

การพัฒนาสูตรตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยกานพลู
และมะแขว่นต่อการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans*

Development of Herbal Mouthwash Formulation Containing Essential Oils
from *Syzygium aromaticum* and *Zanthoxylum limonella* Alston
against *Streptococcus mutans*

วาทีณี สุริยพันธุ์

อีเมล: 6451701287@lamduan.mfu.ac.th

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ

อีเมล: phanuphong@mfu.ac.th

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยกานพลูและมะแขว่น และศึกษาการเสริมฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยกานพลูต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่นในการยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ ผลการสกัดพบว่าน้ำมันหอมระเหยมะแขว่นและกานพลู ให้ผลผลิตเฉลี่ยร้อยละ 13.68 ± 1.61 และ 16.80 ± 0.27 ตามลำดับ โดยองค์ประกอบทางเคมีหลักของมะแขว่น ได้แก่ D-Limonene, Cis-sabinene, 3-Carene, Thujene และ Terpinen-4-ol ขณะที่กานพลูมีสารสำคัญหลัก คือ Eugenol, Eugenol acetate และ Caryophyllene สำหรับน้ำมันหอมระเหยผสมกานพลูและมะแขว่น มีองค์ประกอบหลักของสารสำคัญคือ Eugenol และ D-Limonene ซึ่งพบในปริมาณสูงสุด ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อของน้ำมันหอมระเหยกานพลู, น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และน้ำมันหอมระเหยผสมเท่ากับ 7.81, 125 และ 62.5 mg/mL ตามลำดับ โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 กลุ่ม มีค่าเท่ากับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ ผลการทดสอบน้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันหอมระเหยผสมกานพลูและมะแขว่นพบว่า สูตรที่หนึ่งซึ่งมีน้ำมันผสมร้อยละ 6.25 โดยน้ำหนัก สามารถลดจำนวนเชื้อได้ร้อยละ 56.75 ภายใน 4 นาที ขณะที่สูตรที่สองซึ่งมีน้ำมันผสมร้อยละ 12.5 โดยน้ำหนัก สามารถลดจำนวนเชื้อได้ถึงร้อยละ 83.50 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น งานวิจัยนี้สามารถพัฒนาต่อยอดได้โดยปรับอัตราส่วนของน้ำมันหอมระเหยกานพลูและมะแขว่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ และศึกษาผลต่อความคงตัวของผลิตภัณฑ์ รวมทั้งประเมิน

ความปลอดภัยต่อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และเซลล์ในช่องปาก เพื่อยืนยันศักยภาพการนำไปใช้จริงในอนาคต

คำสำคัญ: กานพลู, *Streptococcus mutans*, น้ำยาบ้วนปาก, น้ำมันหอมระเหย, มะแขว่น

Abstract

This study aimed to develop a herbal mouthwash formulation from *Syzygium aromaticum* and *Zanthoxylum limonella* Alston essential oils, and to investigate the synergistic effect of *Syzygium aromaticum* essential oil on the antibacterial activity of *Zanthoxylum limonella* Alston essential oil against *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). The extraction results showed that the average yields of *Zanthoxylum limonella* Alston and *Syzygium aromaticum* essential oils were $13.68 \pm 1.61\%$ and $16.80 \pm 0.27\%$, respectively. The main chemical components of *Zanthoxylum limonella* Alston essential oil included D-Limonene, Cis-sabinene, 3- Carene, Thujene, and Terpinen-4-ol. While *Syzygium aromaticum* essential oil contained Eugenol, Eugenol acetate, and Caryophyllene as the major compounds. For the mixed essential oil from *Syzygium aromaticum* and *Zanthoxylum limonella* Alston, the predominant constituents were Eugenol and D-limonene, which were present at the highest amounts. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of *Syzygium aromaticum*, *Zanthoxylum limonella* Alston and the mixed essential oils against *S. mutans* were 7.81, 125, and 62.5 mg/ml, respectively. The minimum bactericidal concentrations (MBC) of the three essential oils were equal to their MIC values. The evaluation of the herbal mouthwash formulations demonstrated that the first formula containing 6.25% (w/w) of the mixed essential oils was able to reduce bacterial counts by 56.75% within 4 minutes. Whereas the second formulation, which containing 12.5% (w/w), reduced bacterial counts by 83.50%. The difference in antibacterial effectiveness between the two formulations was statistically significant. Therefore, This study can be further developed by optimizing the ratio of *Syzygium aromaticum* and *Zanthoxylum limonella* Alston essential oils to enhance antibacterial efficacy and product stability, as well as evaluating safety toward beneficial oral microorganisms and cell toxicity to confirm its potential for practical applications.

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

บทนำ

โรคฟันผุเป็นโรคติดเชื้อเรื้อรังที่พบบ่อยในมนุษย์ โดยเกิดจากกระบวนการสูญเสียแร่ธาตุของเคลือบฟันหรือเนื้อฟัน (Featherstone, 2000) ที่มีสาเหตุหลักจากเชื้อ *Streptococcus mutans* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้โดยทั่วไปในช่องปากโดยเฉพาะบริเวณผิวฟัน ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติก (lactic acid) และสร้างคราบจุลินทรีย์ (biofilm) บนผิวฟัน จนทำลายผิวฟันได้อย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้เกิดปัญหาสุขภาพของช่องปาก และคุณภาพชีวิต โดยเฉพาะในเด็กและวัยรุ่น

แม้การใช้น้ำยาบ้วนปากที่มีสารเคมี เช่น แอลกอฮอล์ หรือคลอเฮกซิดีน จะช่วยลดการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้ แต่ก็ยังมีข้อเสีย เช่น ทำให้เกิดการระคายเคืองของเนื้อเยื่อภายในช่องปาก อาการแสบร้อน ปุ่มรับรสทำงานผิดปกติ หรือเกิดคราบสีน้ำตาลบนตัวฟัน เกิดแผลในช่องปากและเหงือกได้ (Ciancio, 2003)

ปัจจุบันการนำน้ำมันหอมระเหยมาใช้น้ำยาบ้วนปากจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ซึ่งปลอดภัยและไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียง และช่วยยับยั้งการทำงานของคราบหินปูนและไบโอฟิล์มได้ โดยเฉพาะเมื่อใช้น้ำมันหอมระเหยร่วมกันจะเกิดการเสริมฤทธิ์และมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อมากขึ้น มีรายงานการพัฒนาน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่ผสมน้ำมันหอมระเหยหลายชนิด ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากโหระพาศักดิ์สิทธิ์ (*holy basil*) และชาเขาภูเขา (*mountain tea*) ร่วมกับสารสกัดจากเซนต์จอห์นเวิร์ต (*St. John's wort*) และยูโรเปียนโกลเดนรูด (*European goldenrod*) รวมทั้ง cetylpyridinium chloride (CPC) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการเกิดไบโอฟิล์มของ *Streptococcus mutans* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ที่ความเข้มข้นเพียง 0.63 % v/v และแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการใช้น้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันในการเพิ่มประสิทธิภาพการต้านเชื้อ (Dimou et al., 2021)

ในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อ *S. mutans* จากน้ำมันหอมระเหยกานพลู (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry) และผลมะแขว่น (*Zanthoxylum limonella* Alston) โดยในกานพลูมีสารประกอบหลัก คือ Eugenol ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ได้ (Nassiba et al., 2021) ขณะที่ผลมะแขว่นมีองค์ประกอบหลัก ได้แก่ Sabinene, Terpene-4-ol และ Limonene ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและต้านจุลินทรีย์ได้ (Tangjitjaroenkun et al., 2012) โดยมีงานวิจัยยืนยันว่าน้ำยาบ้วนปากที่มีน้ำมันหอมระเหยจากผลมะแขว่น สามารถลดคราบไบโอฟิล์มและอาการอักเสบของเหงือกได้ (Vachirarojpisan et al., 2021)

ดังนั้น การใช้น้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ถือเป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมทั้งแบคทีเรียและเชื้อก่อโรคในช่องปากได้ อย่างไรก็ตาม น้ำยาบ้วนปากที่มีเอทานอลอาจก่อให้เกิดการระคายเคืองและเพิ่มความเสี่ยงต่อการพัฒนาของโรคมะเร็งคอหอยในช่องปาก (oropharyngeal cancer) (Quintas et al., 2017) ดังนั้นงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ของน้ำยาบ้วนปากสูตรปราศจากแอลกอฮอล์ ที่มีส่วนผสมจากน้ำมันหอมระเหยกานพลูและมะแขว่น เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีความคงตัว และสามารถนำไปใช้ในการดูแลสุขภาพช่องปากต่อไป

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมน้ำมันหอมระเหยมะแขว่นและกานพลูด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ

นำผลมะแขว่นแห้งปริมาณ 100 กรัม มาบดละเอียด โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 300 mL เป็นตัวทำละลาย สกัดด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สำหรับกานพลูแห้งใช้ปริมาณ 25 กรัม มาบดละเอียด โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 100 mL เป็นตัวทำละลาย ทำการกลั่นเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นแยกน้ำมันหอมระเหยกับน้ำด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ซึ่งน้ำหนักน้ำมันหอมระเหยที่ได้ และคำนวณร้อยละผลผลิต ก่อนเก็บรักษาในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิต่ำ 4 °C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ (Ben Hassine et al. 2021)

สำหรับการเตรียมน้ำมันหอมระเหยผสมจากกานพลูและมะแขว่น นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำของแต่ละชนิดมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (w/w) โดยชั่งน้ำหนักน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดอย่างละเท่ากัน แล้วผสมให้เข้ากันในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิต่ำ 4 °C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

นำน้ำมันหอมระเหยกานพลู, น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น, และน้ำมันหอมระเหยผสมในอัตราส่วน 1:1 มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS) (Agilent 7890B GC ร่วมกับ 5977B MSD) เจือจางตัวอย่างด้วย Dichloromethane ความเข้มข้น 1% (w/v) จากนั้นฉีดตัวอย่าง 1 µL เข้าหัวฉีดที่อุณหภูมิ 250 °C ด้วยโหมดการฉีดแบบแยกส่วน โดยใช้ฮีเลียมเป็นก๊าซพาหะ ด้วยอัตราการไหลคงที่ 1 mL/min ตามที่กำหนดในคู่มือของผู้ผลิต (Agilent Technologies, 2016) แยกด้วยคอลัมน์ Agilent HP-5MS อุณหภูมิของเตาอบเริ่มต้นที่ 60 °C นาน 2 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเตาอบด้วยอัตรา 3 °C/min จนถึง 250 °C เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์องค์ประกอบเคมีด้วยโปรแกรม Agilent MassHunter โดยเปรียบเทียบกับสเปกตรัมกับฐานข้อมูลมาตรฐาน (Wiley10 และ NIST14) องค์ประกอบที่มีค่า match score $\geq$ 90% ถูกนำมารายงานผลเป็นร้อยละพื้นที่ใต้พีค (% Area) และค่าความเข้มข้น

โดยประมาณ ($\mu\text{g/mL}$) ซึ่งวิธีการนี้อ้างอิงจากงานของ Matulyte et al. (2019) และ McGregor et al. (2015)

3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* ของน้ำมันหอมระเหย

นำน้ำมันหอมระเหยกานพลู, น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และน้ำมันหอมระเหยผสม อัตราส่วน 1:1 มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ด้วยวิธี Agar Disc Diffusion โดยละลายตัวอย่างด้วยเอทานอล 95% และเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Erythromycin ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก ขณะที่เอทานอลเป็นกลุ่มควบคุมลบ นำเชื้อ *S. mutans* ที่ปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland standards มาเกลี่ยบนผิวอาหารวุ้น BHI (Brain Heart Infusion Broth) และวางแผ่นกระดาษกรองที่หยดตัวอย่างไว้แล้วบนผิวอาหารวุ้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดขนาดขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (mm) (Bauer et al., 1966)

4. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และฆ่าเชื้อ (MBC) *S. mutans* ของน้ำมันหอมระเหย

นำน้ำมันหอมระเหยกานพลู, น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และน้ำมันหอมระเหยผสม อัตราส่วน 1:1 มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) และฆ่าเชื้อ (MBC) *S. mutans* ด้วยวิธี Broth Dilution เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Erythromycin โดยเตรียมตัวอย่างเจือจางแบบสองเท่า (two-fold serial dilution) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จากนั้นเติมเชื้อ *S. mutans* ที่ปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland Standard บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลุมสุดท้ายที่ไม่มีตะกอนของเชื้อถือเป็นค่า MIC ส่วนค่า MBC พิจารณาจากหลุมที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนผิวอาหารวุ้น (Rodríguez-Tudela et al., 2003)

5. การเตรียมตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยผสม

พัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรปราศจากแอลกอฮอล์ 2 สูตร โดยใช้น้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่น ในอัตราส่วน 1:1 ที่ผ่านการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *S. mutans* แล้ว โดยสูตรแรก (F1) ใช้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยผสมเท่ากับ 1MIC และสูตรที่สอง (F2) ใช้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยผสมเท่ากับ 2MIC โดยตำรับที่ได้ต้องมีลักษณะใส ไม่มีการแยกชั้น และมีการกลั่นของสมุนไพรทั้งสอง (ดัดแปลงจาก บังอร ศรีพานิชกุลชัย, 2549)

6. การทดสอบความคงตัวของน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยผสม

นำตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่พัฒนาจากน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่นทั้งสองสูตร (F1 และ F2) มาทดสอบความคงตัวภายใต้สภาวะเร่งอุณหภูมิร้อน (50 °C) สลับเย็น (4 °C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสภาวะอุณหภูมิห้อง 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำซ้ำ 7 รอบ จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น สี กลิ่น การแยกชั้น การตกตะกอน และค่า pH หลังการทดสอบ จากนั้นนำน้ำยาบ้วนปากไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* อีกครั้ง

7. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร

นำตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยผสม (F1 และ F2) มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ด้วยวิธี Broth Dilution เปรียบเทียบกับน้ำยาบ้วนปาก ที่มีสาร chlorhexidine gluconate 0.12% (CHX) ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก โดยใช้เชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ที่ปรับความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland และเจือจางแล้ว จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างทดสอบแบบสองเท่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth และบ่มในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจนที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ถือเป็น MIC

8. การทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ *S. mutans* ของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร

นำตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร (F1 และ F2) มาทดสอบกับเชื้อ *S. mutans* DMST 18777 ด้วยวิธี Time-kill Assay โดยผสมเชื้อที่ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml กับตำรับน้ำยาบ้วนปาก และกำหนดช่วงเวลาสัมผัสเชื้อที่ 0, 1, 2 และ 4 นาที ดัดแปลงตามวิธีการของ CLSI M26-A (1999) โดยใช้วิธี pour plate และบ่มในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจนที่ 37 °C เป็นเวลา 18–24 ชม. แล้วตรวจนับจำนวนเชื้อที่ลดลงในรูปของ log reduction และร้อยละการลดลงของเชื้อทั้ง 4 ช่วงเวลา โดยประเมินประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของผลิตภัณฑ์ จากการลดลงของปริมาณเชื้อ ≥ 3 log CFU/ml (เท่ากับ 99.99%) ภายในเวลาที่กำหนด (CLSI, 1999) ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย t-test for independent samples และ Two-way ANOVA

ผลการวิจัย

1. การเตรียมน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรและมะแขว่น

ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรและมะแขว่นด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำพบว่า มะแขว่นให้ผลผลิตเฉลี่ยร้อยละ 13.68 ± 1.61 ขณะที่กานพลูให้ผลผลิตเฉลี่ยร้อยละ 16.80 ± 1.09 กานพลูให้ผลผลิตสูงกว่ามะแขว่น เนื่องจากกานพลูมี Eugenol เป็นองค์ประกอบหลัก (ร้อยละ 70–90) ซึ่งเป็นสารที่มีความคงตัวและระเหยง่าย ในขณะที่มะแขว่นมีปริมาณน้ำมันในเนื้อพืชที่น้อยกว่าและระเหยได้ยากกว่า

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดด้วยเครื่อง GC-MS โดยพิจารณาสารที่มีค่า match score $\geq 90\%$ พบว่า Eugenol เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู โดยมีสัดส่วนร้อยละ 100 (%Area) และมีความเข้มข้นประมาณ 32.74 $\mu\text{g/mL}$ องค์ประกอบที่พบรองลงมาคือ Caryophyllene พบประมาณร้อยละ 79%, 25.85 $\mu\text{g/mL}$ และ Eugenol acetate (58.25%, 19.07 $\mu\text{g/mL}$) ซึ่งล้วนมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ด้านการอักเสบ และระงับปวดในช่องปาก โดยรวมแล้วองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูอยู่ในกลุ่ม

phenolic compounds และ sesquiterpenes ซึ่งเป็นสารสำคัญที่มีบทบาทต่อฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติด้านการต้านจุลชีพของกานพลู

น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น พบว่า D-Limonene เป็นองค์ประกอบหลัก คิดเป็นร้อยละ 100 (%Area) มีความเข้มข้นประมาณ 23.96 µg/mL รองลงมาคือ Cis-Sabinene (81.97%, 19.64 µg/mL) และสารในกลุ่ม terpenes ได้แก่ 3-Carene (27.22%), 4(10)-Thujene (19.94%) และ Terpinen-4-ol (19.44%) โดยรวมแล้วน้ำมันหอมระเหยมะแขว่นประกอบด้วยสารในกลุ่ม terpenes และ terpenoids มากกว่าร้อยละ 80 ซึ่งเป็นสารระเหยที่ให้กลิ่นฉัตรสดชื่น มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ต้านอนุมูลอิสระ และลดการอักเสบ สามารถใช้เป็นสารแต่งกลิ่นและส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปากหรือยาแผนโบราณ

สำหรับน้ำมันหอมระเหยหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่น พบว่าองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยผสม ได้แก่ Eugenol (100% Area) และ Eugenol acetate (58%) ซึ่งเป็นสารสำคัญจากน้ำมันกานพลู โดยมีความเข้มข้นประมาณ 15.79 และ 9.16 µg/mL ตามลำดับ ขณะเดียวกันพบ D-Limonene (90.88%, 14.35 µg/mL) ซึ่งเป็นสารประกอบหลักจากน้ำมันมะแขว่น และองค์ประกอบอื่น เช่น Sabinene (77.79%), Caryophyllene (60.99%), 3-Carene (23.26%) และ Terpinen-4-ol (15.55%) พบในปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับน้ำมันหอมระเหยเดี่ยว การผสมระหว่างน้ำมันทั้งสองชนิดจึงทำให้เกิดการรวมกันทางเคมีของสารกลุ่ม phenolic compounds และ terpenes ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดฤทธิ์เสริมกันในการต้านเชื้อจุลชีพ

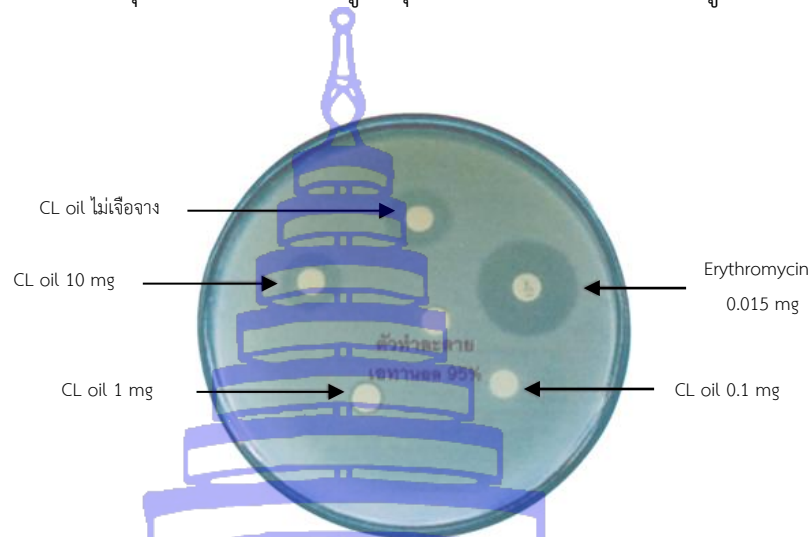
3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* ของน้ำมันหอมระเหย

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู, น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่น (1:1) ด้วยวิธี Agar Disc Diffusion พบว่าน้ำมันกานพลู ให้ผลยับยั้งสูงสุดที่ความเข้มข้นไม่เจือจาง มีขอบเขตการยับยั้งเฉลี่ย 13.44 ± 0.47 mm และประสิทธิภาพลดลงตามระดับความเข้มข้นและปริมาณที่ลดลง โดยที่ปริมาณ 10 mg (1000 mg/mL) และ 1 mg (100 mg/mL) พบขอบเขตการยับยั้งลดลงเหลือ 12.46 ± 0.89 mm และ 7.54 ± 0.39 mm ตามลำดับ ขณะที่ปริมาณ 0.1 mg (10 mg/mL) ไม่พบผลยับยั้ง แสดงในภาพที่ 1

น้ำมันมะแขว่นมีประสิทธิภาพต่ำกว่า โดยที่ความเข้มข้นไม่เจือจางให้ขอบเขตการยับยั้งเฉลี่ยเพียง 9.85 ± 0.66 mm และที่ปริมาณ 10 mg (1000 mg/mL) พบผลยับยั้งเพียงเล็กน้อย (7.85 ± 0.15 mm) ส่วนที่ปริมาณ 1 mg (100 mg/mL) และ 0.1 mg (10 mg/mL) ไม่พบผลยับยั้ง แสดงในภาพที่ 2

สำหรับน้ำมันผสม (1:1) แสดงผลยับยั้งใกล้เคียงกับน้ำมันกานพลูเดี่ยว (12.43 ± 0.37 mm) และที่ปริมาณ 10 mg (1000 mg/mL) ยังคงให้ผลยับยั้งที่ดี (11.22 ± 0.17 mm) แม้เจือจาง แสดงในภาพที่ 3 ซึ่งบ่งชี้ถึงผลการเสริมฤทธิ์ (Synergistic effect) ของน้ำมันทั้งสองชนิด

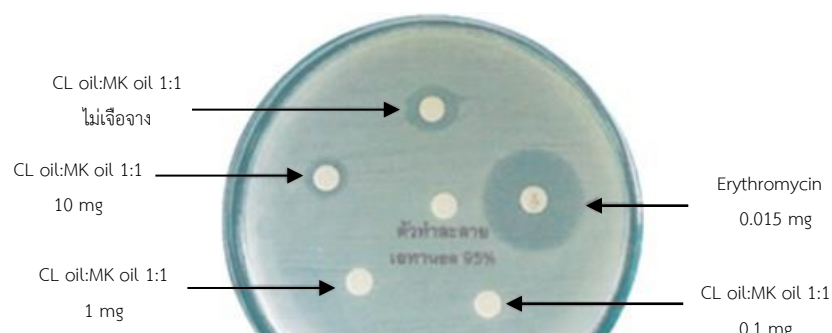
อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับสารควบคุมเชิงบวก Erythromycin ให้ขอบเขตการยับยั้งสูงสุด (23.58 ± 0.29 mm) พบว่าน้ำมันหอมระเหยทั้งสามชนิดมีประสิทธิภาพต่ำกว่า แต่ยังมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพช่องปาก โดยเฉพาะสูตรผสมที่ให้ผลเสริมฤทธิ์กันได้ดี



ภาพที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ของ น้ำมันหอมระเหยกานพลู (CL oil) เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Erythromycin ด้วยวิธี Disc Diffusion



ภาพที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ของน้ำมันหอมระเหยมะแขว่น (MK oil) เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Erythromycin ด้วยวิธี Disc Diffusion



ภาพที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ของน้ำมันหอมระเหยจากพลูผสมมะแขว่น (CL oil:MK oil; 1:1) เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Erythromycin ด้วยวิธี Disc Diffusion

4. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และฆ่าเชื้อ (MBC) *S. mutans* ของน้ำมันหอมระเหย

จากการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) และฆ่าเชื้อ (MBC) *S. mutans* ด้วยวิธี Broth Dilution พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากพลู, น้ำมันหอมระเหยมะแขว่น และน้ำมันหอมระเหยจากพลูผสมมะแขว่น มีค่า MIC เท่ากับ MBC คือ 7.81, 125, 62.5 mg/mL ตามลำดับ ในขณะที่ยามาตรฐาน Erythromycin ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก มีค่า MIC เท่ากับ 3.12 µg/mL และค่า MBC เท่ากับ 12.5 µg/mL จะเห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากพลูสามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. mutans* ได้ในความเข้มข้นต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันมะแขว่นและน้ำมันผสม

5. การเตรียมตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยผสม

จากการพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยจากพลูผสมมะแขว่นพบว่า ทั้งสองตำรับ (F1 และ F2) มีลักษณะทางกายภาพคล้ายคลึงกัน คือ เป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน มีความหนืดเล็กน้อย ไม่มีตะกอนหรือการแยกชั้น และมีกลิ่นเฉพาะตัวของสมุนไพรทั้งสองชนิด ซึ่งให้กลิ่นซิตรัสแบบเผ็ด ออกแนวไม้ (woody-spicy) ดังแสดงในภาพที่ 4 ซึ่งเกิดจากสารกลุ่ม terpenes และ aromatic derivatives ในพืชทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตาม ตำรับที่ 2 (F2) มีสีเหลืองเข้มกว่าและมีความหนืดสูงกว่าเล็กน้อย เนื่องจากมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยผสมเพิ่มขึ้นเป็น 12.5% w/w ซึ่งมากกว่าตำรับ F1 ถึงสองเท่า เพื่อรักษาความคงตัวของระบบ และมีปริมาณรวมของสารช่วยละลาย (PPG-1-PEG-9 Lauryl Glycol Ether และ PEG-40 Hydrogenated Castor Oil) เพิ่มขึ้นถึง 15% เมื่อเทียบกับ ตำรับ F1 ทำให้น้ำยาบ้วนปากมีความใสขึ้นและไม่แยกชั้น พร้อมทั้งเพิ่มสารให้ความชุ่มชื้น (Humectants) ปริมาณรวม 22% เพื่อช่วยปรับเนื้อสัมผัส ลดการระคายเคืองจากความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย และเพิ่มความรู้สึกรังสรรค์ของผู้ใช้



ภาพที่ 4 ลักษณะทางกายภาพของดํารับนํ้ายาบ้วนปากสมุนไพรจากนํ้ามันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่นดํารับที่ 1 (F1) (1MIC) (ก) และดํารับที่ดํารับที่ 2 (F2) (2MIC) (ข)

6. การทดสอบความคงตัวของนํ้ายาบ้วนปากสมุนไพรจากนํ้ามันหอมระเหยผสม

จากการทดสอบความคงตัวของดํารับนํ้ายาบ้วนปากสมุนไพรที่ทั้งสองสูตร (F1 และ F2) ภายใต้สภาวะเร่งอุณหภูมิร้อนสลับเย็นและสภาวะอุณหภูมิห้อง พบว่าทั้งสองสูตรมีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน ไม่เกิดการแยกชั้นหรือตกตะกอน แต่สีเข้มขึ้นและมีความหนืดเล็กน้อยหลังการทดสอบ ซึ่งอาจเกิดจากการออกซิเดชันของสารสำคัญในนํ้ามันหอมระเหย เช่น Eugenol และ Limonene โดยค่า pH เฉลี่ยของดํารับ F1 และ F2 เท่ากับ 6.04 และ 6.15 ตามลำดับ โดยทั้งสองสูตรอยู่ในช่วงที่ปลอดภัยต่อช่องปาก (5.5–7.0) และไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง ทั้งนี้ดํารับ F2 มีความคงตัวของค่า pH ดีกว่า โดยค่า pH ลดลงเพียงเล็กน้อย (0.16 หน่วย) เมื่อเทียบกับดํารับ F1 (0.27 หน่วย) ดํารับ F2 มีความหนืดมากกว่าเนื่องจากมีปริมาณนํ้ามันหอมระเหยและสารช่วยละลายสูงกว่า ซึ่งช่วยให้การกระจายตัวของนํ้ามันดีและคงตัวได้ดีกว่า โดยรวมแล้วทั้งสองสูตรมีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดีและคงตัวภายใต้การทดสอบ แต่ดํารับ F2 มีเสถียรภาพสูงกว่า เหมาะสมต่อการพัฒนาต่อเป็นผลิตภัณฑ์นํ้ายาบ้วนปากสมุนไพรเชิงพาณิชย์

7. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ของดํารับนํ้ายาบ้วนปากสมุนไพร

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ของนํ้ายาบ้วนปากสมุนไพรที่มีส่วนผสมนํ้ามันหอมระเหยกานพลูและมะแขว่น ทั้งสองดํารับ (F1 และ F2) ด้วยวิธี Broth

dilution พบว่า ทั้งสองตำรับสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ (MIC) เท่ากันที่ 1.055 mg/mL

แม้ว่าตำรับ F2 จะมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากกว่าตำรับ F1 สองเท่า แต่ไม่พบความแตกต่างของค่า MIC แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเกินระดับหนึ่งไม่ส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ ซึ่งอาจเกิดจากการที่สารออกฤทธิ์หลักในน้ำมันหอมระเหย เช่น Eugenol และ D-limonene มีการจับกับตำแหน่งออกฤทธิ์ของเชื้อถึงจุดอิ่มตัวแล้ว

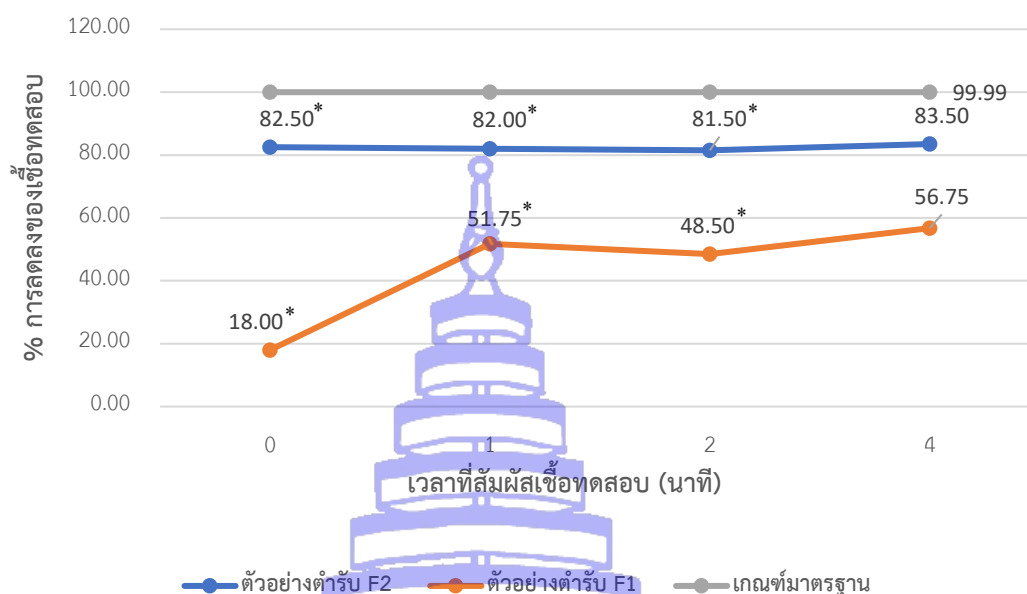
เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก น้ำยาบ้วนปาก C20 (0.12% chlorhexidine gluconate) พบว่ามีค่า MIC ต่ำกว่ามาก (0.002 mg/mL) แสดงถึงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่แรงกว่า เนื่องจาก chlorhexidine มีกลไกการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และยับยั้งการสร้าง biofilm ของเชื้อแบคทีเรียโดยตรง

อย่างไรก็ตาม น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรทั้งสองตำรับยังคงแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งอาจมาจากฤทธิ์เสริมกัน (synergistic effect) ของสารออกฤทธิ์ในน้ำมันกานพลูต่อ D-limonene ในมะแขว่น ที่ช่วยเพิ่มการซึมผ่านของสารออกฤทธิ์เข้าสู่เซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ahmad et al. (2014) ที่ระบุว่าการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเกินระดับ MIC ไม่ได้ช่วยเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ

8. การทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ *S. mutans* ของตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร

จากการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ *S. mutans* DMST 18777 ของตัวอย่างน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรจากน้ำมันหอมระเหยกานพลูผสมมะแขว่นตำรับที่ 1 (F1) และตำรับที่ 2 (F2) ด้วยวิธี bactericidal activity ตามแนวทาง CLSI M26-A (1999) ที่ช่วงเวลา 0, 1, 2 และ 4 นาที พบว่าทั้งสองตำรับสามารถลดจำนวนเชื้อได้ แต่ไม่ถึงเกณฑ์มาตรฐานการฆ่าเชื้อ (เท่ากับ 99.99% หรือ ≥ 3 log CFU/mL) โดยในช่วงเวลา 4 นาที พบว่าตำรับที่ 1 (F1) ลดจำนวนเชื้อได้ร้อยละ 56.75 (4.94 log CFU/mL) ขณะที่ตำรับที่ 2 (F2) ลดได้ร้อยละ 83.50 (4.52 log CFU/mL) ซึ่งแม้จะไม่ถึงเกณฑ์มาตรฐาน แต่แสดงให้เห็นว่าตำรับ F2 มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อได้ดีกว่าตำรับ F1 ในทุกช่วงเวลา

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย t-test for independent samples และ Two-way ANOVA พบว่าทั้งสองตำรับมีความแตกต่างของประสิทธิภาพอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในช่วงเวลา 0–2 นาที แต่ไม่แตกต่างกันที่เวลา 4 นาที ($p > 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 5 สะท้อนให้เห็นว่าตำรับ F2 มีฤทธิ์ในการลดเชื้อได้เร็วกว่า แต่ความคงที่ของประสิทธิภาพลดลงเมื่อเวลาผ่านไป



ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ของเวลากับเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อทดสอบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์
เปรียบเทียบกับเกณฑ์ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อตามเกณฑ์ CLSI M26-A
* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูให้ผลผลิตสูงกว่าน้ำมันหอมระเหยมะแขว่น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chaieb et al. (2007) ที่รายงานว่ากานพลูมีสาร Eugenol เป็นองค์ประกอบหลักที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพและต้านการอักเสบ ขณะที่น้ำมันหอมระเหยมะแขว่นมีสารสำคัญคือ D-limonene และ Sabinene ซึ่งให้ฤทธิ์ต้านเชื้อในระดับปานกลาง การผสมน้ำมันทั้งสองชนิดในอัตราส่วน 1:1 พบว่ามี Eugenol และ Limonene เป็นองค์ประกอบหลัก แสดงถึงความเป็นไปได้ของการเกิดการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ระหว่างสารในกลุ่ม terpenes และ phenolics สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tisserand and Young (2014) ระบุว่า การผสมน้ำมันหอมระเหยอาจส่งผลให้เกิด synergistic หรือ antagonistic effect ขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบ

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Streptococcus mutans* พบว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลูมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยมีค่า MIC และ MBC ต่ำที่สุด (7.81 mg/mL) ขณะที่น้ำมันมะแขว่นมีค่าดังกล่าวสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (125 mg/mL) ส่วนสูตรผสมให้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 62.5 mg/mL อาจแสดงถึงการเสริมฤทธิ์บางส่วนระหว่างสาร Eugenol และ Limonene ค่า MIC และ MBC ที่เท่ากันของน้ำมันหอมระเหยทั้งสามชนิด บ่งชี้ว่าน้ำมันเหล่านี้มีฤทธิ์แบบ bactericidal (ฆ่า

เชื้อ) ไม่ใช่แค่ยับยั้งการเจริญเติบโต ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nostro et al. (2007) ที่รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยหลายชนิดสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ โดยทำลายโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ เสียหายและเกิดการรั่วของสารภายในเซลล์

เมื่อนำไปพัฒนาเป็นตำรับน้ำยาบ้วนปากสมุนไพร พบว่าทั้งสองสูตร F1 และ F2 มี pH เฉลี่ย 6.04 และ 6.15 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงปลอดภัย (pH 5.5–7.0) และเหมาะสมสำหรับ ผลิตภัณฑ์ในช่องปากและไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Soukoulis et al. (2018) โดยผลิตภัณฑ์มีความคงตัวทางกายภาพดี ไม่เกิดการแยกชั้นหรือตกตะกอน ซึ่งสะท้อนถึง ประสิทธิภาพของสารช่วยละลาย PPG-1-PEG-9 Lauryl Glycol Ether และ PEG-40 Hydrogenated Castor Oil ที่ช่วยกระจายตัวของน้ำมันได้ดี ทำให้สารออกฤทธิ์สัมผัสกับเชื้อ แบคทีเรียได้มากขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Campana et al. (2022) พบว่าการใช้สารช่วยละลายสามารถลดค่า MIC และ MBC ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับการใช้น้ำมันหอมระเหยเพียงอย่างเดียว

จากการทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ของน้ำยาบ้วนปาก พบว่าทั้งสองตำรับมี ค่า MIC เท่ากัน คือ 1.055 mg/mL แสดงให้เห็นถึงการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ได้ในระดับหนึ่ง แม้จะมี ประสิทธิภาพต่ำกว่า chlorhexidine (0.002 mg/mL) แต่ถือว่าอยู่ในเกณฑ์เหมาะสมสำหรับสาร จากธรรมชาติ และไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อเยื่อช่องปาก

ในการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ ด้วยวิธี Time-kill assay ในเวลา 4 นาที พบว่า ตำรับที่ 2 (F2) มีประสิทธิภาพสูงกว่าตำรับแรกอย่างมีนัยสำคัญ สามารถลดจำนวนเชื้อได้มากกว่าตำรับ ที่ 1 (F1) อย่างมีนัยสำคัญ (ร้อยละ 83.50 เทียบกับร้อยละ 56.75) แม้จะยังไม่ถึงเกณฑ์ที่กำหนด (ตามเกณฑ์ CLSI M26-A ที่กำหนดให้ต้องลดเชื้อ $\geq 99.9\%$) แต่แสดงแนวโน้มการออกฤทธิ์ที่ดีกว่าใน ระยะต้น สำหรับการลดลงของเชื้อที่เกิดขึ้น อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์สูงขึ้น ทำให้การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์เกิดได้เร็วขึ้น (Hyldgaard et al., 2012) อย่างไรก็ตาม เมื่อเวลาผ่านไป ประสิทธิภาพของตำรับ F2 ลดลง ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของสารระเหยตามแนวคิด time-dependent activity (Khumpirapang et al., 2018)

ผู้วิจัยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติทั้ง t-test for independent samples และ Two-way ANOVA เพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความครอบคลุม โดย t-test ใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของ ค่าเฉลี่ยระหว่างสองกลุ่มภายใต้เวลาเดียวกัน ส่วน Two-way ANOVA ใช้วิเคราะห์อิทธิพลของชนิด ตำรับและระยะเวลา รวมถึงปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งสองต่อประสิทธิภาพการลดลงของเชื้อ การใช้ สถิติทั้งสองวิธีร่วมกันช่วยให้สามารถตีความผลได้ทั้งในระดับภาพรวมและเชิงเปรียบเทียบเฉพาะจุด อย่างถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

จากผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า ตำรับแรก (F1) เหมาะสำหรับการใช้ในชีวิตประจำวัน เนื่องจากให้ผลที่เสถียรในช่วงเวลาที่ยาวนานกว่า ขณะที่ตำรับที่ 2 (F2) เหมาะสำหรับการใช้งานระยะสั้นที่ต้องการประสิทธิภาพสูงขึ้น เช่น หลังมื้ออาหารหรือในผู้ที่มีปัญหาแบคทีเรียในช่องปากมากกว่าปกติ

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากตำรับน้ำยาบ้วนปากที่พัฒนาในงานวิจัยนี้ ใช้สารหอมระเหยเป็นสารออกฤทธิ์หลัก จึงควรพิจารณาความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถใช้ได้อย่างปลอดภัยตามข้อกำหนดของ IFRA (International Fragrance Association) เพื่อให้มั่นใจว่าปริมาณของน้ำมันหอมระเหยในผลิตภัณฑ์อยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อเยื่อช่องปากและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคในระยะยาว

หากต้องการพัฒนาต่อยอด ควรดำเนินการวิจัยต่อเนื่องโดยปรับอัตราส่วนของน้ำมันหอมระเหยจากพลูต้อมะแขว่นหลายระดับเพื่อให้ฤทธิ์ที่ดีกว่า (เช่น 2:1, 4:1, 8:1) เพื่อตรวจสอบผลการเสริมฤทธิ์และผลต่อความเสถียรของผลิตภัณฑ์ พร้อมพิจารณาการใช้แอลกอฮอล์ชนิดเหมาะสมเป็นตัวทำละลายเพื่อเพิ่มความใส ลดความหนืดจากการใช้สารช่วยละลาย และอาจเสริมประสิทธิภาพฆ่าเชื้อ ควบคู่กับการพัฒนาตำรับที่ผสมน้ำมันหอมระเหยกับสารต้านแบคทีเรียที่ปลอดภัยในช่องปาก เพื่อให้เห็นผลเร็วและชัดเจนยิ่งขึ้น ควรขยายการประเมินความปลอดภัยต่อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ (เช่น *Lactobacillus spp.* และ *Streptococcus salivarius*) และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพื่อยืนยันความปลอดภัยเบื้องต้น ก่อนเข้าสู่การทดสอบในมนุษย์จริง นอกจากนี้ควรศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์เพิ่มเติมโดยวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญหลักในน้ำมันหอมระเหย เช่น Eugenol และ Limonene ซึ่งมีโอกาสเกิดการออกซิเดชันได้เมื่อสัมผัสอากาศหรือแสง ด้วยเทคนิค GC-MS เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงของสารสำคัญระหว่างการเก็บรักษา และทดสอบประสิทธิภาพในสภาวะใกล้เคียงการใช้งานจริง รวมทั้งพิจารณาเติมสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น BHT หรือวิตามินอี เพื่อคงสภาพสี กลิ่น และคุณภาพผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาให้ดีที่สุด

รายการอ้างอิง

บังอร ศรีพานิชกุลชัย, อารมณั ตัตตะวะศาสตร์, วัชรวิ คุณกิตติ และอรุชา รังสาดทอง. (2549). พัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากจากสารสกัดใบฝรั่ง. *Isan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 35-42.

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.

- 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.
- Ben Hassine, D., El Euch, S. K., Rahmani, R., Ghazouani, N., Kane, R., Abderrabba, M., & Bouajila, J. (2021). Clove buds essential oil: The impact of grinding on the chemical composition and its biological activities involved in consumer's health security. *BioMed Research International*, 2021, 9940591.
- 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.
- 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.
- Dimou, I., Dritsas, S., Aggelopoulou, P., Vassilatou, K., Damianaki, S., & Giaouris, E. (2021). Development of a herbal mouthwash containing a mixture of essential oils and plant extracts and *in vitro* testing of its antimicrobial efficiency against the planktonic and biofilm-enclosed cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. *Biofouling*, 37(4), 397-409.
- Featherstone, J. D. B. (2000). The science and practice of caries prevention. *Journal of the American Dental Association (JADA)*, 131(7), 887-899.
- Hyltdgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 12.

- 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.
- Matulyte, I., Marksa, M., Ivanauskas, L., Kalveniene, Z., Lazauskas, R., & Bernatoniene, J. (2019). GC-MS analysis of the composition of the extracts and essential oil from *Myristica fragrans* seeds using magnesium aluminometasilicate as excipient. *Molecules*, 24(6), 1062.
- McGregor, L., Barden, D., & Smith, S. (2015). Improving quality control of essential oils with GCxGC-TOF-MS and “soft” ionization. *LCGC International*, 11(17).
- 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.
- Nostro, A., Roccaro, A. S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., Cioni, P. L., Procopio, F., & Blanco, A. R. (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, 56(4), 519–523.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

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.

