่ในความเข้มข้นที่สูงกว่า (2375.8 มิลลิกรัม/100 กรัม) (Shan et al., 2005) และกรดฟีนอลิกอื่น ๆ ที่พบในกานพลู ได้แก่ กรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิก กรดอีลาจิก และกรดซาลิไซลิก และยังพบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในกานพลูอีกด้วย เช่น kaempferol, quercetin และอนุพันธ์ของมัน (glycosylated) ในความเข้มข้นที่ต่ำ

ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยในกานพลูพบสูงถึงร้อยละ 18 ในดอกตูม โดยประมาณร้อยละ 89 ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู คือ ยูจินอล (eugenol) และร้อยละ 5-15 คือ ยูจินอลอะซิเตต (eugenol acetate) และบีตา-คาริโอไฟลเลน (beta-caryophyllene) (Jirovetz et al., 2006) ดังแสดงในภาพที่ 2.2 สารประกอบสำคัญอีกชนิดหนึ่งที่พบในน้ำมันหอมระเหยของกานพลู คือ α -humulen ซึ่งมีความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 2.1 และสารประกอบอื่น ๆ ที่มีความเข้มข้นต่ำในน้ำมันหอมระเหยกานพลู ได้แก่ β -pinene, limonene, farnesol, benzaldehyde, 2-heptanone และ ethyl hexanoate



ที่มา PubMed Central (2021)

ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบสำคัญที่พบในกานพลู

2.6.4ฤทธิ์ของน้ำมันกานพลูต่อแบคทีเรีย

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของดอกกานพลู พบว่าองค์ประกอบที่สำคัญส่วนใหญ่ คือ eugenol โดยพบประมาณร้อยละ 82.3-91.4 รองลงมา คือ trans- β -caryophyllene มีประมาณร้อยละ 6.3-12.7 และยังพบองค์ประกอบอื่น ๆ อีกหลายชนิด อาทิเช่น α -humulene, eugenyl acetate และ chavicol เป็นต้น (Bankar et al., 2011)

การศึกษาในห้องปฏิบัติการของสารสกัดกานพลู จากการสกัด 3 วิธี คือ การแช่ (infusion) การต้ม (decoction) และการใช้น้ำมันหอมระเหย (essential oil) โดยทำการเปรียบเทียบผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 10 สปีชีส์ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudo-monas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella pneumo-niae*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysentriae* และ *Vibrio cholerae* ด้วยวิธี disc diffusion ผลการทดลอง พบว่าสารสกัดที่ได้จากการแช่และต้มสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้มากที่สุด วัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเท่ากับ 10.43 มิลลิเมตร และ 10.86 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อ *V. cholerae* ได้ดีที่สุด วัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเท่ากับ 23.75 มิลลิเมตร และยังเห็นผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *K. Ozaenae*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *S. typhi* และ *S. dysentriae* อีกด้วย (Saeed & Tariq, 2008)

การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียในช่องปาก พบว่าสารสกัดเมทานอลจากกานพลู ใช้ 96-well microtiter plates พบว่าสาร kaempferol ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปาก ได้แก่ *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* และ *Actinomyces viscosus* โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) มีค่าเท่ากับ 20-2,500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Cai & Wu, 1996)

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างสารสกัดจากกานพลูโดยใช้น้ำและเมทานอลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ผลการศึกษา พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด มีผลต่อการยึดเกาะของ *S. mutans* ที่ความเข้มข้น 5-15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และนอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากกานพลูมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์กลูแคนของ *S. mutans* ด้วย (Rahim & Khan, 2006)

2.7 มะแขว่น

2.7.1 ข้อมูลทั่วไป

มะแขว่นมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Zanthoxylum limonella* Alston จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae เป็นพืชท้องถิ่นที่พบมากทางภาคเหนือของไทย เป็นไม้ยืนต้นที่ชาวเหนือนิยมนำผลและเมล็ดแห้งมาประกอบอาหาร รวมทั้งใช้ทำยาสมุนไพร เนื่องจากผลแห้งมีกลิ่นแรงและมีรสเผ็ดร้อนช่วยดับกลิ่นคาวและเพิ่มรสชาติของอาหารได้ นอกจากนี้ยังนิยมนำผลแห้งมาสกัดน้ำมันหอมระเหยเพื่อใช้ขนาดตัวใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางหรือใช้สเปรย์กันยุง มีหลักฐานที่กล่าวว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากผลมะแขว่นใช้เป็นยาได้ เนื่องจากมีองค์ประกอบที่สำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ sabinene (C₁₀H₁₆) terpinen-4-ol และ limonene ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Charoenying et al., 2010)

ส่วนต่าง ๆ ของมะแขว่นสามารถใช้เป็นยาพื้นบ้านได้ โดยเปลือกประกอบด้วยสรรพคุณลดไข้ ขับเหงื่อ และขับปัสสาวะ และน้ำมันหอมระเหยจากผลใช้รักษาโรคฟันผุ ในอินเดียเปลือกของมะแขว่นใช้รักษาโรคหัวใจ โรคทางเดินหายใจ การติดเชื้อที่ฟัน การติดเชื้อในกระเพาะอาหารและโรคไขข้ออักเสบ (Moura et al., 1998) ผลใช้เป็นเครื่องเทศและน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ เรียกว่า "น้ำมัน มูลิลัม" ใช้เป็นยาต้านการอักเสบ ยาฆ่าเชื้ออหิวาตกโรค ท้องร่วง ลดคอเลสเตอรอลในเลือด สเปรย์กันยุง และสารบรรเทาสำหรับโรคฟันผุ (Nadkarni, 1982) ดังแสดงในภาพที่ 2.3



(ก)



(ข)

ที่มา มติชน (2566)

ภาพที่ 2.3 ลักษณะของผลมะแขว่นสด (ก) และผลมะแขว่นแห้ง (ข)

2.7.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มะแขว่นพบในประเทศอินเดีย ศรีลังกา ไทย พม่า คาบสมุทรมอินโดจีน มาเลเซีย ชวา เกาะซุนดาน้อย โมลุกกะ สุลาเวซี ฟิลิปปินส์ และภาคใต้ของปาปัวนิวกินี (Uji, 2001) เป็นไม้ผลัดใบขนาดกลาง สูงถึง 35 เมตร ลำต้นอ่อนมีเปลือกสีเขียวและมีหนามปกคลุม และลำต้นแก่จะมีเปลือกสีเทา มีหนามตรงยาว 2-3 เซนติเมตร ตุ่มหนามเล็กๆจะอยู่บนกิ่ง และทุกส่วนของต้นจะมีกลิ่นคล้ายมะนาว ใบเรียงสลับแบบขนนกชั้นเดียว ยาว 30-40 เซนติเมตร ใบย่อยเป็นวงรียาว 7-13 เซนติเมตร กว้าง 3-5 เซนติเมตร มีจุดสีน้ำตาลอ่อน ดอกออกเป็นช่อที่ปลายยอดหรือตามซอกใบยาวประมาณ 8-14 เซนติเมตร ดอกมีสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน ยาว 2-3 มิลลิเมตร มีกลีบเลี้ยง 4 กลีบ และกลีบดอก 4 กลีบ ตรงกลางมีเกสรตัวผู้ 4 อัน และเกสรตัวเมีย 1 อัน ผลเป็นทรงกลมยอมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6-7 มิลลิเมตร เมล็ดละ 1 เมล็ด ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีแดง เมล็ดแข็งและมีสีดำ เส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 5 มิลลิเมตร (Uji, 2001)

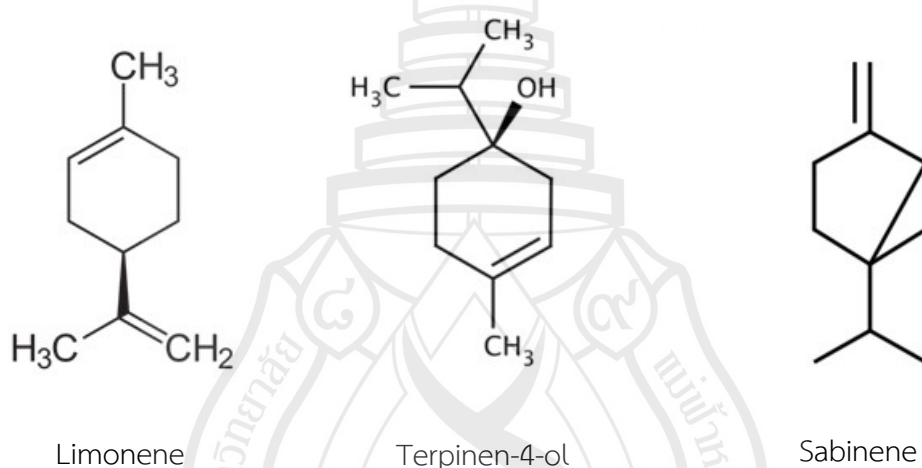
2.7.3 องค์ประกอบทางเคมีของมะแขว่น

จากการตรวจสอบทางพฤกษเคมีในส่วนต่าง ๆ ของมะแขว่น พบองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลาย โดยจำนวนของสารทุติยภูมิที่พบ คือ alkaloids aromatic และ aliphatic amides terpenes sterols phenylpropanoid-lignans และ coumarins (Mester, 1983)

การวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของสารสกัดจากลำต้นของมะแขว่นด้วยไดคลอโรมีเทนพบ quinolone alkaloid ชนิดใหม่, 4-methoxy-3-(3-methyl-2-oxobut-3-enyl) quinoline 2 (1H)-one, limonellone (Pollio et al., 2008) และยังมีสารประกอบอีก 5 ชนิด เช่น กลุ่ม lignan : (-)-asarinin, กลุ่ม aromatic amides : dihydroalataamide และ (-)-tembamide, กลุ่ม alkaloid furoquinoline: dictamine และกลุ่ม benzophenanthridine alkaloid : N-norni-tidine (Tangjitjaroenkun et al.,

2012) มะแขว่นเป็นพืชที่มีกลิ่นหอม ซึ่งสามารถพบสารประกอบ terpenic ในน้ำมันหอมระเหย ผลมะแขว่นนั้นมีลักษณะเป็นรูปทรงกลมซึ่งแต่ละผลมีเมล็ดสีดำแวววาวหนึ่งเมล็ด โดยสารประกอบอะโรมาเหล่านี้จะถูกเก็บไว้ในเปลือกของผลมะแขว่นและในเมล็ดจะประกอบไปด้วยน้ำมันและกรดไขมันไม่อิ่มตัวสะสมอยู่ (Melo & Zickel, 2004; Yamazaki et al., 2007)

การศึกษาการแยกองค์ประกอบของสารระเหยโดยใช้ Hydrodistillation แล้ววิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟีร่วมกับแมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS) พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมี 30 ชนิดในน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้จากผลมะแขว่น โดยพบองค์ประกอบหลัก คือ Limonene (31.09%), terpinen-4-ol (13.94%) และ sabinene (9.13%) (Ittipanichpong et al., 2002) ดังแสดงในภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบสำคัญที่พบในผลมะแขว่น

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่สกัดจากผลมะแขว่น โดยใช้เทคนิค GC-MS ตามการศึกษาของตั้งจิตเจริญกุล และคณะ พบว่ามีสารประกอบในน้ำมันระเหย 22 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 97.3 ขององค์ประกอบทั้งหมด โดยน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการตากแห้งมีปริมาณร้อยละ 12 ของน้ำหนักผลแห้ง ทั้งนี้ สารประกอบหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่น ได้แก่ monoterpene hydrocarbons (88.34%) และ oxygenated monoterpenoids (8.26%) และ sesquiterpenoids (1.4%) โดยองค์ประกอบที่สำคัญ คือ sabinene (42.73%), limonene (39.05%) และ terpinen-4-ol (5.40%), 3-carene (2.70%) (Tangjitjaroenkun et al., 2012)

2.7.4ฤทธิ์ของน้ำมันมะแขว่นต่อแบคทีเรีย

มะแขว่นถูกนำมาใช้เป็นยาสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อ มีการศึกษาแบบ in vitro พบว่ามะแขว่นมีสารต้านแบคทีเรียและเชื้อรา สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มจากผลมะแขว่นแสดงฤทธิ์ต้านวัณโรคต่อเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ที่ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง

(MIC) เท่ากับ 200 ไมโครกรัม/มล. (Charoenying et al., 2008) จากการศึกษาการประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากผลของมะแขว่นต่อเชื้อในระบบทางเดินอาหาร 5 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Salmonella enteritidis* DMST 17368, *Escherichia coli* TISTR 292, *Clostridium perfringens* DMST 15191 และ *Campylobacter jejuni* DMST 15190 จากการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่เข้ทดสอบ โดยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. perfringens* มากที่สุดที่ 27.0 มิลลิเมตร รองลงมา คือ *S. typhimurium* (20.5 มิลลิเมตร), *C. jejuni* (18 มิลลิเมตร), *S. enteritidis* (16.3 มิลลิเมตร) และเชื้อ *E. coli* แสดงผลการยับยั้งเชื้อได้น้อยสุด (13.5 มิลลิเมตร) (Wannissorn et al., 2005)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากลำต้นของมะแขว่น คือ dictamnine and tembamide โดยสาร dictamnine แสดงฤทธิ์ต้านวัณโรคต่อเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ด้วยค่า MIC ที่ 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Huang et al., 2008) และแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคในช่องปาก ได้แก่เชื้อ *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans* และ *Lactobacillus casei* ที่มี MIC เท่ากับ 0.4, 0.4 และ 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Severino et al., 2009) นอกจากนี้ยังแสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช เช่น *Cladosporium cucumerinum* และ *Pyricularia oryzae* ที่ค่า MIC เท่ากับ 25 และ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Zhao et al., 1998; Yang & Chen, 2008) และสาร Tembamide มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อเอชไอวีด้วยค่า EC50 < 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Chen et al., 2005)

จากการศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากที่มีน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่น ต่อ biofilm บนฟัน การอักเสบของเหงือก และการควบคุมเชื้อ *S. mutans* พบว่าน้ำยาบ้วนปากสูตรไร้อัลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่นแสดงให้เห็นถึงการลดลงของคราบจุลินทรีย์และการอักเสบของเหงือก แต่มีผลเพียงเล็กน้อยในการลดลงของจำนวนเชื้อ *S. mutans* (Vachirarojpisan et al., 2021)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	ผู้ผลิต
สารละลายมาตรฐาน McFarland No. 0.5	BioMérieux, France
น้ำยาบ้วนปาก C20 0.12% chlorhexidine (CHX)	Osoth Inter Laboratories Co.,Ltd, Thailand
เอทานอล 95%	Merck Sigma-Aldrich, Germany
Erythromycin	Oxide Ltd, UK
Erythromycin (Starthrocine 250 mg)	Seven Star Pharmaceutical Co., Ltd., Thailand
Normal saline (0.85% NaCl)	Kemaus, Australia
เลือดแกะ	โรงพยาบาลสัตว์บ้านศาลายา, ประเทศไทย

3.2 เชื้อสำหรับทดสอบในงานวิจัย

เชื้อที่ใช้ทดสอบในงานวิจัย แสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 เชื้อที่ใช้ทดสอบในงานวิจัย

เชื้อทดสอบ	แหล่งที่มา
Streptococcus mutans	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ประเทศไทย
Streptococcus mutans ATCC 25175	American Type Culture collection, USA
Streptococcus mutans DMST 18777	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, ประเทศไทย

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัยแสดงดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย

อาหารเลี้ยงเชื้อ	แหล่งที่มา
Brain Heart Infusion (BHI)	HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
Blood agar base	Merck Millipore, Germany
Brain Heart Infusion (BHI) agar and broth	Merck Millipore, Germany
Brain Heart Infusion broth (BHIYB)	Difco, USA

3.4 สมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย

สมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัยแสดงดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 สมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย

สมุนไพร	แหล่งที่มา
มะเขว่นแห้ง	โครงการพัฒนาบ้านกอกบ้านจูน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอบัว
กานพลูแห้ง	บริษัท สมุนไพรท่าพระจันทร์

3.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย แสดงดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 เครื่องมือและอุปกรณ์ใช้ในงานวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์ /รุ่น	แหล่งที่มา/ผู้ผลิต
Centrifuge/Hermle z206A	Hermle Labortechnik GmbH, Germany
Hydrodistillation apparatus	-
GC-MS/GC 7800B/MS 5977B	Agilent Technologies, Inc., USA
Filter Paper Disc	Macherey-Negel GmbH & Co.KG, Germany
Petri Dishes	Union Science Co.,Ltd., Chiang Mai, Thailand
Laminar Flow Biohazard Class II	ห้างหุ้นส่วนจำกัด รีโนเวชั่น เทคโนโลยี จ. เชียงใหม่, ประเทศไทย
Soft Incubator SLI-60OND	EYELA, Tokyo Rikakikai Co.,Ltd. Tokyo, Japan
Biohazard Laminar Air Flow	CYTAIR, FLUFRANCE, France
Soft incubator	SLI-60ND, EYELA, Japan

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

เครื่องมือและอุปกรณ์ /รุ่น	แหล่งที่มา/ผู้ผลิต
Laminar Air Flow Class II	Heraeus, Germany
Incubator	Binder, UK
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Tomy, Japan
Analytical Balance 2 ตำแหน่ง	Shimadzu, Japan
ไมโครปิเปตต์ ขนาด 20, 200 และ 1000	Socorex Acura, Switzerland
ไมโครลิตร	
ไมโครปิเปตต์ ขนาด 20, 200 และ 1000	Biohit, USA
ไมโครลิตร	
96-well microtiter plate	Corning, USA
หลอดแก้วฝาเกลียว ขนาด 16x150 มม.	Pyrex, USA
หลอดแก้วฝาเกลียว ขนาด 13x100 มม.	Pyrex, USA
จานเพาะเชื้อ ขนาด 90 x 15 มม.	Hycon, USA
AnaeroPack	MCG, Japan
Anaerobic jar	MCG, Japan
Spectrophotometer	Spectrum, China
pH meter (Five Easy F2o)	Mettler Toledo, Switzerland
Incubator (IN55)	Memmert, Germany

3.6 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.6.1 การเตรียมน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ (Hydrodistillation)

3.6.1.1 การเตรียมน้ำมันหอมระเหยมะแขว่น

ซังมะแขว่นแห้ง ที่ได้จากโครงการพัฒนาบ้านกอกบ้านจูน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอบัว 100 กรัม นำมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดย่อย จนได้เป็นผงละเอียด ทำการแยกน้ำมันหอมระเหยมะแขว่นด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ โดยใช้ผงมะแขว่นบดลงในขวดขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลาย ใส่เศษกระเบื้อง ลงไป 2-3 ชิ้น เพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรง ทำการกลั่นโดยใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จนสารละลายแยกน้ำกับน้ำมันหอม

ระเหยออกจากกัน จากนั้นดูดเอาน้ำออก จนเหลือแต่น้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้ จากนั้นนำไปชั่งหาน้ำหนักของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่นบริสุทธิ์ และคำนวณร้อยละผลผลิตของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่นที่ได้ เก็บไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขวดที่ปิดสนิทก่อนนำไปวิเคราะห์

3.6.1.2 การเตรียมน้ำมันหอมระเหยกานพลู

ชั่งกานพลูแห้ง ที่ได้จากบริษัท สมุนไพรท่าพระจันทร์ 25 กรัม นำมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดย่อย จนได้เป็นผงละเอียด ทำการแยกน้ำมันหอมระเหยกานพลู ด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ โดยใส่ผงกานพลูบดลงในขวดขวดก้นกลม ขนาด 500 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลาย ใส่เศษกระเบื้อง ลงไป 2-3 ชิ้น เพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรง ทำการกลั่นโดยใช้เวลาประมาณ 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จนสารละลายแยกน้ำกับน้ำมันหอมระเหยออกจากกัน จากนั้นดูดเอาน้ำออก จนเหลือแต่น้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้ จากนั้นนำไปชั่งหาน้ำหนักของน้ำมันหอมระเหยกานพลูบริสุทธิ์ และคำนวณร้อยละผลผลิตของน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ได้ และเก็บไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขวดที่ปิดสนิทก่อนนำไปวิเคราะห์

3.6.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี Gas Chromatography-mass Spectrometry (GC-MS)

ในการทดลองนี้จะวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยกานพลู, น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น, และน้ำมันหอมระเหยผสมจากกานพลูและมะแขว่นในอัตราส่วน 1:1 ทำการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดด้วยเครื่องมือ GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) ของ Agilent (รุ่น 7890B GC ร่วมกับ 5977B MSD) เจือจางตัวอย่างด้วยไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นฉีดตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร เข้าไปในหัวฉีดที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส โดยใช้ฮีเลียม (ความบริสุทธิ์ $\geq 99.999\%$) เป็นก๊าซพาหะ ด้วยอัตราการไหลที่คงที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที แก๊สพาหะจะพาสารผ่านคอลัมน์ (Capillary column) ของ Agilent รุ่น HP-5MS ขนาด 30 เมตร $\times$ 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร) และใช้โหมดการฉีดแบบแยกส่วน อุณหภูมิของเตาอบเริ่มต้นที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเตาอบต่อไปด้วยอัตรา 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์โครงสร้างของสาร โดยใช้ EI (Electron Ionization) 70 eV ในการวัดมวลไอออน และประมวลผลข้อมูล โดยใช้โปรแกรม Agilent MassHunter วิเคราะห์องค์ประกอบเคมีโดยเปรียบเทียบ Mass Spectra ของตัวอย่าง กับฐานข้อมูล Wiley10 และ NIST14 Libraries ซึ่งแปลผลเป็นร้อยละพื้นที่ใต้พีค (% Area) (คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของพีคทั้งหมดในโครมาโตแกรม) และค่าความเข้มข้นโดยประมาณ (Estimate concentration) ในหน่วย ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ได้จากการประมวลผลของเครื่องตามหลักการวัดสัญญาณของเครื่องตรวจจับ (detector)

3.6.3 การทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากพลูและมะแขว่น ต่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Streptococcus mutans* ด้วยวิธี Agar Disc Diffusion

ซึ่งตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยจากพลู, น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และน้ำมันหอมระเหยผสมมะแขว่นในอัตราส่วน 1:1 ละลายด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 จากนั้นนำมาทำให้ไร้เชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร แล้วเจือจางตัวอย่างด้วยเทคนิคหลอดเชื้อให้ได้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10, 100, 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ ไม่เจือจาง จากนั้นนำตัวอย่างมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ด้วยวิธี Disc Diffusion โดยใช้ตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นกระดาษกรอง (Filter Paper Disc) ขนาด 6 มิลลิเมตร เพื่อให้ได้ตัวอย่างปริมาณ 0.1, 1, 10 มิลลิกรัม และไม่เจือจางตามลำดับ แล้วทดสอบเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Erythromycin ปริมาณ 0.015 มิลลิกรัม จากนั้นนำสารแขวนตะกอนเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ที่ทำการปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 0.5 McFarland standards เรียบร้อยแล้ว มาเกลี่ยให้มีความสม่ำเสมอทั่วผิวอาหารวุ้น BHI ด้วยไม้ปั่นสำลี วางแผ่นกระดาษกรองที่ได้รับการหยดตัวอย่างไว้แล้วลงบนผิวอาหารวุ้น โดยใช้ตัวทำละลายที่ละลายตัวอย่าง เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ (Negative Control) ทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ประเมินผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของขอบเขตการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในหน่วยมิลลิเมตร (Bauer et al., 1966)

3.6.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) ด้วยวิธี Broth Dilution Test และฆ่าเชื้อ (MBC) แบคทีเรีย *Streptococcus mutans*

ซึ่งตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยจากพลู, น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และน้ำมันหอมระเหยผสมมะแขว่นในอัตราส่วน 1:1 ละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 แล้วทำให้ไร้เชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้น 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Erythromycin ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวลงใน 96 Well Microplate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปิเปตตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่หลุมที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมสารตัวอย่างให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตสารละลายในหลุมที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปใส่ในหลุมที่ 2 และทำเช่นเดียวกันจนถึงหลุมที่ 12 โดยในหลุมที่ 12 ให้ปิเปตสารผสมทั้ง 100 ไมโครลิตร (เจือจางแบบ 2 fold serial dilution) จากนั้นเติมสารแขวนตะกอนเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ซึ่งได้ทำการปรับความเข้มข้นให้ใกล้เคียงกับ 0.5 McFarland Standard ใส่ลงในทุกหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นสุทธิแสดงดังตารางที่ 3.6 บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลค่าความ

เข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งในการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) โดยสังเกตหลุมสุดท้ายที่ใสและไม่มีตะกอนของเชื้อที่ก้นหลุม (Rodríguez-Tudela et al., 2003)

หาค่า MBC (minimum bactericidal concentration) โดยดูอาหารในหลุมที่ใส ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาหยดลงบนอาหารชนิดแข็ง (agar) ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการณ์เจริญเติบโตของเชื้อบนผิวอาหาร ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้จะไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อบนผิวอาหาร คือ ค่า MBC

ตารางที่ 3.6 ความเข้มข้นสุทธิน้ำมันหอมระเหยจากานพลู, น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น, น้ำมันหอมระเหยจากานพลูผสมมะแขว่น (1:1) และยาต้านเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน Erythromycin ที่ใช้ในการทดสอบ

ตัวอย่าง (ความเข้มข้น)	ความเข้มข้นของตัวอย่างในหลุมที่ 1-12											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
น้ำมันกานพลู (มก./มล.)	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12
น้ำมันมะแขว่น (มก./มล.)	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12
น้ำมันกานพลูผสม มะแขว่น (1:1) (มก./มล.)	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.91	1.95	0.98	0.49	0.24	0.12
Erythromycin (ไมโครกรัม/มล.)	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.1	0.05

3.6.5 การเตรียมตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยผสม

เตรียมตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยจากานพลูและมะแขว่น ที่ปราศจากแอลกอฮอล์ 2 ตำรับ โดยนำน้ำมันหอมระเหยจากานพลูผสมมะแขว่นในอัตราส่วน 1:1 ที่ผ่านการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ต่อการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* มาผสมในตำรับ โดยตำรับแรก (F1) ใช้ปริมาณของน้ำมันหอมระเหยจากานพลูผสมมะแขว่นเท่ากับ 1MIC ของน้ำมันหอมระเหยผสม และตำรับที่สอง (F2) ใช้ปริมาณของน้ำมันหอมระเหยจากานพลูผสมมะแขว่นเท่ากับ 2 เท่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยผสม โดยตำรับน้ำยาบ้วนปากที่ได้ ต้องมีความใส ไม่มีการแยกชั้น และมีกลิ่นของสมุนไพรที่ทำให้รู้สึกถึงความสดชื่น ปากสะอาด และลดกลิ่นปากได้ ซึ่งกลิ่นของน้ำยาบ้วนปากที่ได้ เป็นกลิ่นผสมจากานพลูและมะแขว่น โดยกานพลูจะให้กลิ่นลึกที่แผ่ร่อน อบอวน หอมฉุน มีข้อดีคือให้ความรู้สึกสะอาด ชำเชื้อ และช่วยลดกลิ่นปากได้ดี แต่หากใช้ในปริมาณมาก จะทำให้กลิ่นฉุน ไม่สดชื่น สำหรับมะแขว่นจะให้กลิ่นฉัตรที่ สดชื่น ช่าเผ็ดเปรี้ยว มีข้อดีคือ ให้ความรู้สึกสดชื่นในช่องปาก และ

ช่วยตัดกลิ่นฉุนของกานพลู โดยรวมแล้ว กลิ่นที่ได้จะเป็นกลิ่นสมุนไพรที่ให้ความรู้สึกสดชื่น สะอาด ฆ่าเชื้อ มีความเผ็ดซ่าเล็กน้อย และอบอุ่น โดยส่วนประกอบในการพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากทั้ง 2 ตำรับ (ดัดแปลงจาก บังอร ศรีพานิชกุลชัย และคณะ, 2549) แสดงในตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 ส่วนประกอบในตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะเขว่น ตำรับที่ 1 (F1) และตำรับที่ 2 (F2)

INCI Name	F1 (1MIC)	F2 (2MIC)	Function
Aqua (Water)	55.52	26.90	Diluent
Disodium EDTA	0.20	0.20	Chelating Agent
Sorbital	5.00	7.00	Humectant
Sodium Chloride	0.80	1.05	Flavoring
Sodium Benzoate	0.50	0.50	Preservative
Sodium saccharin	0.20	0.30	Sweetener
Ammonium Glycyrrhizate	0.03	0.05	Flavoring
Propylene Glycol	10.00	15.00	Humectant
Menthol	0.50	0.50	Cooling agent
PPG-1-PEG-9 Lauryl Glycol Ether	14.00	20.00	Solubilizer
Clove oil and Makhwan oil (1:1)	6.25	12.50	Antimicrobial
PEG-40 Hydrogenated Castor Oil	6.00	15.00	Solubilizer
Spearmint Flavor	1.00	1.00	Flavoring
Total	100.00	100.00	

3.6.6 การทดสอบความคงตัวของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะเขว่น

นำตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่พัฒนาจากน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะเขว่นทั้งสองตำรับ (F1 และ F2) มาทดสอบความคงตัวโดยแบ่งน้ำยาบ้วนปากออกเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 50 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้วใส โดยปริมาตรส่วนแรก ทดสอบภายใต้สภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (Heating/cooling) เก็บที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสลับกับอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และปริมาตรส่วนที่สอง ทดสอบที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (Room Temperature) 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำซ้ำสลับกันจำนวน 7 รอบ จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่น การแยกชั้น การตกตะกอน และ pH จากนั้นนำน้ำยาบ้วนปากไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* อีกครั้ง

3.6.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชมะเขว่น

นำตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชมะเขว่นทั้ง 2 ตำรับ (F1 และ F2) มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ด้วยวิธี Broth dilution และเปรียบเทียบกับน้ำยาบ้วน C20 chlorhexidine ที่มีส่วนผสมของ chlorhexidine (CHX) 0.12%

3.6.7.1 การเตรียมหัวเชื้อทดสอบ

เตรียมเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 บนอาหาร blood agar ที่มีเลือดแกะร้อยละ 5 โดยปริมาตร บ่มในโถสุญญากาศที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมสารละลายเชื้อโดยแตะโคโลนีของ เชื้อมา 1 loopful ใส่ลงใน BHL broth เขย่าให้เชื้อกระจายตัวอย่างทั่วถึง จากนั้นเจือจางสารละลายเชื้อ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 0.5 ที่มีความเข้มข้นประมาณ 108 หน่วยก่อโคโลนีต่อมิลลิเมตร (CFU/ml) เตรียมหัวเชื้อทดสอบโดยเจือจางสารละลายเชื้อจนได้หัวเชื้อความเข้มข้นเท่ากับ 10⁶ CFU/ml

3.6.7.2 การเตรียม 96 well microplate เพื่อทดสอบ

ใส่ Double strength BHI broth ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมแรกของ column 1 แถว A-H และเติม BHI broth ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมอื่น ๆ ถัดไป เจือจางตัวอย่างลงทีละ 2 เท่าโดยการใส่สารทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมแรกและผสมกันให้ทั่วถึง จากนั้นปิเปต 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมที่ 2 ผสมให้เข้ากัน ทำซ้ำต่อในหลุมอื่น ๆ

3.6.7.3 การหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

ใส่หัวเชื้อทดสอบปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงแต่ละหลุม ปิเปตขึ้นลง 2-3 ครั้ง นำไปบ่มในโถสุญญากาศที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ตรวจสอบการเจริญของเชื้อในแต่ละหลุม โดยค่าความเข้มข้นของตัวอย่างทดสอบในหลุมสุดท้ายที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้

3.6.8 การทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชมะเขว่นต่อหน่วยเวลา (Time-kill Assay)

ดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* DMST 18777 ของตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชมะเขว่นทั้ง 2 ตำรับ (F1 และ F2) ด้วยวิธี bactericidal activity สัมผัสกับเชื้อทดสอบ จำนวน 4 ช่วงเวลา (0 (เริ่มต้น), 1, 2 และ 4 นาที) ดัดแปลงตามวิธีการของ CLSI M26-A (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 1999)

3.6.8.1 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (Inoculum) โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบในอาหาร BHIYB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเพาะเชื้อทดสอบภายใต้สภาวะแบบไม่ใช้อากาศ ใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มเพาะเชื้อ นำเชื้อมาปรับปริมาณเทียบเท่า 0.5 McFarland standard (1×10^8 CFU/ml) ด้วยอาหาร BHIYB

3.6.8.2 ทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* DMST 18777 ของตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชมะเขว่นดำรับที่ 1 และดำรับที่ 2 โดยเติมหัวเชื้อแบคทีเรียทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตร (ปริมาณเชื้อทดสอบในอาหารทดสอบเท่ากับ 1×10^5 CFU/ml) ลงในขวดทดสอบที่มีตัวอย่างทดสอบ 20 มิลลิลิตร กำหนดเวลาในการสัมผัสเชื้อของตัวอย่าง 4 ช่วงเวลา (0 (เริ่มต้น), 1, 2 และ 4 นาที) เมื่อครบระยะเวลาสัมผัสเชื้อ เจือจางตัวอย่างทดสอบที่สัมผัสเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในอาหาร BHIYB ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (ระดับความเจือจางอัตราส่วน 1:10; 10^{-1}) และเตรียมระดับความเจือจางอื่น ๆ (10^{-2} – 10^{-5}) จากนั้นตรวจนับจำนวนเชื้อรอดชีวิตด้วยวิธีการ pour plate โดยปิเปตตัวอย่างทดสอบในแต่ละระดับความเจือจาง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารทดสอบเททับด้วยอาหาร BHIYA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในแต่ละระดับความเจือจางจำนวน 2 ซ้ำ บ่มเพาะจานอาหารทดสอบภายใต้สภาวะแบบไม่ใช้อากาศ ใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะบ่มเพาะเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียในแต่ละจานอาหารทดสอบ โดยไม่ตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในจานอาหารทดสอบที่มากกว่า 250 โคโลนี สำหรับกลุ่มควบคุมใช้อาหารทดสอบ BHIYB แทนตัวอย่างทดสอบ

คำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างทดสอบ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อจานอาหารที่ระดับความเจือจางที่เลือก ในหน่วย log ปริมาณลดลงของเชื้อแบคทีเรียทดสอบจากระยะเวลาเริ่มต้นบ่มเพาะตัวอย่าง ในหน่วย log (log reduction) และเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณแบคทีเรียเมื่อสัมผัสกับผลิตภัณฑ์ทดสอบ 4 ช่วงเวลา (0 (เริ่มต้น), 1, 2 และ 4 นาที) โดยเปรียบเทียบกับระยะเวลาเริ่มต้นบ่มเพาะ ตามสูตร ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรีย} = \frac{A - B \times 100}{A}$$

A หมายถึง ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น (CFU/ml)

B หมายถึง ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่บ่ม ณ เวลาที่กำหนด (CFU/ml)

ประเมินประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียทดสอบของผลิตภัณฑ์ จากการลดลงของ ปริมาณเชื้อทดสอบมากกว่าหรือเท่ากับ 3 log CFU/ml หมายถึง ผลิตภัณฑ์ทดสอบมีประสิทธิภาพ ฆ่าเชื้อแบคทีเรียทดสอบ เท่ากับ 99.99 เปอร์เซ็นต์ ณ เวลาที่สัมผัสเชื้อทดสอบ (CLSI, 1999)



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและมะแขว่น

จากการเตรียมน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 2 ชนิด คือ มะแขว่น และ กานพลู โดยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำ กลั่นจนสารละลายที่ได้ใส ไม่ขุ่น และนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที จนน้ำกับน้ำมันหอมระเหยแยกออกจากกัน และดูดเอาน้ำออกจนเหลือแต่น้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้ โดยปริมาณของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 2 ชนิดที่สกัดได้แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยบริสุทธิ์ ที่ได้จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยมะแขว่นและกานพลู

ชนิดน้ำมันหอมระเหย	ปริมาณน้ำมันหอมระเหย ที่ได้จากการสกัด (กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก (%yield)
น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น	13.68 ± 1.61	13.68 ± 1.61
น้ำมันหอมระเหยกานพลู	4.20 ± 0.27	16.80 ± 1.09

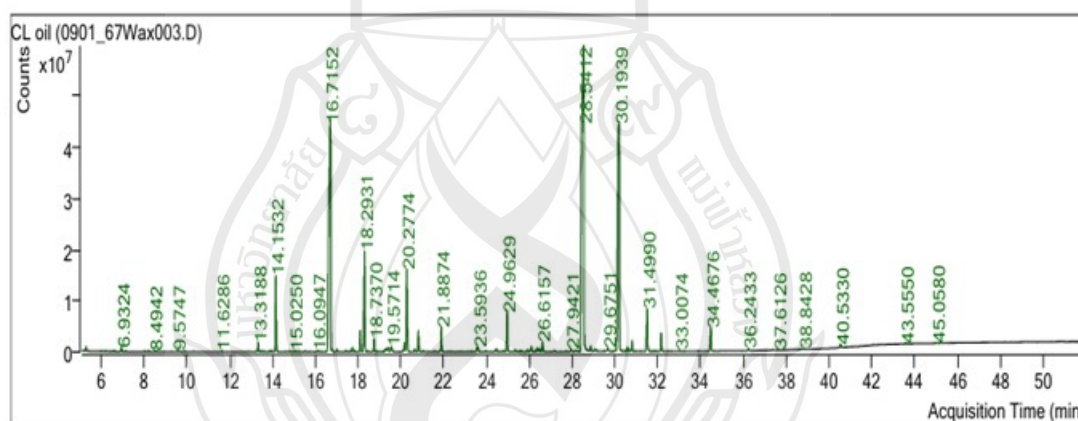
จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยพบว่า น้ำมันหอมระเหยมะแขว่นมีปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 13.68 ± 1.61 กรัม คิดเป็นผลผลิต (% yield) เฉลี่ยร้อยละ 13.68 ± 1.61 ขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูมีปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 4.20 ± 0.27 กรัม คิดเป็นผลผลิตเฉลี่ยร้อยละ 16.80 ± 1.09 เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิด พบว่ากานพลูให้ค่าร้อยละผลผลิตสูงกว่ามะแขว่น ซึ่งอาจเนื่องมาจากองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยกานพลู คือ eugenol ที่มีสัดส่วนสูง (ประมาณร้อยละ 70–90) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีความคงตัวและสามารถระเหยออกได้ง่ายในกระบวนการกลั่นด้วยไอน้ำ ในขณะที่มะแขว่นมีปริมาณน้ำมันโดยรวมในเนื้อพืชค่อนข้างต่ำ และมีองค์ประกอบที่อาจระเหยได้ยากกว่า จึงส่งผลให้ได้ผลผลิตน้ำมันหอมระเหยต่ำกว่ากานพลู

4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี Gas Chromatography-mass Spectrometry (GC-MS)

จากการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดด้วยเครื่อง GC-MS เพื่อหาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ โดยในการทดลองนี้จะวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยกานพลู น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่นโดยใช้อัตราส่วนที่เท่ากัน (1:1) ตามลำดับ

4.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของน้ำมันหอมระเหยกานพลูด้วย Gas Chromatography-mass Spectrometry (GC-MS)

ผลวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ด้วยเครื่อง GC-MS แสดงในภาพที่ 4.1 ซึ่งสามารถสรุปองค์ประกอบสำคัญจากการวิเคราะห์ ในรูปของร้อยละพื้นที่ใต้พีค (Area %) และความเข้มข้นโดยประมาณ (Estimated Concentration) ดังแสดงในตารางที่ 4.2



ภาพที่ 4.1 โครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยกานพลู

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพลู ด้วยเครื่อง GC-MS

ลำดับ พีค	เวลากัก เก็บ (นาที)	ร้อยละของ พื้นที่ใต้พีค (% Area)	ความเข้มข้น โดยประมาณ ($\mu\text{g/ml}$)	ชื่อสารประกอบ
1	6.1836	0.05	0.01569	α -Phellandrene
2	6.5045	0.03	0.008364	α -Terpinene
3	6.9324	0.38	0.1258	D-Limonene
4	14.1532	9.22	3.017	Copaene
5	15.5331	0.09	0.0279	Linalool
6	16.7152	65.90	21.57	Caryophyllene
7	16.7901	0.23	0.07583	Terpinen-4-ol
8	18.1005	2.42	0.7923	β -Cadinene
9	18.2931	13.06	4.275	β -Caryophyllene
10	18.7370	1.54	0.5029	Naphthalene, 1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 8a-octahydro-7- methyl-4-methylene-1- (1-methylethyl)-
11	19.1863	0.12	0.03903	8-Isopropyl-1-Methyl-5- Methylene-1, 6-Cyclodeca diene
12	20.2774	10.90	3.568	δ -Cadinene
13	20.8177	2.36	0.7712	Naphthalene, 1, 2, 3, 4, 4a, 7-hexahydro-1, 6-dimethyl-4- (1-methyl ethyl)-
14	21.8874	2.98	0.9765	4-Isopropyl-1, 6-Dimethyl- 1, 2, 3, 4-Tetrahydronaph thalene
15	24.9629	5.09	1.665	(-)-5-Oxatricyclo [8.2.0.0 (4,6)] dodecane, 12- trimethyl-9-methylene-, [1R- (1R*, 4R*, 6R*, 10S*)]-

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ลำดับ พีค	เวลากัก เก็บ (นาทีก)	ร้อยละของ พื้นที่ใต้พีค (% Area)	ความเข้มข้น โดยประมาณ ($\mu\text{g/ml}$)	ชื่อสารประกอบ
16	28.5412	100.00	32.74	Eugenol
17	30.1939	58.25	19.07	Eugenol acetate
18	31.4990	6.59	2.159	chavicol
19	34.4676	2.92	0.956	Trimethoxyacetophenone

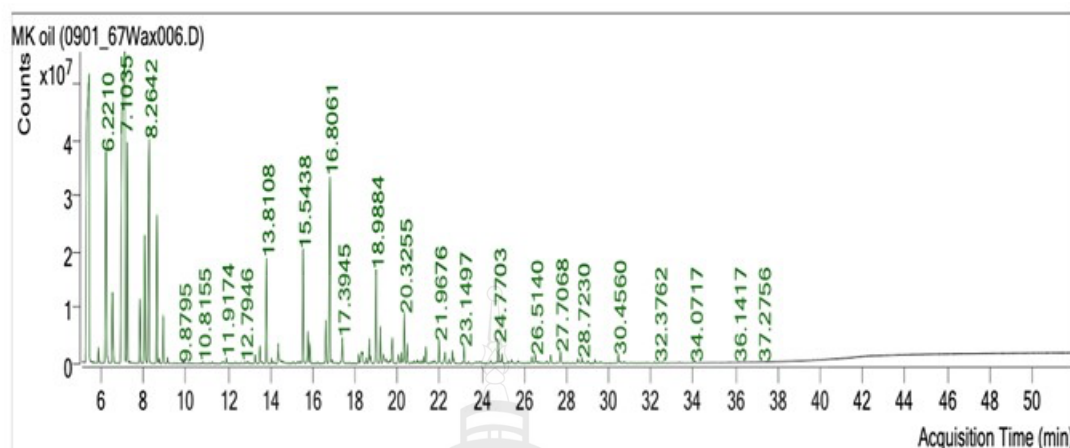
จากการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู ด้วยเครื่อง GC-MS พบว่า องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ ได้แก่ Eugenol โดยมี % Area อยู่ที่ร้อยละ 100 ซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่ให้กลิ่นเฉพาะของกานพลู มีความเข้มข้นสูงที่สุดเท่ากับ 32.74 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม โดยประมาณ มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ และระงับปวดภายในช่องปาก องค์ประกอบที่พบรองลงมาคือ Caryophyllene พบโดยรวมประมาณร้อยละ 79 ความเข้มข้นโดยรวมประมาณ 25.85 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ซึ่งให้ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และต้านเชื้อจุลินทรีย์ และยังพบ Eugenol acetate (58.25%) ความเข้มข้นโดยประมาณอยู่ที่ 19.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ Eugenol มีฤทธิ์คล้ายกับ Eugenol แต่เบากว่า จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู สามารถวิเคราะห์กลุ่มสารออกได้เป็นหลักดังนี้

สารประกอบกลุ่ม Phenolic (Flavonoids และ Phenylpropanoids) ได้แก่ Eugenol, Chavicol มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและต้านอนุมูลอิสระสูง ช่วยระงับปวด (Eugenol ใช้ในทางทันตกรรม) รวมทั้งช่วยยับยั้งเอนไซม์ และต้านการอักเสบ (Xu et al., 2013)

สารประกอบกลุ่ม Aromatic Derivatives ได้แก่ Eugenol acetate, Chavicol, Trimethoxyacetophenone มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ให้กลิ่น หอมเผ็ด หวาน ร้อน อบอวน ช่วยต้านอนุมูลอิสระ (Al-Zereini et al., 2022)

4.2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่นด้วย Gas Chromatography-mass Spectrometry (GC-MS)

ผลวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่น ด้วยเครื่อง GC-MS แสดงในภาพที่ 4.2 ซึ่งสามารถสรุปองค์ประกอบสำคัญจากการวิเคราะห์ ในรูปของร้อยละพื้นที่ใต้พีค (Area %) และความเข้มข้นโดยประมาณ (Estimated Concentration) ดังแสดงในตารางที่ 4.3



ภาพที่ 4.2 โครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยมะเขว่น

ตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของน้ำมันหอมระเหยมะเขว่น ด้วยเครื่อง GC-MS

ลำดับ พีค	เวลากักเก็บ (นาที)	ร้อยละของ พื้นที่ใต้พีค (% Area)	ความเข้มข้น โดยประมาณ ($\mu\text{g/ml}$)	ชื่อสารประกอบ
1	5.4294	81.97	19.64	Cis-sabinene
2	6.2210	25.95	6.218	Psudolimonene
3	6.5259	7.39	1.771	α -terpinene
4	7.1035	100.00	23.96	D-Limonene
5	7.2266	19.94	4.778	4(10)-Thujene
6	7.8310	5.13	1.23	1,3,7-Octatriene, 3, 7-dimethyl-, (E)-
7	8.0556	11.34	2.717	γ -Terpinene
8	8.2642	27.22	6.522	3-Carene
9	8.6333	12.87	3.083	o-Cymene
10	8.9275	3.58	0.8573	Cyclohexene, 1-methyl-4- (1-methylethylidene)-
11	13.8108	9.12	2.185	Acetic acid, octyl ester
12	14.3617	2.59	0.6212	Decanal
13	15.5438	10.50	2.515	Linalool
14	15.7738	2.75	0.6597	1-Octanol

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ลำดับ พีค	เวลากักเก็บ (นาท)	ร้อยละของ พื้นที่ใต้พีค (% Area)	ความเข้มข้น โดยประมาณ ($\mu\text{g/ml}$)	ชื่อสารประกอบ
15	16.6135	3.87	0.9261	Caryophyllene
16	16.8061	19.44	4.659	Terpinen-4-ol
17	17.3945	2.60	0.6238	2-Cyclohexen-1-ol, 1- methyl-4-(1-methyl ethyl)- , trans-
18	18.9884	8.52	2.04	3-Cyclohexene-1- methanol, $\alpha, \alpha, 4$ - trimethyl-, (S)- 8-Isopropyl-1-methyl-5-
19	19.1916	3.32	0.7963	methylene-1, 6- cyclodecadiene
20	20.3255	4.37	1.047	Geranyl acetate

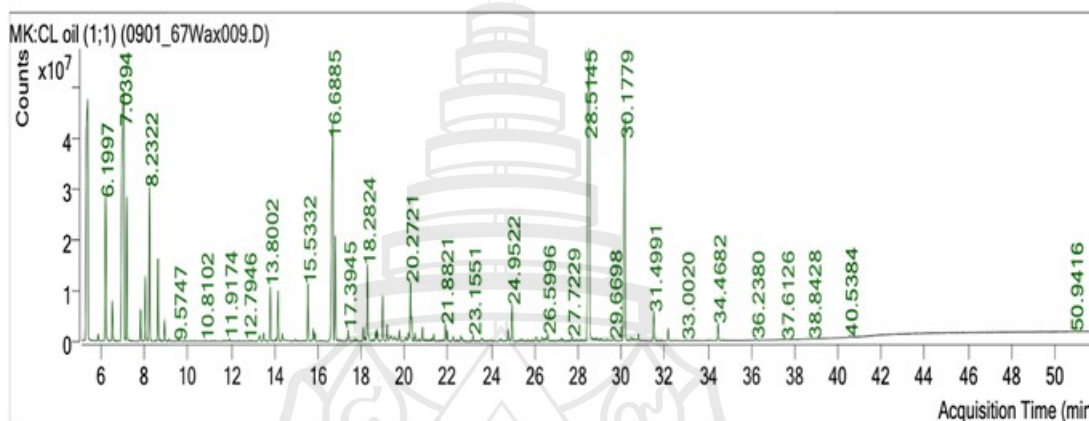
จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่น ด้วยเครื่อง GC-MS พบว่า D-Limonene เป็นองค์ประกอบหลัก คิดเป็นร้อยละ 100 ของพื้นที่ใต้พีค มีความเข้มข้นโดยประมาณเท่ากับ 23.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยให้กลิ่นสดชื่นแบบซิตรัส มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเชื้อจุลินทรีย์ รองลงมาคือ Cis-sabinene (81.97%) ความเข้มข้นโดยประมาณอยู่ที่ 19.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารให้กลิ่นและมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และต้านการอักเสบ ในส่วนของสารประกอบในกลุ่มเทอร์พีน ได้แก่ 3-Carene (27.22%), 4(10)-Thujene (19.94%) และ Terpinen-4-ol (19.44%) มีคุณสมบัติต้านกลิ่นหอม ต้านจุลินทรีย์ และต้านการอักเสบได้ ซึ่งสามารถวิเคราะห์กลุ่มสารออกได้เป็นกลุ่มหลักดังนี้

สารประกอบกลุ่ม Terpenes เป็นสารกลุ่มหลัก พบมากกว่าร้อยละ 80 ขององค์ประกอบทั้งหมด ได้แก่ D-Limonene, 3-Carene, Thujene, Terpinene ฯลฯ เป็นกลุ่มสารระเหย (Volatile compounds) ที่ได้จากพืชสมุนไพรหรือน้ำมันหอมระเหย ให้กลิ่นซิตรัสแบบสดชื่น การพบ D-Limonene ในปริมาณมากที่สุด แสดงว่าน้ำมันจากมะแขว่น มีลักษณะใกล้เคียงกับน้ำมันจากผลส้ม, น้ำมันเปลือกผลไม้, ซึ่งมีแนวโน้มใช้ในการผลิตน้ำหอม สารแต่งกลิ่น หรือยาแผนโบราณ

สารประกอบกลุ่ม Terpenoids ได้แก่ Terpinen-4-ol, Linalool เป็นสารให้กลิ่นหอมสดชื่น ต้านจุลชีพดีมาก ต้านการอักเสบ และลดปวด

4.2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชมะเขว่นด้วย Gas Chromatography-mass Spectrometry (GC-MS)

ผลวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชมะเขว่น ด้วยเครื่อง GC-MS แสดงในภาพที่ 4.3 ซึ่งสามารถสรุปองค์ประกอบสำคัญจากการวิเคราะห์ ในรูปของร้อยละพื้นที่ใต้พีค (Area %) และความเข้มข้นโดยประมาณ (Estimated Concentration) ดังแสดงในตารางที่ 4.4



ภาพที่ 4.3 โครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยจากพืชมะเขว่น

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชมะเขว่นด้วยเครื่อง GC-MS

ลำดับ พีค	เวลากักเก็บ (นาท)	ร้อยละของ พื้นที่ใต้พีค (% Area)	ความเข้มข้น โดยประมาณ ($\mu\text{g/ml}$)	ชื่อสารประกอบ
1	5.3706	77.79	12.28	sabinene
2	5.8573	0.77	0.1219	3-Carene
3	6.1997	22.34	3.527	α -Phellandrene
4	6.5152	5.41	0.8536	α -Terpinene
5	7.0394	90.88	14.35	D-Limonene
6	7.1785	17.91	2.828	3-methylene-6-(1-methylethyl)-cyclohexene
7	7.8150	3.72	0.5871	1,3,7-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)-

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

ลำดับ พีค	เวลากักเก็บ (นาที)	ร้อยละของ พื้นที่ใต้พีค (% Area)	ความเข้มข้น โดยประมาณ ($\mu\text{g/ml}$)	ชื่อสารประกอบ
8	8.0343	8.61	1.359	γ -Terpinene
9	8.2322	23.26	3.672	3-Carene
10	8.6173	10.90	1.721	o-Cymene
11	8.9168	2.55	0.4026	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
12	13.8002	7.18	1.134	Acetic acid, octyl ester
13	14.1532	7.40	1.168	Copaene
14	14.3564	1.47	0.2324	Decanal
15	15.5332	8.22	1.298	Linalool
16	15.7738	1.98	0.3133	1-Octanol
17	16.6885	60.99	9.63	Caryophyllene
18	16.7955	15.55	2.455	Terpinen-4-ol
19	17.3945	1.85	0.2917	2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, trans-
20	18.0952	1.95	0.3075	δ -Cadinene
21	18.2824	12.12	1.914	1,4,7, -Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-, Z,Z,Z-
22	18.6675	1.31	0.2065	Acetic acid, decyl ester
23	18.7370	1.70	0.2692	γ -Muurolene
24	18.9831	6.39	1.009	α -Terpineol
25	19.1863	2.44	0.3849	8-Isopropyl-1-methyl-5-methylene-1,6-cyclodecadiene
26	19.7533	1.83	0.2888	2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methyl-1-ethenyl)-
27	20.2721	9.58	1.513	δ -Cadinene

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

ลำดับ พีค	เวลากักเก็บ (นาท)	ร้อยละของ พื้นที่ใต้พีค (% Area)	ความเข้มข้น โดยประมาณ ($\mu\text{g/ml}$)	ชื่อสารประกอบ
28	20.3202	2.44	0.3859	Geranyl acetate
29	20.8177	2.08	0.328	Naphthalene, 1, 2, 3, 4, 4a, 7-hexahydro-1, 6-dimethyl- 4- (1-methylethyl)-
30	21.8821	2.41	0.3799	4-Isopropyl-1, 6-dimethyl-1, 2, 3, 4- tetrahydronaph thalene
31	24.9522	5.81	0.9175	(-)-5-Oxatricyclo[8.2.0.0 (4,6)] dodecane, 12-trimethyl-9- methylene-, [1R-(1R*, 4R*, 6R*, 10S*)]-
32	28.5145	100.00	15.79	Eugenol
33	30.1779	58.02	9.162	Eugenol acetate
34	31.4991	5.50	0.8685	chavicol
35	32.1623	1.80	0.2846	Isoaromadendrene epoxide
36	33.0020	0.16	0.02589	Eugenol acetate
37	34.4682	2.72	0.4289	Trimethoxyacetophenone

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ของน้ำมันหอมระเหยหอมระเหยگانพลูผสมมะแขว่น พบ Eugenol มีปริมาณสูงสุด พบที่ 100% Area peak และ Eugenol acetate พบที่ประมาณร้อยละ 58 ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันگانพลู มีปริมาณความเข้มข้นสูงถึง 15.79 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 9.16 79 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยประมาณตามลำดับ และ D-Limonene พบที่ ร้อยละ 90.88 ซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่พบในน้ำมันมะแขว่น มีปริมาณความเข้มข้นโดยประมาณที่ 14.35 79 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดย %Area ขององค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ มีปริมาณที่ลดลง คือ sabinene (77.79%), Caryophyllene (60.99%), 3-Carene (23.26%), Terpinen-4-ol (15.55%) เมื่อเทียบกับองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยเดี่ยว

4.3 การทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Streptococcus mutans* ด้วยวิธี Disc Diffusion

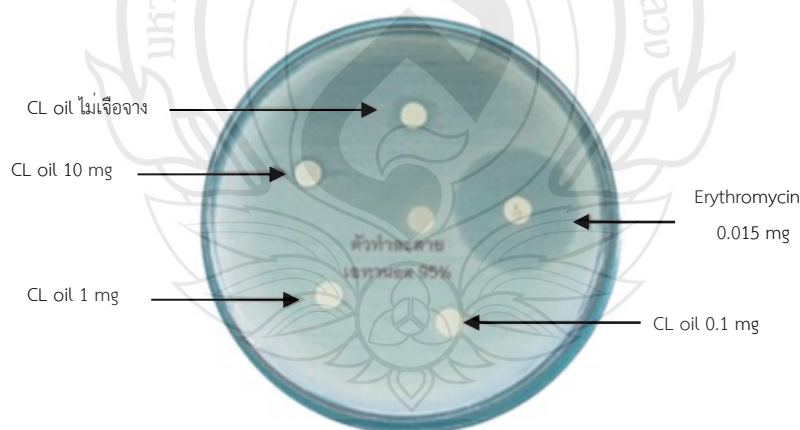
จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ของน้ำมันหอมระเหยจากานพลู, น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และน้ำมันหอมระเหยจากานพลูผสมมะแขว่น (1:1) ในปริมาณ 0.1, 1, 10 มิลลิกรัม และไม่เจือจาง เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Erythromycin ปริมาณ 0.015 มิลลิกรัม และ Ethanol ร้อยละ 95 ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ด้วยวิธี Disc Diffusion แสดงไว้ในภาพที่ 4.4-4.6 และมีขอบเขตการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ดังได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขอบเขตการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* (มม.) ของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย ที่ปริมาณต่าง ๆ และสารควบคุมด้วยวิธี Disc Diffusion

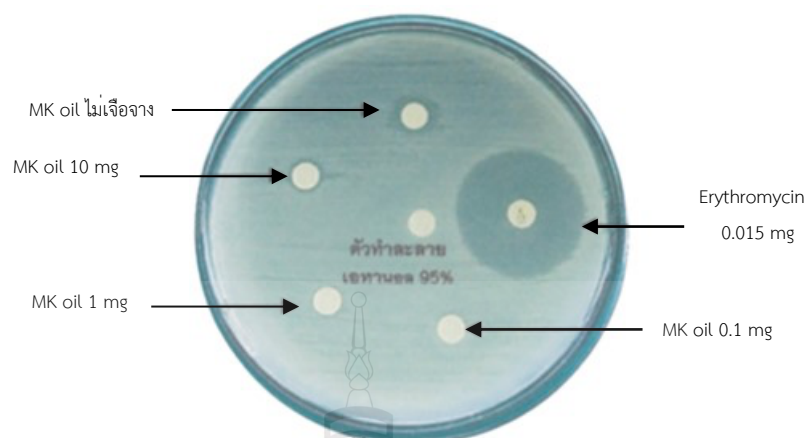
ชนิดของสาร	ปริมาณที่ทดสอบ (มก.)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขอบ เขตการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>S. mutans</i> (มม.)*
น้ำมันกานพลู	ไม่เจือจาง	13.44 ± 0.47
	10 มก.	12.46 ± 0.89
	1 มก.	7.54 ± 0.39
	0.1 มก.	ND
น้ำมันมะแขว่น	ไม่เจือจาง	9.85 ± 0.66
	10 มก.	7.85 ± 0.15
	1 มก.	ND
	0.1 มก.	ND
น้ำมันกานพลู : น้ำมันมะแขว่น อัตราส่วน 1:1	ไม่เจือจาง	12.43 ± 0.37
	10 มก.	11.22 ± 0.17
	1 มก.	ND
	0.1 มก.	ND
Ethanol 95%	10 มก.	ND
(ตัวแปรควบคุมเชิงลบ)		
Erythromycin	0.015 มก.	23.58 ± 0.29
(ตัวแปรควบคุมเชิงบวก)		

หมายเหตุ ND คือ ไม่พบผลยับยั้ง *แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากผลการทดลอง 3 ซ้ำ

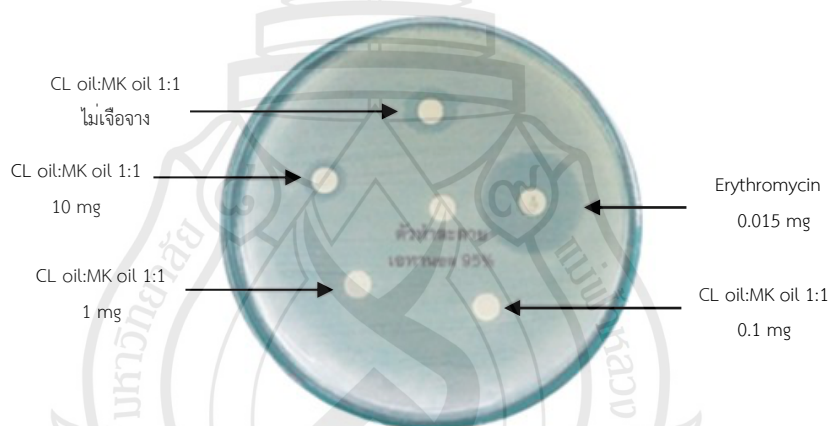
การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยกานพลู น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และ น้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่น (1:1) ในการยับยั้งการเจริญของ *S. mutans* ด้วยวิธีวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของขอบเขตการยับยั้ง พบว่าน้ำมันกานพลู ที่ปริมาณไม่เจือจางให้ผลยับยั้งสูงสุด (13.44 ± 0.47 มม.) ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีในการต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยประสิทธิภาพจะลดลงตามระดับความเข้มข้นและปริมาณที่ลดลง โดยที่ปริมาณ 10 มก. (1000 มก./มล.) และ 1 มก. (100 มก./มล.) พบขนาดขอบเขตการยับยั้งลดลงเหลือ 12.46 ± 0.89 มม. และ 7.54 ± 0.39 มม. ตามลำดับ ขณะที่ปริมาณ 0.1 มก. (10 มก./มล.) ไม่พบผลยับยั้ง (ND) ดังภาพที่ 4.4 ในทางตรงกันข้าม น้ำมันมะแขว่นแสดงประสิทธิภาพต่ำกว่าเมื่อเทียบกับน้ำมันกานพลู โดยที่ปริมาณความเข้มข้นไม่เจือจางให้ขอบเขตการยับยั้งเพียง 9.85 ± 0.66 มม. และที่ปริมาณ 10 มก. (1000 มก./มล.) พบผลยับยั้งเพียงเล็กน้อย (7.85 ± 0.15 มม.) ส่วนที่ปริมาณ 1 มก. (100 มก./มล.) และ 0.1 มก. (10 มก./มล.) ไม่พบผลยับยั้งใดๆ ดังแสดงในภาพที่ 4.5 สำหรับน้ำมันหอมระเหยผสม (1:1) พบว่าที่ปริมาณความเข้มข้นไม่เจือจางให้ผลยับยั้งใกล้เคียงกับน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว (12.43 ± 0.37 มม.) และที่ปริมาณ 10 มก. (1000 มก./มล.) ยังคงให้ผลยับยั้งที่ดี (11.22 ± 0.17 มม.) ดังภาพที่ 4.6 ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงผลการเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) ของน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่มีต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่น ในทางตรงกันข้าม เอทานอลร้อยละ 95 กลุ่มควบคุมเชิงลบ ไม่พบผลยับยั้งเชื้อ (ND) อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก Erythromycin ซึ่งให้ขอบเขตการยับยั้งสูงสุด (23.58 ± 0.29 มม.) น้ำมันทั้งสองชนิดยังมีประสิทธิภาพต่ำกว่า



ภาพที่ 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ของ น้ำมันหอมระเหยกานพลู (CL oil) เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Erythromycin ด้วยวิธี Disc Diffusion



ภาพที่ 4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่น (MK oil) เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Erythromycin ด้วยวิธี Disc Diffusion



ภาพที่ 4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ของน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่น (CL oil:MK oil; 1:1) เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Erythromycin ด้วยวิธี Disc Diffusion

จากการวิเคราะห์ขอบเขตการยับยั้งพบว่า เอทานอลร้อยละ 95 ไม่เกิดขอบเขตการยับยั้ง จึงไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* อย่างไรก็ตาม การใช้เอทานอล ช่วยเพิ่มการละลายตัวของน้ำมันหอมระเหยได้ดี ดังนั้นขอบเขตการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* จึงเกิดจากฤทธิ์ของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยเท่านั้น

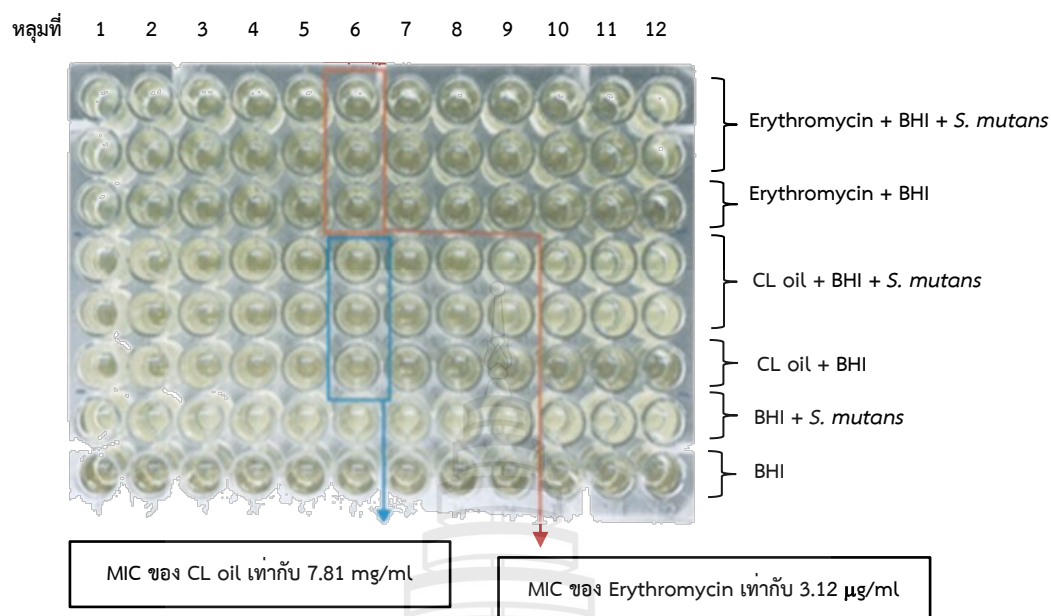
4.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) แบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ด้วยวิธี Broth Dilution Test

4.4.1 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Streptococcus mutans* (Minimum Inhibition Concentration, MIC)

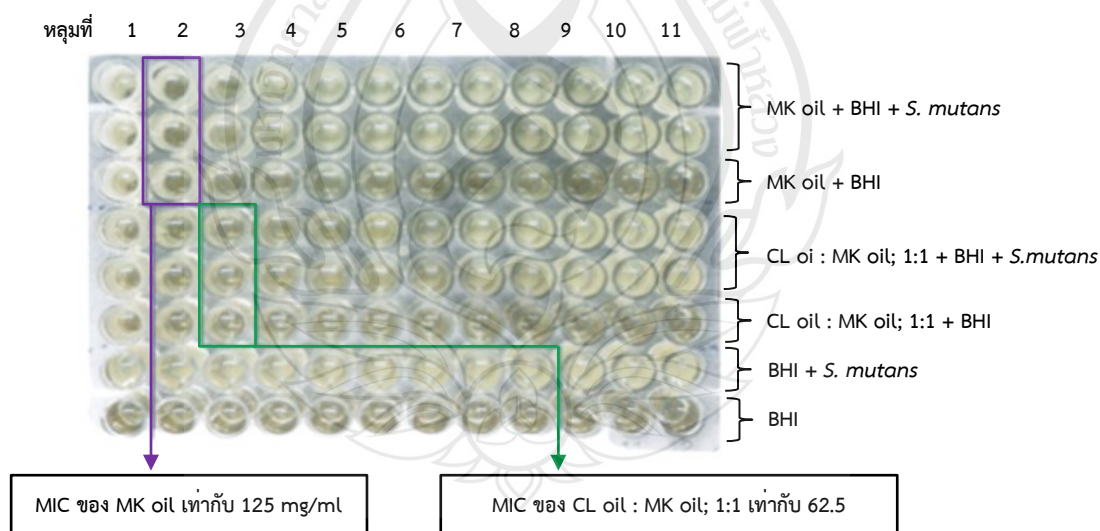
จากการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู, น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่น โดยทำการละลายตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางแบบสองเท่าต่อเนื่อง (2-fold serial dilution) ไปจนถึงหลุมที่ 12 และเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Erythromycin ดังแสดงไว้ในภาพที่ 4.7-4.8 และสรุปค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ไว้ในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ความเข้มข้นสุทธิน้ำมันหอมระเหยกานพลู, น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่น และยาต้านเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน Erythromycin ที่ใช้ในการทดสอบ

ความเข้มข้นตัวอย่าง	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของตัวอย่างที่สามารถยับยั้ง (MIC) เชื้อแบคทีเรีย <i>S. mutans</i>
น้ำมันกานพลู (มก./มล.)	7.81
น้ำมันมะแขว่น (มก./มล.)	125
น้ำมันกานพลูผสมมะแขว่น (มก./มล.)	62.5
Erythromycin (ไมโครกรัม/มล.)	3.12



ภาพที่ 4.7 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) เชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* โดยวิธี Broth microdilution ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู (CL oil) และยาต้านเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน Erythromycin



ภาพที่ 4.8 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) เชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* โดยวิธี Broth microdilution ของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่น (MK oil) และน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่น (CL oil: MK oil; 1:1)

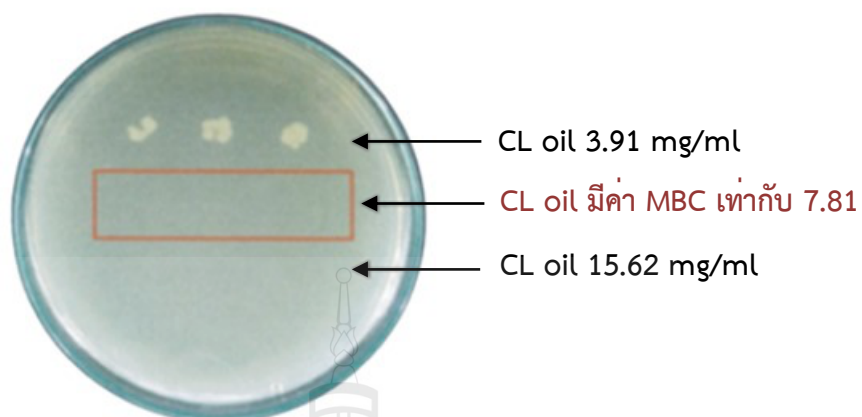
ผลการหาค่า MIC พบว่า น้ำมันหอมระเหยกานพลู, น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่น มีค่าเท่ากับ 7.81, 125 และ 62.5 มก./มล. ตามลำดับ

4.4.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยสมุนไพรที่สามารถฆ่าเชื้อ *Streptococcus mutans* ได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

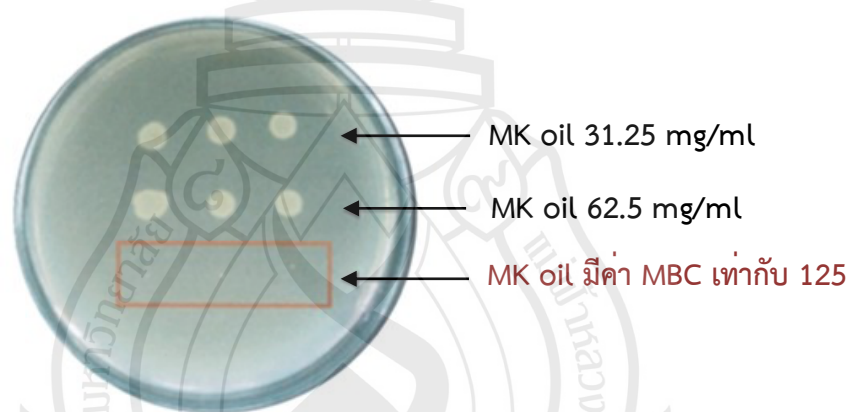
จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) แบคทีเรีย *S. mutans* โดยวิธี Drop plate พบว่า น้ำมันหอมระเหยกานพลู, น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่น มีค่า MBC เท่ากับค่า MIC ทุกกรณี คือ 7.81 มก./มล. 125 มก./มล. และ 62.5 มก./มล. ตามลำดับ ในขณะที่ยามาตรฐาน Erythromycin ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก มีค่า (MBC) เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงไว้ในภาพที่ 4.9-4.12 แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของน้ำมันหอมระเหยกานพลูในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. mutans* ได้ในความเข้มข้นต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันมะแขว่นและน้ำมันผสม



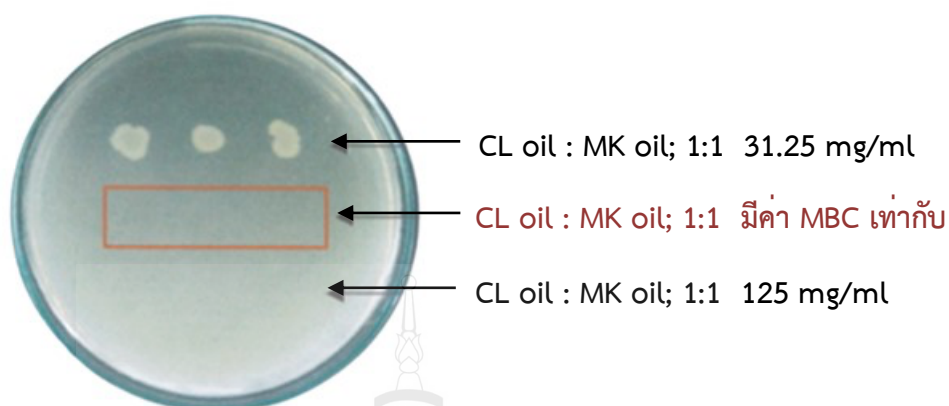
ภาพที่ 4.9 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่า (MBC) เชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* โดยวิธี Drop plate ของยามาตรฐาน Erythromycin



ภาพที่ 4.10 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่า (MBC) เชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* โดยวิธี Drop plate ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู (CL oil)



ภาพที่ 4.11 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่า (MBC) เชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* โดยวิธี Drop plate ของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่น (MK oil)



ภาพที่ 4.12 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่า (MBC) เชื้อ *S. mutans* โดยวิธี Drop plate ของน้ำมันหอมระเหยกลุ่มน้ำมันหอมระเหยผสมมะแขว่น (CL oil:MK oil; 1:1)

4.5 การเตรียมตำรับน้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันหอมระเหยผสม

จากการเตรียมตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยกลุ่มน้ำมันหอมระเหยผสมมะแขว่นทั้งหมด 2 ตำรับ (F1 และ F2) พบว่า ทั้งสองตำรับ มีลักษณะทางกายภาพที่คล้ายคลึงกัน โดยปรากฏเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน มีความหนืดเล็กน้อย ไม่มีตะกอนหรือการแยกชั้น และมีกลิ่นเฉพาะตัวของสมุนไพรทั้งสองชนิด ซึ่งให้กลิ่นที่หอมแบบเผ็ด อบอวล และออกแนวไม้ (woody-spicy) ตามลักษณะทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยในกลุ่ม terpenes และ aromatic derivatives ที่มีอยู่ในพืชทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสองตำรับ พบว่าตำรับที่ 2 มีลักษณะเป็นของเหลวใส แต่มีสีเหลืองที่เข้มกว่า ซึ่งสอดคล้องกับคุณลักษณะของน้ำมันหอมระเหยที่มีสีเฉพาะตัว และสามารถส่งผลต่อสีของผลิตภัณฑ์โดยรวม นอกจากนี้ ยังพบว่าตำรับที่ 2 มีความหนืดมากกว่าตำรับแรกเล็กน้อย ดังแสดงในภาพที่ 4.13



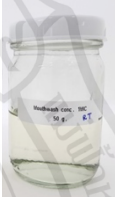
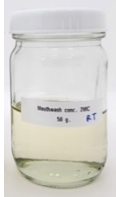
ภาพที่ 4.13 ลักษณะทางกายภาพของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแว่นตำรับที่ 1 (F1) (1MIC) (ก) และตำรับที่ตำรับที่ 2 (F2) (2MIC) (ข)

การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยผสมในตำรับที่สอง (F2) เป็นร้อยละ 12.5 โดยน้ำหนัก ซึ่งมากกว่าตำรับแรก (F1) สองเท่า ส่งผลให้มีการปรับปริมาณของสารช่วยละลาย (solubilizing agents) ให้เหมาะสมเพื่อรักษาความคงตัวของระบบ คือ PPG-1-PEG-9 Lauryl Glycol Ether และ PEG-40 Hydrogenated Castor Oil ซึ่งเป็นสารช่วยละลายแบบไม่ไฮโดรฟิลิก ที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปาก เนื่องจากมีความสามารถในการกระจายตัวของน้ำมันหอมระเหยในระบบน้ำได้ดี ซึ่งมีปริมาณรวมเพิ่มขึ้นร้อยละ 15 เมื่อเทียบกับตำรับแรก (F1) ซึ่งส่งผลให้น้ำยาบ้วนปาก มีลักษณะใสขึ้น และลดการแยกชั้น นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการปรับเพิ่มปริมาณรวมของสารให้ความชุ่มชื้น (Humectants) เป็นร้อยละ 22 เพื่อช่วยปรับเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ให้เหมาะสม และช่วยลดการระคายเคืองที่อาจเกิดจากน้ำมันหอมระเหยในปริมาณสูง ผลจากการปรับปริมาณสารช่วยละลายและสารให้ความชุ่มชื้นดังกล่าว ส่งผลให้ตำรับที่สอง (F2) มีความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับแรก (F1) ซึ่งอาจมีผลต่อเนื้อสัมผัส ความรู้สึกในการใช้งาน และความพึงพอใจของผู้บริโภคในการใช้ผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากดังกล่าว

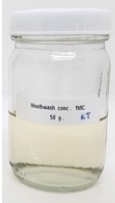
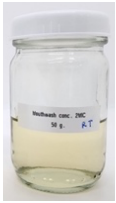
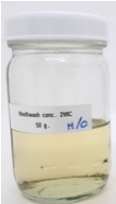
4.6 การวิเคราะห์ความคงตัวของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร

จากการเตรียมตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่พัฒนาจากจากน้ำมันหอมระเหยจากพลูสมมะแขว่นทั้งสองตำรับ และนำมาทดสอบความคงตัวภายใต้ 2 สภาวะ ได้แก่ สภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (Heating/cooling) โดยเก็บที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสลับกับอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสภาวะอุณหภูมิห้อง (Room Temperature) ประมาณ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สลับกันจำนวน 7 รอบ จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่น การแยกชั้น การตกตะกอน และ pH แสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ลักษณะทางกายภาพและค่า pH ของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรทั้ง 2 ตำรับก่อนและหลังการทดสอบความคงตัว จำนวน 7 รอบ ที่สภาวะอุณหภูมิห้องและสภาวะเร่งความร้อนสลับเย็น

สภาวะ	ตัวแปรที่ใช้วัด	ตำรับน้ำยาบ้วนปาก	
		ตำรับที่ 1 (F1)	ตำรับที่ 2 (F2)
ก่อนทดสอบ ความคงตัว (Initial)	สี	 เหลืองอ่อน	 เหลืองอ่อน
	กลิ่น	ซีตรัสเผ็ดซ่า +2 หวานฉุนอบอุ่น +2	ซีตรัสเผ็ดซ่า +3 หวานฉุนอบอุ่น +4
	การแยกชั้น/ ตกตะกอน	ไม่เกิดการแยกชั้น และตกตะกอน	ไม่เกิดการแยกชั้น และตกตะกอน
	pH	6.31	6.31

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

สภาวะ	ตัวแปรที่ใช้วัด	ตำรับน้ำยาบ้วนปาก	
		ตำรับที่ 1 (F1)	ตำรับที่ 2 (F2)
อุณหภูมิห้อง (25 ± 2°C)			
	สี	เหลืองอ่อน +2	เหลืองอ่อน +2
	กลิ่น	ซิตรัสเผ็ดซ่า +2	ซิตรัสเผ็ดซ่า +4
	การแยกชั้น/ ตกตะกอน	หวานฉุนอบอ่อน +2 ไม่เกิดการแยกชั้น และตกตะกอน	หวานฉุนอบอ่อน +4 ไม่เกิดการแยกชั้น และตกตะกอน
	pH	6.09	6.17
ความร้อน/ความเย็น (50/ 4°C)			
	สี	เหลืองอ่อน +3	เหลืองอ่อน +3
	กลิ่น	ซิตรัสเผ็ดซ่า +2	ซิตรัสเผ็ดซ่า +4
	การแยกชั้น/ ตกตะกอน	หวานฉุนอบอ่อน +2 ไม่เกิดการแยกชั้น และตกตะกอน	หวานฉุนอบอ่อน +4 ไม่เกิดการแยกชั้น และตกตะกอน
	pH	5.98	6.12

ผลการทดสอบความคงตัว พบว่าน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยจากพลูสมมะแขว่นตำรับแรก (F1) มีลักษณะทางกายภาพ เป็นของเหลวใสสีเหลืองอ่อน และมีสีเข้มขึ้น เมื่อเทียบกับเริ่มต้น และมีความหนืดเล็กน้อย มีกลิ่นที่โดดเด่นเฉพาะตัวของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ให้ความรู้สึกสดชื่น สะอาด ชื่นชอบ มีกลิ่นซิตรัสเผ็ดซ่าจากมะแขว่น และหวานหอมฉุนอบอ่อนจากพลู และค่า pH เฉลี่ยของทั้ง 2 สภาวะ เท่ากับ 6.04 ส่วนน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับที่สอง (F2) มีลักษณะทางกายภาพ เป็นของเหลวใสสีเหลืองอ่อน แต่มีสีที่เข้มกว่าตำรับแรก และมีความหนืด

มากกว่าตำรับแรกเล็กน้อย นอกจากนี้ยังให้กลิ่นซิตรัสเผ็ดซ่าและหวานหอมฉุนอบอุ่นจากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด มากกว่าตำรับแรก แต่ยังให้ความสดชื่น และมีค่า pH เฉลี่ยเท่ากับ 6.15

จากการศึกษาความคงตัวของน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรผสมทั้งสองตำรับ (F1 และ F2) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง (25 ± 2 องศาเซลเซียส) และสภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็น (50 องศาเซลเซียส/ 4 องศาเซลเซียส) ดังแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ค่า pH ของตำรับแรก (F1) ลดลงเล็กน้อย (0.11 หน่วย) และเมื่อสิ้นสุดรอบการทดสอบ ค่า pH เฉลี่ยลดลงจากค่าเริ่มต้นไม่มาก (0.27 หน่วย) ในขณะที่ตำรับที่สอง (F2) แสดงความเสถียรของค่า pH ได้ดีกว่า โดยมีค่า pH ลดลงเพียง 0.05 หน่วย และค่า pH เฉลี่ยลดลงเพียง 0.16 หน่วย เมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยในตำรับ F2 อาจช่วยรักษาเสถียรภาพของค่า pH และลดผลกระทบจากความร้อน นอกจากนี้ พบว่าสีของสารละลายทั้งสองตำรับมีความเข้มข้นจากเดิมเล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการออกซิเดชันของของสารออกฤทธิ์บางชนิดในน้ำมันหอมระเหย เช่น Eugenol ในน้ำมันกานพลู และ Limonene หรือ Sabinene ในน้ำมันมะแขว่น ซึ่งเป็นสารที่ไวต่อออกซิเจน แสง และความร้อน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Prakash et al. (2019) ทั้งนี้อาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นในระดับเล็กน้อยเช่นกัน

สำหรับค่า pH ของทั้งสองสูตร พบว่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์ในช่องปาก โดยรายงานจาก Andonovska et al. (2025) ระบุว่าน้ำยาบ้วนปากในท้องตลาดมีค่า pH อยู่ในช่วง 3.24-7.74 ซึ่งหาก pH มีค่าต่ำกว่า 5.5 อาจเสี่ยงต่อการกัดกร่อนเคลือบฟัน (Cretescu et al., 2017) ขณะที่ค่า pH สูงเกิน 8 อาจก่อให้เกิดการระคายเคืองในช่องปาก ดังนั้นช่วง pH ที่เหมาะสมควรใกล้เคียงกับ pH ของน้ำลาย (6.7-7.4) และอยู่ในช่วงที่ปลอดภัยสำหรับผลิตภัณฑ์ช่องปาก (5.5-7.0) ซึ่งไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง (Soukoulis et al., 2018) สำหรับความหนืดในตำรับแรก (F1) มีความหนืดเล็กน้อย ขณะที่ตำรับ F2 มีความหนืดเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มปริมาณของน้ำมันหอมระเหยเป็น 2 เท่า ส่งผลให้เกิดการเพิ่มสารช่วยละลาย (Solubilizer) เพื่อให้เกิดการกระจายตัวของน้ำมันได้อย่างเหมาะสม โดยน้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติเป็น non-polar solvent อาจเกิดปฏิกิริยากับสารบางชนิดที่เพิ่มความหนืดในสูตร (เช่น Propylene Glycol หรือ PPG-1-PEG-9 Lauryl Glycol Ether) (Bilia et al., 2014) ดังนั้นความหนืดที่เพิ่มขึ้นอาจส่งผลต่อความรู้สึกในการใช้งาน แต่ยังช่วยเสริมความคงตัวของระบบโดยรวม ดังนั้นทั้งสองสูตรยังคงมีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีการแยกชั้นหรือตกตะกอนตลอดระยะเวลาทดสอบ ซึ่งแสดงว่าสารช่วยละลายในสูตรมีประสิทธิภาพในการกระจายตัวน้ำมันหอมระเหยได้ดี (Bakkali et al., 2008) ดังนั้นตำรับที่ 2 (F2) จึงมีความเสถียรของค่า pH ความหนืด และลักษณะทางกายภาพที่ดีกว่าตำรับแรก (F1) ภายใต้สภาวะเร่ง โดยทั้งสองตำรับผ่านเกณฑ์การทดสอบความคงตัวทางกายภาพตามที่กำหนด

4.7 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่น ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 25175

จากการทดสอบน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่นตำรับที่ 1 (F1) และตำรับที่ 2 (F2) ดังแสดงในภาพที่ 4.14 ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ด้วยวิธี Broth dilution และเปรียบเทียบกับน้ำยาบ้วนปาก C20 chlorhexidine antiseptic mouthwash (0.12% chlorhexidine gluconate) ดังแสดงในภาพที่ 4.15 โดยการเตรียมหัวเชื้อทดสอบ เจือจางสารละลายเชื้อจนได้ หัวเชื้อความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 CFU/ml ใส่ BHI broth ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 well microplate และเจือจางตัวอย่างทดสอบลงทีละ 2 เท่า ในหลุมอื่น ๆ ถัดไป และใส่หัวเชื้อทดสอบปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงแต่ละหลุม ปิดฝาด้านบน 2-3 ครั้ง จากนั้นนำไปบ่มในโอสถุญญากาศที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ตรวจสอบการเจริญของเชื้อในแต่ละหลุม โดยค่าความเข้มข้นของตัวอย่างทดสอบในหลุมสุดท้ายที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้



ภาพที่ 4.14 น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่นตำรับที่ 1 (F1) (ก) และตำรับที่ตำรับที่ 2 (F2) (ข)



ภาพที่ 4.15 C20 chlorhexidine antiseptic mouthwash (0.12% chlorhexidine gluconate)

ตารางที่ 4.8 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของตัวอย่างน้ำยาบ้วนปาก ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175

ตัวอย่างทดสอบ	ค่า MIC (มก./มล.)
น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยจากพลูผสม มะแขว่นตำรับที่ 1 (F1)	1.05469
น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยจากพลูผสม มะแขว่นตำรับที่ 2 (F2)	1.05547
C20 chlorhexidine antiseptic mouthwash (0.12% chlorhexidine gluconate)	0.00234

ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ของน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับที่ 1 (F1) ค่า MIC เท่ากับ 1.055 มก./มล.เช่นเดียวกับตำรับที่ 2 (F2) ที่แม้จะเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเป็น 2 เท่าก็ตาม แต่ยังคงให้ค่า MIC ที่เท่ากัน คือ 1.055 มก./มล. เช่นกัน ในขณะที่น้ำยาบ้วนปาก C20 chlorhexidine antiseptic mouthwash ซึ่งมีสารออกฤทธิ์ chlorhexidine gluconate ความเข้มข้นร้อยละ 0.12 มีค่า MIC ที่ต่ำกว่ามาก โดยอยู่ที่ 0.002 มก./มล. ซึ่งมีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อได้สูงกว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรถึงประมาณ 4–8 เท่า อันเนื่องมาจากกลไกการออกฤทธิ์ของ chlorhexidine ที่สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย และยับยั้งการสร้างชีวภาพของ biofilm

อย่างไรก็ตาม น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรทั้งสองตำรับ ไม่ได้ออกฤทธิ์แรงเทียบเท่า chlorhexidine แต่ก็แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ได้ในระดับหนึ่ง ซึ่ง

อาจเกิดการเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) ของสารออกฤทธิ์หลัก คือ eugenol จากกานพลู ต่อ D-Limonene ในมะแขว่น จะเห็นว่าค่า MIC ของทั้ง 2 ตำรับ มีค่าเท่ากัน แม้จะมีการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยผสมเป็น 2 เท่า ซึ่งอาจสะท้อนถึงกลไกการอิมิตัวของสารออกฤทธิ์ที่จับกับเชื้อจนถึงจุดอิ่มตัวแล้ว (saturation point) ส่งผลให้การเพิ่มปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากขึ้น ไม่ก่อให้เกิดการยับยั้งที่สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ahmad et al. (2014) ที่ชี้ว่า การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเกินระดับ MIC ไม่ได้เพิ่มประสิทธิภาพในการต้านเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ

4.8 การทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* DMST 18777 ของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่นต่อหน่วยเวลา (Time-kill Assay)

จากการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* DMST 18777 ของตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่นตำรับที่ 1 (F1) และตำรับที่ 2 (F2) ด้วยวิธี bactericidal activity โดยสัมผัสกับเชื้อทดสอบ จำนวน 4 ช่วงเวลา (0 (เริ่มต้น), 1, 2 และ 4 นาที) และ คำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างทดสอบปริมาตร 1 มล. จากค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อจานอาหารที่ระดับความเจือจางที่เลือก ในหน่วย log ปริมาณลดลงของเชื้อแบคทีเรียทดสอบจากระยะเวลาเริ่มต้นบ่มเพาะตัวอย่าง ในหน่วย log (log reduction) และ เปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณแบคทีเรียเมื่อสัมผัสกับผลิตภัณฑ์ทดสอบ 4 ช่วงเวลา (0 (เริ่มต้น), 1, 2 และ 4 นาที) โดยเปรียบเทียบกับระยะเวลาเริ่มต้นบ่ม

ประเมินประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียทดสอบของผลิตภัณฑ์ จากการลดลงของปริมาณเชื้อทดสอบมากกว่าหรือเท่ากับ 3 log CFU/ml หมายถึง ผลิตภัณฑ์ทดสอบมีประสิทธิภาพฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ เท่ากับ 99.99 เปอร์เซ็นต์ ณ เวลาที่สัมผัสกับเชื้อทดสอบ (CLSI, 1999) ดังตารางที่ 4.9-4.10

ตารางที่ 4.9 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *S. mutans* DMST 18777 และเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อทดสอบในตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยจากพญานาคผสมมะเขือดำรับที่ 1 (F1) เมื่อสัมผัสเชื้อที่ 0 (เริ่มต้น), 1, 2 และ 4 นาที

เวลาที่สัมผัสเชื้อ แบคทีเรียทดสอบ (นาที)	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียใน ผลิตภัณฑ์ทดสอบ		ค่า log reduction	เปอร์เซ็นต์การลดลง ของเชื้อทดสอบใน ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เมื่อสัมผัสเชื้อ
	ในหน่วย	ในหน่วย log		
	CFU/ml	CFU/ml		
0 (เริ่มต้น)	1.64×10^5	5.21	0.09	18.00
1	0.97×10^5	4.98	0.32	51.75
2	1.03×10^5	5.01	0.29	48.50
4	0.87×10^5	4.94	0.36	56.75

หมายเหตุ ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* DMST 18777 เริ่มต้นเท่ากับ 2.0×10^5 CFU/ml หรือ 5.30 log CFU/ml

ตารางที่ 4.10 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *S. mutans* DMST 18777 และเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อทดสอบในตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยจากพญานาคผสมมะเขือดำรับที่ 2 (F2) เมื่อสัมผัสเชื้อที่ 0 (เริ่มต้น), 1, 2 และ 4 นาที

เวลาที่สัมผัสเชื้อ แบคทีเรียทดสอบ (นาที)	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียใน ผลิตภัณฑ์ทดสอบ		ค่า log reduction	เปอร์เซ็นต์การลดลง ของเชื้อทดสอบใน ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เมื่อสัมผัสเชื้อ
	ในหน่วย	ในหน่วย log		
	CFU/ml	CFU/ml		
0 (เริ่มต้น)	3.5×10^4	4.54	0.76	82.50
1	3.6×10^4	4.56	0.74	82.00
2	3.7×10^4	4.57	0.73	81.50
4	3.3×10^4	4.52	0.78	83.50

หมายเหตุ ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* DMST 18777 เริ่มต้นเท่ากับ 2.0×10^5 CFU/ml หรือ 5.30 log CFU/ml

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* DMST 18777 ของตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชมะเขว่นทั้งสองตำรับ (F1 และ F2) ด้วยวิธี bactericidal activity ที่ดัดแปลงจากวิธี CLSI M26-A (CLSI, 1999) โดยทำการทดสอบใน 4 ช่วงเวลา ได้แก่ 0 (เริ่มต้น), 1, 2 และ 4 นาที่ พบว่า ในช่วงเวลา 0 นาที่ (เริ่มต้น)

จากผลการทดสอบ พบว่า จำนวนเชื้อที่ลดลงในตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับที่ 1 (F1) มีค่าเท่ากับ 1.64×10^5 CFU/ml หรือคิดเป็น 5.21 log CFU/ml เมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อทดสอบเริ่มต้นที่ 2×10^5 CFU/ml หรือ 5.30 log CFU/ml โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อทดสอบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เท่ากับร้อยละ 18 ของจำนวนเชื้อเริ่มต้น (ตารางที่ 4.9) ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนดไว้ ($\geq 99.99\%$ หรือ ≥ 3 log CFU/ml) ดังนั้นสรุปได้ว่าน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับที่ 1 (F1) ไม่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* DMST 18777 ที่เวลา 0 (เริ่มต้น) นาที่ ในขณะที่ตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากตำรับที่ 2 (F2) มีจำนวนเชื้อที่ลดลงที่เวลา 0 นาที่ (เริ่มต้น) เท่ากับ 3.5×10^4 CFU/ml หรือ 4.54 log CFU/ml จากจำนวนเชื้อทดสอบเริ่มต้นเท่ากับ 2×10^5 CFU/ml หรือ 5.30 log CFU/ml คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อทดสอบเท่ากับ ร้อยละ 82.50 ของจำนวนเชื้อเริ่มต้น (ตารางที่ 4.10) ซึ่งยังคงต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด (99.99%) จึงสรุปได้ว่าน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับที่ 2 (F2) ไม่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *S. mutans* DMST 18777 ที่เวลา 0 นาที่ เช่นเดียวกับตำรับที่ 1

ที่ระยะเวลา 1 นาที่ จำนวนเชื้อที่ลดลงในตัวอย่างตำรับที่ 1 (F1) เท่ากับ 0.97×10^5 CFU/ml หรือ 4.98 log CFU/ml จากจำนวนเชื้อทดสอบเริ่มต้น เท่ากับ 2×10^5 CFU/ml หรือ 5.30 log CFU/ml คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อทดสอบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ร้อยละ 51.75 ของจำนวนเชื้อเริ่มต้น (ตารางที่ 4.9) ซึ่งยังไม่ถึงเกณฑ์ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ ($\geq 99.99\%$ หรือ ≥ 3 log CFU/ml) จึงสรุปได้ว่าน้ำยาบ้วนปากตำรับ F1 ไม่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *S. mutans* DMST 18777 ที่เวลา 1 นาที่ ขณะที่ตำรับที่ 2 (F2) จำนวนเชื้อที่ลดลงที่เวลา 1 นาที่ เท่ากับ 3.6×10^4 CFU/ml หรือ 4.56 Log CFU/ml จากจำนวนเชื้อทดสอบเริ่มต้น เท่ากับ 2×10^5 CFU/ml หรือ 5.30 log CFU/ml คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อร้อยละ 82.00 ของจำนวนเชื้อเริ่มต้น (ตารางที่ 4.10) ซึ่งยังคงต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด เช่นกัน จึงสรุปได้ว่าน้ำยาบ้วนปากตำรับที่ 2 (F2) ยังคงไม่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* DMST 18777 ที่เวลา 1 นาที่

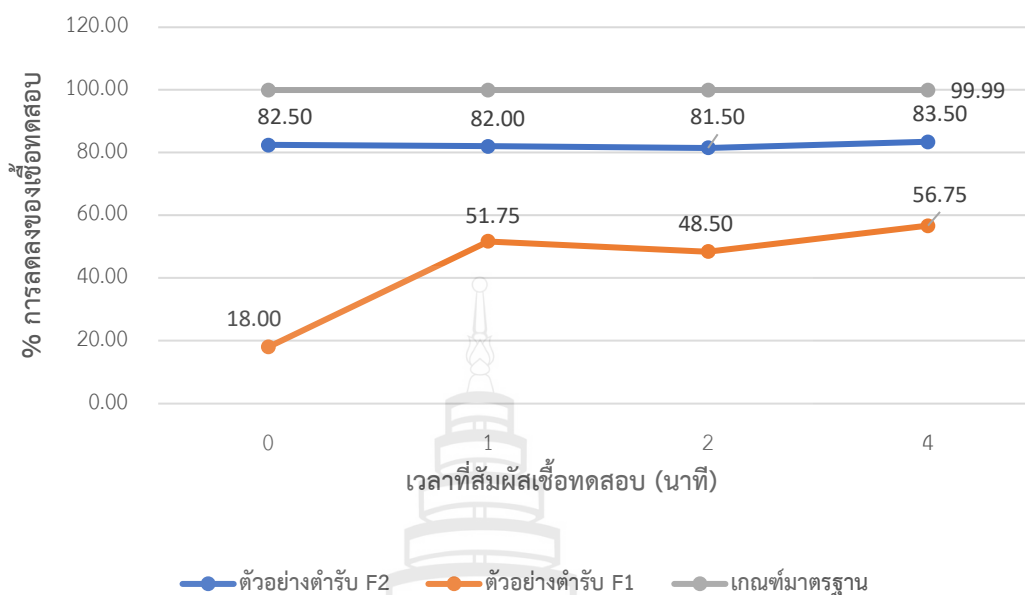
ที่ระยะเวลา 2 นาที่ พบว่าน้ำยาบ้วนปากตำรับที่ 1 (F1) มีจำนวนเชื้อที่ลดลงเท่ากับ 1.03×10^5 CFU/ml หรือ 5.01 log CFU/ml คิดเป็นการลดลงของเชื้อทดสอบร้อยละ 48.50 ของจำนวนเชื้อเริ่มต้น (ตารางที่ 4.9) ในขณะที่ตำรับที่ 2 (F2) จำนวนเชื้อลดลงเท่ากับ 3.7×10^4 CFU/ml หรือ 4.57 log CFU/ml คิดเป็นการลดลงร้อยละ 81.50 ของจำนวนเชื้อเริ่มต้น (ตารางที่ 4.10) เมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อทดสอบเริ่มต้นที่ 2×10^5 CFU/ml หรือ 5.30 log CFU/ml ซึ่งทั้งสองตำรับยังไม่สามารถ

ลดจำนวนเชื้อได้ตามเกณฑ์มาตรฐาน ($\geq 99.99\%$ หรือ $\geq 3 \log \text{CFU/ml}$) สรุปได้ว่าน้ำยาบ้วนปากทั้งสองตำรับไม่มีประสิทธิภาพฆ่าเชื้อ *S. mutans* DMST 18777 ที่เวลาดังกล่าว

ที่ระยะเวลา 4 นาที พบว่าตำรับที่ 1 (F1) มีจำนวนเชื้อที่ลดลงเท่ากับ $0.87 \times 10^5 \text{CFU/ml}$ หรือ $4.94 \log \text{CFU/ml}$ คิดเป็นการลดลงของเชื้อร้อยละ 56.75 ของจำนวนเชื้อเริ่มต้น (ตารางที่ 4.9) ในขณะที่ตำรับที่ 2 (F2) มีจำนวนเชื้อลดลงเหลือ $3.3 \times 10^4 \text{CFU/ml}$ หรือ $4.52 \log \text{CFU/ml}$ คิดเป็นการลดลงร้อยละ 83.50 ของจำนวนเชื้อเริ่มต้น (ตารางที่ 4.10) จากเชื้อทดสอบเริ่มต้นที่ $2 \times 10^5 \text{CFU/ml}$ หรือ $5.30 \log \text{CFU/ml}$ ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 99.99 เปอร์เซ็นต์ หรือ $3 \log \text{CFU/ml}$ ดังนั้นตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรทั้งสองตำรับไม่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* DMST 18777 ที่เวลา 4 นาที

จากผลการทดสอบทั้ง 4 ช่วงเวลา พบว่าน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรตำรับแรก (F1) และตำรับที่สอง (F2) ไม่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* DMST 18777 ตามเกณฑ์ที่กำหนด โดยในช่วงเวลา 4 นาที ที่ตัวอย่างสัมผัสกับเชื้อทดสอบ พบว่าตำรับแรก (F1) มีจำนวนเชื้อทดสอบเท่ากับ $4.94 \log \text{CFU/ml}$ ซึ่งคิดเป็นร้อยละของการลดลงของเชื้อเท่ากับ 56.75% และตำรับที่สอง (F2) พบจำนวนเชื้อทดสอบเท่ากับ $4.52 \log \text{CFU/ml}$ คิดเป็นร้อยละการลดลงของเชื้อเท่ากับ 83.50% เท่านั้น ซึ่งยังไม่ถึงเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด (99.99%)

อย่างไรก็ตามพบว่า ตำรับที่ 2 (F2) มีแนวโน้มในการลดจำนวนเชื้อ *S. mutans* DMST 18777 ได้มากกว่าตำรับแรก (F1) ในทุกช่วงเวลา ซึ่งแสดงให้เห็นถึงผลของการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยในสูตรที่ช่วยเพิ่มฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ระดับหนึ่ง แม้ว่าการลดเชื้อของตำรับที่ 2 จะยังไม่ถึงเกณฑ์ที่สามารถฆ่าเชื้อตามมาตรฐาน CLSI M26-A (99.99%) แต่พบว่ามีแนวโน้มสูงกว่าตำรับแรกอย่างต่อเนื่อง



ภาพที่ 4.16 ความสัมพันธ์ของเวลา กับเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อทดสอบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เมื่อสัมผัสเชื้อ *Streptococcus mutans* DMST 18777 เปรียบเทียบกับเกณฑ์ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อตามเกณฑ์ CLSI M26-A

จากการวิเคราะห์เชิงสถิติด้วยการทดสอบ t-test for independent samples หรือ Two-Way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบค่าร้อยละการลดลงของเชื้อ *S. mutans* ระหว่างตำรับที่ 1 และตำรับที่ 2 ในแต่ละช่วงเวลา พบว่า ที่เวลาเริ่มต้น (0 นาทื), 1 นาทื และ 2 นาทื มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่เวลา 4 นาทื พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าตำรับที่ 2 ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยสูงกว่า ให้ประสิทธิภาพในการลดเชื้อได้ชัดเจนในระยะต้น แต่ไม่คงที่ในระยะยาว ขณะที่ตำรับแรก มีแนวโน้มความเสถียรของผลการฆ่าเชื้อที่ดีกว่าในระยะยาว งานวิจัยของ Khumpirapang et al. (2018) ระบุว่าความเข้มข้นที่สูงเกินไปอาจส่งผลให้สารออกฤทธิ์เสื่อมสภาพเร็วขึ้น โดยเฉพาะเมื่อมีสารระเหยที่ออกฤทธิ์แบบ time-dependent กล่าวคือ สารจะมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อระดับความเข้มข้นอยู่สูงกว่า MIC เป็นระยะเวลานานพอ แม้ว่าจะไม่ถึงระดับความเข้มข้นสูงสุดก็ตาม ซึ่งสามารถใช้อธิบายถึงประสิทธิภาพที่ลดลงของตำรับที่ 2 (F2) ที่เวลา 4 นาทื ได้

จากการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) ของทั้ง 2 ตำรับ พบว่ามีค่าเท่ากันที่ 1.055 มก./มล. แต่ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบบคทีเรีย *S. mutans* ของตำรับที่ 2 (2MIC) ให้ผลที่ดีกว่าตำรับแรก เนื่องจาก ค่า MIC ของตำรับแรก (F1) ให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ แต่ไม่สามารถ

ฆ่าเชื้อได้ทั้งหมด ขณะที่ตำรับที่ 2 (F2) ให้ผลการยับยั้งเชื้อและสามารถฆ่าเชื้อได้บางส่วน เนื่องจากสารออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย เช่น eugenol, α -pinene และ Limonene ขึ้นกับปริมาณและระยะเวลาในการออกฤทธิ์ โดยความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่สูงขึ้นสามารถเร่งการออกฤทธิ์ให้เร็วและแรงขึ้นในช่วงต้นเวลา ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ *S. mutans* ของตำรับที่ 2 ที่ช่วงเวลา 4 นาที แม้ค่า MIC ไม่ต่างกัน

ดังนั้น ในการเลือกใช้ตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร ควรพิจารณาจากวัตถุประสงค์ของการใช้งาน โดยตำรับแรก (F1) เหมาะสำหรับการใช้ในชีวิตประจำวันหรือการใช้งานต่อเนื่องระยะยาว เนื่องจากให้ผลการฆ่าเชื้อที่เสถียรในช่วงเวลาที่นานกว่า ขณะที่ตำรับที่ 2 (F2) ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยผสมมากกว่า เหมาะสำหรับการใช้งานแบบเร่งด่วนในระยะเวลาสั้น เช่น ภายหลังรับประทานอาหาร หรือในผู้ที่ต้องการลดเชื้ออย่างรวดเร็ว

4.9 อภิปรายผล

4.9.1 ผลของการสกัดและองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย

จากการศึกษาพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูให้ผลผลิตสูงกว่าน้ำมันหอมระเหยมะแขว่น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chaieb et al. (2007) ที่รายงานว่ากานพลูมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงถึงร้อยละ 15–20 เนื่องจากมีสาร eugenol เป็นองค์ประกอบหลักในปริมาณมาก ในขณะที่มะแขว่น ให้ผลผลิตน้ำมันในระดับปานกลาง ประมาณร้อยละ 10–15 ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของวัตถุดิบและวิธีการสกัด ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดแสดงให้เห็นลักษณะเฉพาะที่สัมพันธ์กับฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยน้ำมันหอมระเหยมะแขว่นประกอบด้วย D-Limonene, Cis-sabinene, 3-Carene และ Terpinen-4-ol ซึ่งเป็นกลุ่ม monoterpenes ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูมีองค์ประกอบหลัก ได้แก่ eugenol เป็นสารออกฤทธิ์หลัก พบประมาณร้อยละ 70-90 ในน้ำมันกานพลู และมี eugenol acetate และ β -Caryophyllene ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ บรรเทาอาการปวด และต้านจุลชีพ (Pinto et al., 2009) สำหรับการผสมน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดในอัตราส่วนที่เท่ากัน 1:1 พบว่า มี eugenol และ limonene ยังคงเป็นองค์ประกอบหลัก โดยสารอื่นๆ มีปริมาณลดลง แสดงให้เห็นว่าการผสมกันของน้ำมันหอมระเหย อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีบางส่วน อันเป็นผลจากปฏิกิริยาเคมีระหว่างสารประกอบกลุ่ม terpenes และ phenolics ซึ่งทำให้สารบางส่วนสลายตัวหรือเปลี่ยนรูป สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tisserand and Young (2014) ระบุว่า การผสมน้ำมันหอมระเหยอาจส่งผลให้เกิด synergistic หรือ antagonistic effect ขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบ

4.9.2 ความสามารถของน้ำมันหอมระเหยในการการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans*

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากานพลู น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และน้ำมันหอมระเหยจากานพลูผสมมะแขว่น (1:1) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียหลักที่ก่อให้เกิดฟันผุ โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นความแตกต่างของฤทธิ์ทางชีวภาพระหว่างน้ำมันแต่ละชนิดและสูตรผสม ดังนี้

1. การทดสอบด้วยวิธี Disc Diffusion ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิด (กานพลู มะแขว่น และสูตรผสม) สามารถยับยั้ง *S. mutans* ได้ ซึ่งตามรายงานของ Pithayanukul et al. (2018) ระบุว่าน้ำมันกานพลูมีสาร eugenol ซึ่งสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ ขณะที่น้ำมันมะแขว่นมีสารกลุ่ม limonene และ pinene ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพเช่นกัน แม้จะมีประสิทธิภาพต่ำกว่า เนื่องจากความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมี (Tadtong et al., 2014)

2. จากการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ (MIC) และฆ่าเชื้อ (MBC) พบว่าน้ำมันกานพลู มีค่า MIC และ MBC ต่ำที่สุด (7.81 มก./มล.) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. mutans* เมื่อเทียบกับอีกสองชนิด ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Cai and Wu (1996) ที่พบว่า eugenol ในกานพลูสามารถทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียได้แม้ในความเข้มข้นต่ำ ขณะที่น้ำมันมะแขว่น มีค่า MIC และ MBC สูงที่สุด (125 มก./มล.) แสดงถึงฤทธิ์ที่ต่ำกว่าอย่างชัดเจน ซึ่งอาจเนื่องมาจากสารออกฤทธิ์ในมะแขว่นมีความจำเพาะต่อเชื้อน้อยกว่า สำหรับน้ำมันผสมกานพลูและ มะแขว่น (1:1) ให้ค่า MIC และ MBC ที่ 62.5 มก./มล. ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่ามะแขว่นเพียงอย่างเดียวแต่ยังอ่อนกว่ากานพลู อย่างไรก็ตาม การผสมน้ำมันหอมระเหยอาจให้ผลเสริมฤทธิ์กันบางส่วน (partial synergism) ตามแนวคิดของ Hemaiswarya et al. (2008) ที่กล่าวว่าการผสมน้ำมันหอมระเหยอาจเพิ่มประสิทธิภาพโดยการลดความเป็นพิษหรือเพิ่มความสามารถในการละลาย

3. ค่า MIC และ MBC ที่เท่ากันของน้ำมันหอมระเหยทั้งสามชนิด บ่งชี้ว่าน้ำมันเหล่านี้ออกฤทธิ์แบบ bactericidal (ฆ่าเชื้อ) ไม่ใช่แค่ยับยั้งการเจริญเติบโต (bacteriostatic) ซึ่งตรงกับงานวิจัยของ Nostro et al. (2007) ที่รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยทำลายโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เสียหายและเกิดการรั่วของสารภายในเซลล์

4.9.3 ประสิทธิภาพของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยจากานพลูและมะแขว่นต่อการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans*

จากการวิเคราะห์ส่วนประกอบในน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร บ่งชี้ได้ว่า การใช้สารช่วยละลาย PPG-1-PEG-9 Lauryl Glycol Ether และ PEG-40 Hydrogenated Castor Oil มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของน้ำยาบ้วนปากได้ทางอ้อม โดยช่วยในการละลายและกระจายตัวของน้ำมันหอมระเหยให้เป็นอนุภาคเล็ก และเพิ่มความคงตัวของตำรับ ทำให้สารออกฤทธิ์สัมผัสกับ

เชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย (Campana et al., 2022) ที่ศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของน้ำมันหอมระเหยและไมโครอิมันชัน พบว่าการใช้สารช่วยละลายสามารถลดค่า MIC และ MBC ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับการใช้น้ำมันหอมระเหยเพียงอย่างเดียว

ในด้านความคงตัวของน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร พบว่าทั้งสองตำรับมีความเสถียรทางกายภาพในช่วง 7 รอบการทดสอบ ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้องและสภาวะเร่งความร้อนสลับเย็น โดยไม่เกิดการแยกชั้นหรือตกตะกอน แสดงว่ามีความเสถียรในการกระจายตัวของน้ำมันหอมระเหยในสูตร ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการใช้สารช่วยละลาย (solubilizer) ที่เหมาะสม (Prakash et al., 2019) สำหรับค่า pH ของทั้งสองตำรับอยู่ในช่วงที่ปลอดภัยสำหรับผลิตภัณฑ์ในช่องปาก (pH 5.5–7.0) โดยไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง (Soukoulis et al., 2018) และการควบคุมปัจจัยแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น แสงและออกซิเจน ทำให้น้ำมันหอมระเหยสามารถคงความเสถียรภายใต้สภาวะอุณหภูมิผันผวนได้ (Bakkali et al., 2008)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปาก พบว่าทั้งสองตำรับสามารถยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ได้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ (MIC) ที่เท่ากัน คือ 1.055 มก./มล. แม้จะยังมีประสิทธิภาพต่ำกว่า chlorhexidine ซึ่งเป็นมาตรฐานในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก (Pereira et al., 2021) แต่ถือว่าอยู่ในระดับที่มีนัยสำคัญสำหรับผลิตภัณฑ์จากสารธรรมชาติ

ในการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ (Bactericidal Activity) ในเวลา 4 นาที พบว่า ตำรับที่ 2 (F2) ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยสูงกว่า สามารถลดจำนวนเชื้อได้มากกว่าตำรับที่ 1 (F1) อย่างมีนัยสำคัญ (ร้อยละ 83.50 เทียบกับร้อยละ 56.75) แม้จะยังไม่ถึงเกณฑ์ที่กำหนด (ตามเกณฑ์ CLSI M26-A ที่กำหนดให้ต้องลดเชื้อมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 99.9) สำหรับการลดลงของเชื้อที่เกิดขึ้น อาจเป็นผลจากกลไกการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียโดยสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหย (Hyldgaard et al., 2012)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป

จากการศึกษาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและมะแขว่น รวมถึงการประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *Streptococcus mutans* ทั้งในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวและสูตรตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรผสมพบว่า น้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากกานพลูและมะแขว่นมีองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน โดยน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูให้ผลผลิตเฉลี่ยสูงกว่ามะแขว่น ซึ่งให้ผลผลิตเฉลี่ยร้อยละ 16.80 ± 1.09 ขณะที่มะแขว่นให้ผลผลิตเฉลี่ยร้อยละ 13.68 ± 1.61 โดยองค์ประกอบทางเคมีหลักของน้ำมันกานพลู ได้แก่ eugenol มีปริมาณร้อยละ 100, eugenol acetate ร้อยละ 58.25 และ caryophyllene ร้อยละ 65.90 ส่วนองค์ประกอบหลักของน้ำมันมะแขว่น ประกอบด้วย D-limonene มีปริมาณร้อยละ 100, cis-sabinene ร้อยละ 81.97, 3-carene ร้อยละ 27.22, 4(10)-thujene ร้อยละ 19.94 และ terpinen-4-ol ร้อยละ 19.44 สำหรับน้ำมันหอมระเหยผสมกานพลูและมะแขว่น (1:1) พบว่ามี eugenol อยู่ร้อยละ 100 และ D-limonene ร้อยละ 90.88 เป็นองค์ประกอบหลัก ในส่วนขององค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ มีปริมาณลดลง ได้แก่ sabinene ลดลงเหลือร้อยละ 77.79, Caryophyllene ร้อยละ 60.99, 3-Carene ร้อยละ 23.26 และ Terpinen-4-ol ลดเหลือร้อยละ 15.55 แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีหลังการผสม ซึ่งอาจเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสารกลุ่มเทอร์พีนและฟีนอลิก ในการประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* พบว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลู น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และน้ำมันหอมระเหยสมุนไพรผสมมะแขว่นสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ได้โดยวิธี Disc Diffusion และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) และฆ่าเชื้อ (MBC) แบคทีเรีย *S. mutans* ที่เท่ากัน คือ 7.81 มก./มล., 125 มก./มล. และ 62.5 มก./มล. ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบบ bactericidal กล่าวคือน้ำมันหอมระเหยสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียโดยตรง ทำให้เชื้อตาย ไม่สามารถเจริญเติบโตหรือแพร่พันธุ์ได้อีกต่อไป

จากการทดสอบความคงตัวของน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยสมุนไพรผสมมะแขว่นทั้ง 2 ตำรับ (F1 และ F2) ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (25 ± 2 องศาเซลเซียส) และสภาวะเร่งความร้อน สลัดเย็น (50 องศาเซลเซียส/4 องศาเซลเซียส) จำนวน 7 รอบ พบว่า ทั้ง 2 ตำรับ มีลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน มีความหนืดเล็กน้อย ไม่มีการแยกชั้นหรือตกตะกอน ให้กลิ่นฉุนฉุนเผ็ดซ่า และหอมหวานฉุนอบอ่อนของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ที่ให้ความรู้สึกสดชื่น สะอาด ฆ่าเชื้อ และค่า pH เฉลี่ย

ของตำรับที่ 1 และ ตำรับที่ 2 คือ 6.04 และ 6.15 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์ช่องปาก แสดงถึงความเสถียรของสูตรตำรับภายใต้สภาวะเร่งและอุณหภูมิห้อง ซึ่งอาจเกิดจากการใช้สารช่วยละลายที่เหมาะสม

จากการประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ของน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรผสมจากน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและมะแขว่นพบว่า น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรทั้งสองตำรับ (F1 และ F2) มีค่า MIC เท่ากันที่ 1.055 มก./มล. ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ขณะที่น้ำยาบ้วนปาก chlorhexidine antiseptic mouthwash ที่มี chlorhexidine gluconate อยู่ร้อยละ 0.12 ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุม มีค่า MIC ต่ำกว่ามาก อยู่ที่ 0.002 มก./มล. แสดงให้เห็นว่าน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรผสมยังมีประสิทธิภาพดีกว่าเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* DMST 18777 ด้วยวิธี bactericidal activity ในช่วงเวลา 4 นาที พบว่าตำรับที่ 1 (F1) ลดจำนวนเชื้อลงได้ร้อยละ 56.75 และตำรับที่ 2 (F2) ลดจำนวนเชื้อได้ร้อยละ 83.50 ซึ่งแม้จะไม่ถึงเกณฑ์มาตรฐานการฆ่าเชื้อ (มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 99.9) ตาม CLSI M26-A แต่ตำรับที่ 2 มีประสิทธิภาพสูงกว่าตำรับแรกอย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและมะแขว่นมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์น้ำยาบ้วนปากสมุนไพร โดยตำรับแรก (F1) เหมาะสำหรับการใช้ในชีวิตประจำวันหรือแบบระยะยาว เนื่องจากให้ผลการฆ่าเชื้อที่เสถียรในช่วงเวลานานกว่า ขณะที่ตำรับที่ 2 (F2) เหมาะสำหรับการใช้ในกรณีที่ต้องการประสิทธิภาพสูง

การศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นพื้นฐานสำคัญสำหรับการพัฒนาต่อยอดในหลายด้าน ทั้งการปรับปรุงสูตรให้มีความคงตัวสูงขึ้น การเพิ่มความเข้มข้น หรือปรับสัดส่วนของน้ำมันหอมระเหยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* การทดสอบประสิทธิภาพกับ biofilm การประเมินความปลอดภัยในระยะยาว รวมถึงการศึกษาลดต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่นในช่องปาก ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาเชิงพาณิชย์ในอนาคต และช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทยและส่งเสริมการใช้สมุนไพรท้องถิ่นในด้านทันตกรรมอย่างยั่งยืน อีกทั้งยังช่วยสร้างโอกาสทางเศรษฐกิจให้กับชุมชนผู้ปลูกสมุนไพรอีกด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและมะแขว่น เพื่อประเมินผลเสริมฤทธิ์ที่อาจเกิดขึ้นในสูตรตำรับ โดยเฉพาะในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน เช่น

1:2, 1:4 หรือ 1:8 ซึ่งอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและความเสถียรของผลิตภัณฑ์

5.2.2 ควรพิจารณาการใช้เอทานอลหรือแอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายในสูตร เพื่อเพิ่มความใส และลดความหนืดจากการใช้สารช่วยละลาย ซึ่งนอกจากจะช่วยให้ตำรับมีลักษณะทางกายภาพที่ดีขึ้น ยังอาจเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้อีกด้วย

5.2.3 ควรพัฒนาสูตรน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรโดยผสมตัวยาที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียร่วมกับ น้ำมันหอมระเหย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ และทำให้เห็นผลการออกฤทธิ์ที่รวดเร็วและ ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

5.2.4 ควรมีการขยายการศึกษาไปสู่การประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ต่อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในช่องปาก เช่น *Lactobacillus spp.* หรือ *Streptococcus salivarius* เพื่อป้องกัน ผลกระทบต่อสมดุลของจุลชีพในระบบช่องปาก ก่อนนำไปทดสอบในมนุษย์จริง

5.2.5 ควรทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ในน้ำยาบ้วนปากก่อนนำไปใช้ในมนุษย์ เพื่อ ประเมินความปลอดภัยเบื้องต้นในระดับเซลล์ ก่อนเข้าสู่การทดลองจริงในมนุษย์

5.2.6 ควรศึกษาความคงตัวของสารออกฤทธิ์หลังการผสมในระยะยาว รวมถึงทดสอบ ประสิทธิภาพทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ในสภาพที่ใกล้เคียงการใช้งานจริง เช่น การจำลองการบ้วน ปาก หรือการทดสอบในสภาพแวดล้อมของช่องปาก

5.2.7 ควรพิจารณาการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น BHT (butylated hydroxy toluene) หรือวิตามินอี (tocopherol) ลงในสูตรตำรับ เพื่อเพิ่มความคงตัวของสี กลิ่น และคุณภาพของ ผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษา

รายการอ้างอิง

- จารวี สุประเสริฐ และสุนาถ ทรัพย์แดง. (2555). การศึกษาผลของตัวทำละลายในการสกัดสมุนไพรที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย. *Bulletin of Applied Sciences*, 1(199), 99–109.
- จินตกร คุ้มสนสุชาติ. (2549). จุลชีววิทยาช่องปากและที่มาของโรคฟันผุ โรคปริทันต์ และโรคในช่องปาก (พิมพ์ครั้งที่ 3). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บังอร ศรีพานิชกุลชัย, อารมณ ตัตตะวะศาสตร์, วัชร คุณกิตติ และอุรสา รังสาดทอง. (2549). พัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากจากสารสกัดใบฝรั่ง. *Isan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 35-42.
- มนชยา วิสุทธิ. (2560).ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียกลุ่ม Staphylococci ของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นบางชนิดในจังหวัดนครราชสีมา. *KKU Science Journal*, 45(4), 805–816.
- สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. (2566). *กานพลู*.
<http://www.medplant.mahidol.a.th/pubhealth/syzygium.html>
- Ahmad, A., Van Vuuren, S., & Viljoen, A. (2014). Unravelling the complex antimicrobial interactions of essential oils-the case of *Thymus Vulgaris* (Thyme). *Molecules*, 19(3), 2896-2910.
- Al-Zereini, W., Al-Trawneh, I., Al-Qudah, M., Tumallah, H., Abudayeh, Z., & Hijazin, T. (2022). Antibacterial, antioxidant, and cytotoxic activities of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry essential oil with identification of its chemical constituents. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 78(9–10), 325–333.
- Andonovska, M., Kokolanski, V., Spasovski, S., Poposki, B., Ivanovski, K., Nikolovska, J., & Gigopulu, O. (2025). Titratable acidity and pH of commercial mouthwashes: A comprehensive analysis. *Archives of Public Health*, 17(1), 1-13.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils–A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- Bakri, I. M., & Douglas, C. W. (2005). Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Archives of Oral Biology*, 50(7), 645-651.
- Banas, J. A., & Vickerman, M. M. (2003). Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 14(2), 89–99.

- Bankar, R., Kumar, A., & Puri, S. (2011). Phytochemical constituent of *Syzygium aromaticum* L. *International Journal of Current Research*, 3(7), 215-217.
- Bauer, A. W., Kirby, W. H., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496.
- Bender, G. R., Sutton, S. V., & Marquis, R. E. (1986). Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infection and Immunity*, 53(2), 331-338.
- Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., & Bergonzi, M. C. (2014). Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014. Article 651593.
- Bowen, W. H., & Koo, H. (2011). Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: Role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Research*, 45(1), 69-86.
- Cai, L., & Wu, C. D. (1996). Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *Journal of Natural Products*, 59(10), 987-990.
- Campana, R., Tiboni, M., Maggi, F., Cappellacci, L., Cianfaglione, K., Morshedloo, M. R., Frangipani, E., & Casettari, L. (2022). Comparative analysis of the antimicrobial activity of essential oils and their formulated microemulsions against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(4), Article 447.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Syzygium aromaticum* L. *Phytotherapy Research*, 21(6), 501-506.
- Charoenying, P., Laosinwattana, C., Phuwiwat, W., & Lomratsiri, J. (2008). Biological activities of *Zanthoxylum limonella* Alston. fruit extracts. *KMITL Science Journal*, 8, 12-15.

- Charoenying, P., Teerarak, M., & Laosinwattana, C. (2010). An allelopathic substance isolated from *Zanthoxylum limonella* Alston fruit. *Scientia Horticulturae*, 125, 411-416.
- Chen, M. J., Lee, K. H., Tsai, I. L., & Chen, I. S. (2005). Two new sesquiterpenoids and anti-HIV principles from the root bark of *Zanthoxylum ailanthoides*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(18), 5915-5920.
- Ciancio, S. (2003). Improving oral health: Current considerations. *Journal of Clinical Periodontology*, 30(1), 4-6.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (1999). *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: Approved guideline M26-A*. CLSI.
- Cortés-Rojas, D. F., de Souza, C. R. F., & Oliveira, W. P. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): A precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(2), 90-96.
- Cretescu, I., Horhat, R., Munteanu, O., & Caprită, R. (2017). Evaluation of physical-chemical characteristics of commercially available fluoride mouth rinses. *Romanian Journal of Biophysics*, 27(3), 111-120.
- De Soet, J. J., Nyvad, B., & Kilian, M. (2000). Strain-related acid production by oral streptococci. *Caries Research*, 34, 486-490.
- Featherstone, J. D. B. (2000). The science and practice of caries prevention. *Journal of the American Dental Association (JADA)*, 131(7), 887-899.
- Hamid, H. A., Yahaya, S. N., & Mokhtar, M. H. (2020). Antimicrobial activity of terpinen-4-ol. *Molecules*, 25(21), Article 4955.
- Hanna, M. N., Ferguson, R. J., Li, Y. H., & Cvitkovitch, D. G. (2001). A is an acid-inducible gene involved in the adaptive response to low pH in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 183, 5964-5973.
- Hillman, J. D. (2002). Genetically modified *Streptococcus mutans* for the prevention of dental caries. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 361-366.
- Hillman, J. D., Chen, A., & Snoep, J. L. (1996). Genetic and physiological analysis of the lethal effect of L-(+)-lactate dehydrogenase deficiency in *Streptococcus mutans*: Complementation by alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Infection and Immunity*, 64, 4319-4323.

- Huang, H. Y., Ishikawa, T., Peng, C. F., Tsai, I. L., & Chen, I. S. (2008). Constituents of the root wood of *Zanthoxylum wutaiense* with antitubercular activity. *Journal of Natural Products*, 71, 1146-1151.
- Islam, B., Khan, S. N., & Khan, A. U. (2007). Dental caries: From infection to prevention. *Medical Science Monitor*, 13, 196-203.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., & Schmidt, E. (2006). Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6303-6307.
- Kamatou, G. P., Vermaak, I., & Viljoen, A. M. (2012). Eugenol—from the remote Maluku Islands to the international market place: A review of a remarkable and versatile molecule. *Molecules*, 17(6), 6953-6981.
- Khumpirapang, N., Pikulkaew, S., Anuchapreeda, S., & Okonogi, S. (2018). Anesthetic activity of plant essential oils on *Cyprinus carpio* (koi carp). *Drug Discoveries & Therapeutics*, 12(1), 21-30.
- Lee, S. F., Progulske-Fox, A., Erdos, G. W., Piacentini, D. A., Ayakawa, G. Y., Crowley, P. J., & Bleiweis, A. S. (1989). Construction and characterization of isogenic mutants of *Streptococcus mutans* deficient in major surface protein antigen P1 (I/II). *Infection and Immunity*, 57, 3306-3313.
- Loesche, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological Reviews*, 50(4), 353-380.
- Loesche, W. J. (2007). Dental caries and periodontitis: Contrasting two infections that have medical implications. *Infectious Disease Clinics of North America*, 21, 471-502.
- Ma, J. K., Kelly, C. G., Munro, G., Whiley, R. A., & Lehner, T. (1991). Conservation of the gene encoding streptococcal antigen I/II in oral streptococci. *Infection and Immunity*, 59, 2686-2694.
- Matsui, R., & Cvitkovitch, D. (2010). Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiology*, 5, 403-417.
- Matsumura, M., Izumi, T., Matsumoto, M., Tsuji, M., Fujiwara, T., & Ooshima, T. (2003). The role of glucan-binding proteins in the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiology and Immunology*, 47, 213-215.

- Matthijs, S., & Adriaens, P. A. (2002). Chlorhexidine varnishes: A review. *Journal of Clinical Periodontology*, 29, 1–8.
- McNeill, K., & Hamilton, I. R. (2003). Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*, 221, 25–30.
- Melo, M. F. F., & Zickel, C. S. (2004). Os gêneros *Zanthoxylum* L. e *Esenbeckia* Kunth (Rutaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 18, 73–80.
- Mester, I. (1983). Structural diversity and distribution of alkaloids in the Rutales. In P. G. Waterman & M. F. Grondon (Eds.), *Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales* (pp. 31–96). Academic Press.
- Moulari, B., Lboutounne, H., Chaumont, J. P., Guillaume, Y., Millet, J., & Pellequer, Y. (2006). Potentiation of the bactericidal activity of *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (Hypericaceae) leaf extract against oral bacteria using poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles: In vitro study. *Acta Odontologica Scandinavica*, 64, 153–158.
- Moura, N. F., Giacomelli, S. R., Machado, E. C., Morel, A. F., Silveira, C. F. S., & Bittencourt, C. F. (1998). Antibacterial activity of *Zanthoxylum rhoifolium*. *Fitoterapia*, 3, 271–272.
- Nadkarni, K. M. (1982). *Indian Materia Medica* (Vol. 2). Popular Prakashan.
- Nassiba, F., Khadija, M., & Abdelaziz, S. (2021). Effect of eugenol on *Streptococcus mutans* adhesion on NiTi orthodontic wires: In vitro and in vivo conditions. *European Journal of General Dentistry*, 10, 151–157.
- Oliveira, R. A., Oliveira, F. F., & Sacramento, C. K. (2007). Essential oils: Prospects for agribusiness spices in Bahia. *Bahia Agrícola*, 8(1), 46–48.
- Paes Leme, A. F., Koo, H., Bellato, C. M., Bedi, G., & Cury, J. A. (2006). The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation—New insight. *Journal of Dental Research*, 85, 878–887.
- Pereira, R., Sousa, A. J., Silva, R., Almeida, P., & Lopes, C. (2021). Antimicrobial activity of essential oils against oral pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 131(2), 632–643.

- Petersen, F. C., Assev, S., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., & Scheie, A. A. (2002). Functional variation of the antigen I/II surface protein in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius*. *Infection and Immunity*, 70, 249–256.
- Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 1454–1462.
- Pithayanukul, P., Nithitanakool, S., Bavovada, R., & Bavovada, R. (2018). Antimicrobial activity of clove oil against oral pathogens. *Journal of Oral Science*, 60(2), 211–216.
- Pollio, A., De Natale, A., Appetiti, E., Aliotta, G., & Touwaide, A. (2008). Continuity and change in the Mediterranean medical tradition: *Ruta* spp. (Rutaceae) in Hippocratic medicine and present practices. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 469–482.
- Quintas, V., Prada-Lopez, I., Carreira, M. J., Suarez-Quintanilla, D., Balsa-Castro, C., & Tomas, I. (2017). In situ antibacterial activity of essential oils with and without alcohol on oral biofilm: A randomized clinical trial. *Frontiers in Microbiology*, 8, Article 2162.
- Rahim, Z. H. A., & Khan, H. B. S. G. (2006). Comparative studies on the effect of crude aqueous (CA) and solvent (CM) extracts of clove on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans*. *Journal of Oral Science*, 48(3), 117–123.
- Rodríguez-Tudela, J. L., Arendrup, M. C., Cuenca-Estrella, M., Donnelly, J. P., Hope, W., & Lass-Flörl, C. (2003). Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(8), 1–8.
- Saeed, S., & Tariq, P. (2008). In vitro antibacterial activity of clove against gram-negative bacteria. *Pakistan Journal of Botany*, 40(5), 2157–2160.
- Sampaio, F. C., Pereira, M. S., Dias, C. S., Costa, V. C., Conde, N. C., & Buzalaf, M. A. (2009). In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 289–294.

- Severino, V. G. P., Silva, M. F. G. F., Lucarini, R., Montanari, L. B., Cunha, W. R., Vinholis, A. H. C., & Martins, C. H. G. (2009). Determination of the antibacterial activity of crude extracts and compounds isolated from *Hortia oreadica* (Rutaceae) against oral pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 535–540.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., & Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7749–7759.
- Smullen, J., Koutsou, G. A., Foster, H. A., Zumbe, A., & Storey, D. M. (2007). The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, 41, 342–349.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., & Holt, J. G. (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Vol. 2). Williams & Wilkins.
- Soukoulis, C., Bohn, T., Aprea, E., & Cappellin, L. (2018). Stability of plant-derived antioxidants in flavonoid-enriched emulsion-based delivery systems. *Food Chemistry*, 267, 120–128.
- Svensäter, G., Larsson, U. B., Greif, E. C., Cvitkovitch, D. G., & Hamilton, I. R. (1997). Acid tolerance response and survival by oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 12, 266–273.
- Tadtong, S., Kamkaen, N., & Panthong, A. (2014). Chemical components and antimicrobial activity of *Zanthoxylum limonella* essential oil. *Natural Product Communications*, 9(6), 865–868.
- Takahashi, N., & Nyvad, B. (2010). The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives. *Journal of Dental Research*, 90(3), 294–303.
- Tangjitjaroenkun, J., Chavasiri, W., Thunyaharn, S., & Yompakdee, C. (2012). Bactericidal effects and time-kill studies of the essential oil from the fruits of *Zanthoxylum limonella* on multi-drug resistant bacteria. *Journal of Essential Oil Research*, 24(4), 363–370.
- Tisserand, R., & Young, R. (2014). *Essential oil safety: A guide for health care professionals* (2nd ed.). Elsevier.

- Uji, T. (2001). *Zanthoxylum rhetsa* (Roxb.) DC. In J. L. C. H. van Valkenburg, & N. Bunyapraphatsara (Eds.), *Plant resources of South-East Asia No. 12(2): Medicinal and poisonous plants 2* (pp. 598–599). Backhuys Publisher.
- Vachirarojpisan, T., Karnchanarungroj, K., Posiri, C., Hongsamsipjet, P., Charoensup, R., & Worapamorn, W. (2021). Efficacy of alcohol-free mouthwash containing essential oil from the fruits of *Zanthoxylum limonella* Alston on dental biofilm, gingivitis, and *Streptococcus mutans* controls. *Mahidol Dental Journal*, 41, 83–90.
- Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangchai, T., & Thubthimthed, S. (2005). Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, 76, 233–236.
- Xu, J. S., Li, Y., Cao, X., & Cui, Y. (2013). The effect of eugenol on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans* and dental caries development in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 5(6), 1667–1670.
- Yamazaki, E., Inagaki, M., Kurita, O., & Inoue, T. (2007). Antioxidant activity of Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum* DC.) fruit. *Food Chemistry*, 100, 171–177.
- Yang, G., & Chen, D. (2008). Alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* and their antiviral and antifungal effects. *Chemistry & Biodiversity*, 5, 1718–1722.
- Yu, H., Nakano, Y., Yamashita, Y., Oho, T., & Koga, T. (1997). Effects of antibodies against cell surface protein antigen PAC–glucosyltransferase fusion proteins on glucan synthesis and cell adhesion of *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, 65, 2292–2298.
- Zhao, W., Wolfender, J. L., Hostettmann, K., Xu, R., & Qin, G. (1998). Antifungal alkaloids and limonoid derivatives from *Dictamnus dasycarpus*. *Phytochemistry*, 47, 7–11.