

อิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้
ที่ผสมในตำรับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์
เพื่อต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์
Influence of *Melaleuca cajuputi* Powell and
Cymbopogon citratus Essential Oil Formulated in
Alcohol Free Mouthwash against *Candida albicans* Culture

ภัทรมาศ เรืองสวัสดิ์¹, จินตนา อธิติเดชาธรณ², เพ็ญพิชชา วนจันทร์รักษ์³
โรงพยาบาลแปลงยาว จังหวัดฉะเชิงเทรา

²ภาควิชาทันตกรรมครอบครัวและชุมชน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
³ศูนย์วิจัยทางทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Pattaramas Raungsawat¹, Chintana Itthidecharon², Phenphichar Wanachantararak³
¹Plaengyao Hospital, Chachoengsao

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

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

ชม. ทันตสาร 2562; 40(3) : 125-134

CM Dent J 2019; 40(3) : 125-134

Received: 22 February, 2019

Revised: 13 June, 2019

Accepted: 18 June, 2019

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาอิทธิพลและความเข้มข้นของ
น้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้ในตำรับน้ำยาบ้วน
ปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์

วิธีการศึกษา: ทดสอบประสิทธิภาพการต้านราแคนดิ-
ดาอัลบิแคนส์สายพันธุ์ ATCC 10231 ของน้ำยาบ้วนปาก
ปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมเพียงน้ำมันหอมระเหยเสม็ด
ขาวหรือตะไคร้ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-250 ไมโครลิตร/
มิลลิลิตร ด้วยวิธี disc diffusion และ broth microdilution
โดยใช้ nystatin เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive con-
trol) เลือกความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิด

Abstract

Aim: To study the influence of *Melaleuca cajuputi* Powell and *Cymbopogon citratus* essential oils formulated in alcohol free mouthwash against *Candida albicans* culture

Material and Methods: *Melaleuca cajuputi* Powell or/and *Cymbopogon citratus* essential oils were selected to be formulated in alcohol free mouthwash. The mouthwash containing certain concentrations in the range of 0-250 µl/ml of each essential oil was primarily determined for inhibitory

Corresponding Author:

จินตนา อธิติเดชาธรณ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ภาควิชาทันตกรรมครอบครัวและชุมชน
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

Chintana Itthidecharon

Assistant Professor; Department of Family
and Community Dentistry, Faculty of Dentistry,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
E-mail: chintana.itt@cmu.ac.th

ที่มีฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์ อย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) ตามด้วยการเปรียบเทียบพหุคูณ (multiple comparison) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มาเป็นส่วนผสมในตำรับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่พัฒนาขึ้น นำน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ตำรับที่มีแต่น้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวหรือตะไคร้ และตำรับที่มีน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดไปทดสอบประสิทธิภาพการต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์ด้วยวิธี disc diffusion และ broth microdilution

ผลการศึกษา: พบว่าวิธี disc diffusion ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ทดสอบฤทธิ์การต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์ของน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ทุกตำรับที่ใช้ในการศึกษานี้ และการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution พบว่าน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวความเข้มข้น 8 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร หรือน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ความเข้มข้น 4 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดในกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ ร้อยละ 80 โดยประมาณ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ไม่ผสมน้ำมันหอมระเหย ส่วนน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ตำรับที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวความเข้มข้น 8 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร และตะไคร้ความเข้มข้น 4 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์มากกว่าร้อยละ 80 และมากกว่าน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ตำรับที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวความเข้มข้น 8 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร หรือน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ความเข้มข้น 4 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญ

บทสรุป: น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ตำรับที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวความเข้มข้น 8 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร และตะไคร้ความเข้มข้น 4 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์ดีกว่าน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ตำรับที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวความเข้มข้น 8 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร หรือน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ความเข้มข้น 4 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร เพียงอย่างเดียว

คำสำคัญ: น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ น้ำมันหอมระเหย เสมีดขาว ตะไคร้ แคนดิดาอัลบิแคนส์

effect against *C. albicans* ATCC 10231 culture by disc diffusion and broth microdilution methods. The lowest concentrations of both essential oils significantly inhibiting the growth of *C. albicans* were formulated in alcohol free mouthwash. All three formulas of alcohol free mouthwash containing either *Melaleuca cajuputi* Powell or *Cymbopogon citratus* or both essential oils were determined for their anti-candidal activity as mentioned above.

Results: By disc diffusion method, no inhibition zone against *C. albicans* was observed from the alcohol free mouthwash containing *Melaleuca cajuputi* Powell or *Cymbopogon citratus* with the concentrations less than 250 µl/ml or 120 µl/ml respectively. In contrast, by broth microdilution method, the mouthwash formulated with 8 µl/ml *Melaleuca cajuputi* Powell or 4 µl/ml *Cymbopogon citratus* essential oil were the lowest concentrations significantly inhibiting the growth of *C. albicans* by 80% approximately. Moreover, the mouthwash formulated with both *Melaleuca cajuputi* Powell (8 µl/ml) and *Cymbopogon citratus* (4 µl/ml) showed relatively stronger inhibitory effect against *C. albicans* (> 80%), compared to the ones formulated without or with single essential oil.

Conclusions: The alcohol free mouthwash newly formulated with mixed *Melaleuca cajuputi* Powell and *Cymbopogon citratus* essential oils expressed more potent anti-candida effect than the others formulated without or with individual essential oil.

Keywords: alcohol free mouthwash, essential oil, *Melaleuca cajuputi* Powell, *Cymbopogon citratus*, *Candida albicans*

บทนำ

ราแคนดิดาอัลบิแคนส์เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ในช่องปาก สภาวะปกติไม่ก่อให้เกิดโรค แต่เมื่อมีปัจจัยนำ (predisposing factor) ทำให้เกิดปากอักเสบเหตุฟันเทียม (Candida-associated denture stomatitis) ซึ่งเป็นรอยโรคที่พบได้บ่อยที่สุดในช่องปาก^(1,2) และพบมากในผู้สูงอายุที่ใส่ฟันเทียม⁽³⁻⁶⁾ ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากประเทศไทยกำลังเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ⁽⁷⁾ การรักษามีความซับซ้อนโดยเฉพาะผู้สูงอายุที่มีหลายปัจจัยนำส่งเสริมให้เกิดการติดเชื้อ^(4,8) นอกจากนี้ราแคนดิดาอัลบิแคนส์ยังมีปัจจัยก่อโรคที่สำคัญ คือ การสร้างแผ่นชีวภาพ (biofilm) ทำให้สามารถต้านต่อการกำจัดเชื้อและดื้อยาต้านเชื้อรา⁽⁹⁻¹¹⁾ การรักษาจึงต้องประกอบด้วย การกำจัดปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดการติดเชื้อ ร่วมกับการดูแลอนามัยช่องปาก รวมถึงใช้ยาต้านเชื้อราในกรณีที่ต้องตรวจพบการติดเชื้อราร่วมด้วย⁽¹⁾ โดยนิยมใช้ยาแบบเฉพาะที่ในรูปยาอม ซึ่งมีรสชาติไม่ดี ต้องใช้หลายครั้งต่อวัน มีผลข้างเคียงจากการใช้ยา ผู้ป่วยบางรายจึงไม่ให้ความร่วมมือในการรักษา มีข้อจำกัดการใช้ในผู้ป่วยที่มีภาวะปากแห้ง น้ำลายน้อยซึ่งแนะนำให้ใช้ในรูปยาน้ำแขวนตะกอนแทน แต่มีส่วนผสมของน้ำตาลทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อฟันผุมากขึ้น⁽¹²⁾

น้ำยาบ้วนปากเป็นผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปากที่ใช้ง่าย ช่วยเสริมประสิทธิภาพการทำความสะอาดช่องปากด้วยการแปรงฟัน โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีความบกพร่องทางร่างกาย (physical impairment)⁽¹³⁾ ส่วนผสมของน้ำยาบ้วนปากตาม มอก. 2342-2550⁽¹⁴⁾ ประกอบด้วย ส่วนผสมพื้นฐาน ได้แก่ สารทำลาย สารคงความชุ่มชื้น สารลดแรงตึงผิว สารแต่งกลิ่นรส สารแต่งสี สารกันเสีย น้ำ สารปรับความเป็นกรด-ด่าง ส่วนสารอื่นๆ ได้แก่ สารสมานแผล และสารออกฤทธิ์ ที่เติมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปาก เช่น ฟลูออไรด์ สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ เป็นต้น น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อช่องปากได้น้อย สามารถใช้ในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ป่วยที่ได้รับเคมีบำบัดหรือรังสีรักษาบริเวณใบหน้าหรือผู้สูงอายุได้^(15,16)

ปัจจุบันมีการนำสมุนไพรไทยมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษาทางการแพทย์มากขึ้น เพื่อลดผลข้างเคียงจากการใช้ยา และลดค่าใช้จ่ายในการรักษา สมุนไพรหลายชนิดมีฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์รวมถึงเสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi*

Powell) และตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*)⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ เสม็ดขาว เป็นพืชที่พบได้ทั่วไปบริเวณพื้นที่ชุ่มน้ำในภาคตะวันตกเฉียงใต้ ภาคตะวันออก และภาคใต้ของประเทศไทย มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด^(20,21) น้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวมีองค์ประกอบสำคัญคือ สารประกอบมอนอเทอร์พีนส์ (monoterpenes) ประมาณร้อยละ 80⁽²⁰⁾ ตะไคร้เป็นพืชที่ปลูกได้ทั่วไปในประเทศไทย⁽²²⁾ ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ช่วยขับลม ต้านอนุมูลอิสระ แก้ปวด และต้านเชื้อแบคทีเรีย⁽²²⁾ น้ำมันหอมระเหยตะไคร้มีสารประกอบเชิงซ้อนของมอนอเทอร์พีนส์ โดยมีซิทรอล (citral) เป็นส่วนประกอบหลักประมาณร้อยละ 65-85⁽²³⁾

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวหรือน้ำมันหอมระเหยตะไคร้มีฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์^(17,24) แต่ยังไม่มีการศึกษาผลของการนำน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดมาเป็นส่วนผสมในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ในการต้านการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยผสมระหว่างเสม็ดขาวและตะไคร้ในตำรับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ในการต้านหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยสร้างเสริมสุขภาพช่องปาก (oral health promotion) ที่สามารถใช้ได้ง่ายโดยเฉพาะในกลุ่มผู้สูงอายุใส่ฟันเทียมที่ไม่สามารถดูแลอนามัยช่องปากได้ดี เพื่อควบคุมปริมาณของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ และลดอุบัติการณ์การติดเชื้อราดังกล่าว

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมน้ำมันหอมระเหย⁽²⁵⁾

นำใบเสม็ดขาวและตะไคร้สด 5 กิโลกรัม มาบดผสมกับน้ำสะอาด สกัดด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำในเครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหยขนาด 5 ลิตร จะได้น้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวมีลักษณะสีเขียวอมเหลือง ใส และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้มีลักษณะใส ไม่มีสี ใสภาชนะที่ปิดสนิทกันแสงเก็บไว้ในตู้เย็น

2. การเตรียมราแคนดิดาอัลบิแคนส์

นำราแคนดิดาอัลบิแคนส์สายพันธุ์ ATCC 10231 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์แบบเหลว (Sabouraud Dextrose Broth; SDB) 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อชนิดใซ้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เท่ากับสารละลาย Mc-Farland standard No.1 โครงการนี้ผ่านการรับรองด้านความปลอดภัยทางชีวภาพจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับส่วนงานชุดที่ 5 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Approval No. CMUIBC A-0561006)

3. การเตรียมน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวหรือตะไคร้⁽¹⁴⁾

นำส่วนผสมพื้นฐานของน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ซึ่งประกอบด้วยโพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) ความเข้มข้นร้อยละ 12 โดยปริมาตร สารละลายซอร์บิทอล (ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 70) ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เมนทอล (menthol) ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนัก (4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และโซเดียมเบนโซเอต (sodium benzoate) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) มาผสมกับน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวหรือน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่เจือจางความเข้มข้นลงด้วยน้ำครึ่งละประมาณสองเท่า ตั้งแต่ 250-0 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์ของน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวหรือน้ำมันหอมระเหยตะไคร้

4.1 วิธี disc diffusion หยดราแคนดิดาอัลบิแคนส์ที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บนอาหารเลี้ยงจุลชีพแบบวุ้น (Sabouraud Dextrose Agar; SDA) เกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้า ทิ้งให้แห้ง หยดน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวหรือน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ในความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษกรองปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ก้อนวางบน SDA ที่กระจายเชื้อไว้แล้ว โดยใช้ nystatin disc เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

4.2 การทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวและตะไคร้ที่มีฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์อย่างมีนัยสำคัญ ด้วยวิธี broth microdilution โดยทำการทดลองใน 96 well microtiter plate แบ่งกลุ่ม

การทดลองออกเป็น กลุ่มควบคุมการเจริญของเชื้อที่ใช้ทดสอบ (control) ประกอบด้วยราแคนดิดาอัลบิแคนส์ 100 ไมโครลิตร กลุ่มควบคุมการปราศจากเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อ (blank 1) ประกอบด้วย SDB 100 ไมโครลิตร กลุ่มควบคุมการปราศจากเชื้อของน้ำยาบ้วนปาก (blank 2) ประกอบด้วย SDB 100 ไมโครลิตร และน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวหรือตะไคร้ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-250 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร 20 ไมโครลิตร ส่วนกลุ่มทดสอบ (samples) และกลุ่มควบคุมผลบวกประกอบด้วยราแคนดิดาอัลบิแคนส์ 100 ไมโครลิตร และน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวหรือตะไคร้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-250 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร หรือ nystatin ความเข้มข้น 0-100 ยูนิต/มิลลิลิตร ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง อ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (optical density: OD540 nm) นำมาคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (percent of growth inhibition) จากสมการ⁽²⁶⁾

$$\text{Percent of growth inhibition} = \frac{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank 1}}) - (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank 2}})}{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank 1}})} \times 100$$

5. ฤทธิ์การต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์ของน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวและตะไคร้ที่พัฒนาขึ้น

ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวและตะไคร้ที่นำมาใช้เป็นส่วนผสมในตำรับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่พัฒนาขึ้น นำผลการทดลองจากข้อ 4.2 มาวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อเลือกความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่น้อยที่สุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ไม่ผสมน้ำมันหอมระเหย จากนั้นทดสอบฤทธิ์การต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์ของน้ำยาบ้วนปากที่ถูกพัฒนาขึ้น ด้วยวิธี disc diffusion และ broth microdilution เปรียบเทียบกับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวหรือน้ำมันหอมระเหยตะไคร้เพียงชนิดเดียว

ผลการศึกษา

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์เบื้องต้นด้วยวิธี disc diffusion พบขอบเขตการยับยั้งเชื้อของ nystatin disc 100 ยูนิต ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลบวก มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 15.17 ± 1.04 มิลลิเมตร น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวที่ความเข้มข้น 250 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร เท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ โดยให้ขอบเขตการยับยั้งเชื้อมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 8.33 ± 0.57 มิลลิเมตร ในขณะที่น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ความเข้มข้น 250 และ 120 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ โดยให้ขอบเขตการยับยั้งเชื้อมีเส้นผ่านศูนย์กลาง เท่ากับ 11.33 ± 0.57 มิลลิเมตร และ 8.67 ± 0.57 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ส่วนการทดสอบหาความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวและตะไคร้ที่ผสมในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยวิธี broth microdilution พบว่า nystatin 100 ยูนิต/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 1 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร

สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ไม่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในระดับหนึ่ง นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 120 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ใกล้เคียงกับ nystatin (รูปที่ 1) ส่วนน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ความเข้มข้นเพียง 0.5 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ก็สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ไม่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหย และที่ความเข้มข้นเท่ากับหรือมากกว่า 60 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ก็มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ใกล้เคียงกับ nystatin (รูปที่ 2)

ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวและตะไคร้ที่ 8 และ 4 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ตามลำดับถูกนำมาผสมในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์เป็นตัวรับที่พัฒนานี้ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้ประมาณร้อยละ 80

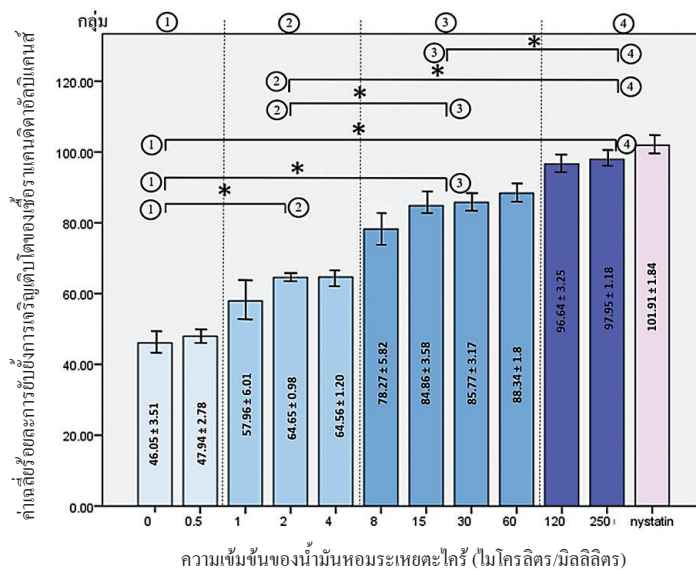
เมื่อทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ของทุกตัวรับคือ น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาว ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ และที่ผสมทั้งน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาว

ตารางที่ 1 การทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาวและตะไคร้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ผสมอยู่ในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ทดสอบโดยวิธี disc diffusion

Table 1 Inhibitory effect against *C. albicans* of *Melaleuca cajuputi* Powell and *Cymbopogon citratus* essential oils with varied concentrations supplemented in alcohol free mouthwash and determined by disc diffusion technique

กลุ่มทดลอง	ความเข้มข้น (ไมโครลิตร/มิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ ส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยเสมีดขาว	0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 120	-
	250	8.33 ± 0.57
น้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ ส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหย ตะไคร้	0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60	-
	120	8.67 ± 0.57
	250	11.33 ± 0.57
nystatin disc (IU) (ตัวควบคุมผลบวก, positive control)	100	15.17 ± 1.04

- หมายถึง ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ

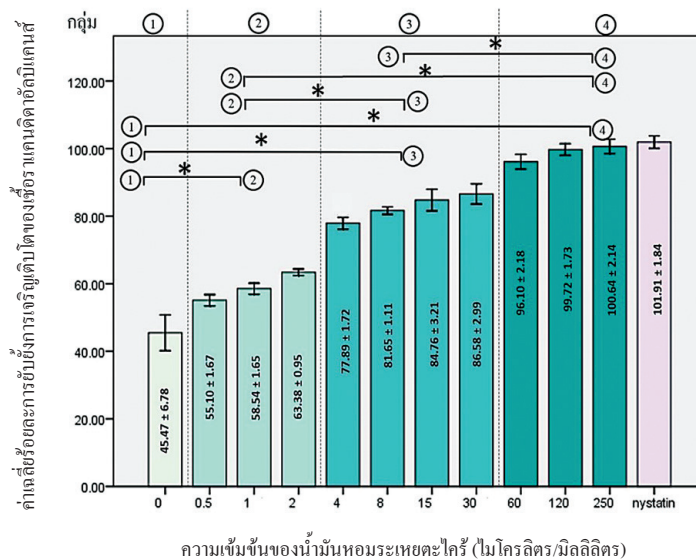


*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

① ② ③ ④ หมายถึง กลุ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่มีค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

รูปที่ 1 อุทธิของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ผสมอยู่ในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ทดสอบโดยวิธี broth microdilution

Figure 1 Inhibitory effect against *C. albicans* of *Melaleuca cajuputi* Powell essential oil with varied concentrations supplemented in alcohol free mouthwash and determined by broth microdilution technique



* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

รูปที่ 2 อุทธิของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ผสมอยู่ในน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ทดสอบโดยวิธี broth microdilution

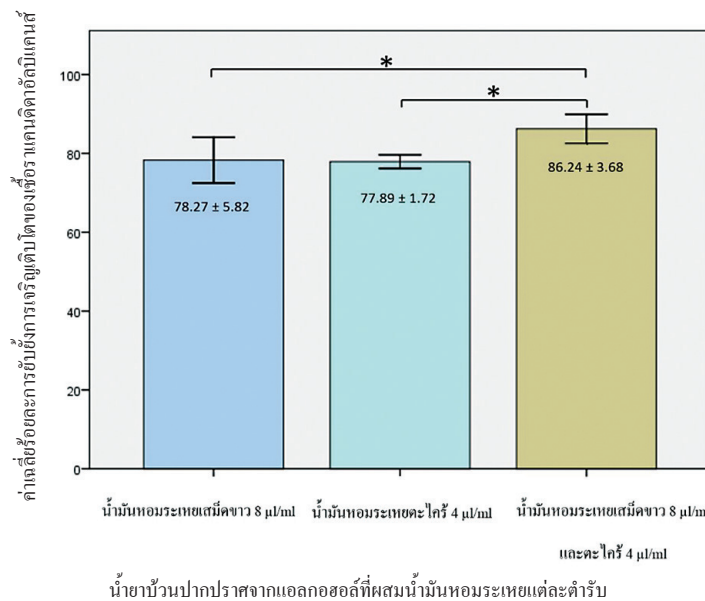
Figure 2 Inhibitory effect against *C. albicans* of *Cymbopogon citratus* essential oils with varied concentrations supplemented in alcohol free mouthwash and determined by broth microdilution technique

และตะไคร้ ด้วยวิธี disc diffusion ไม่พบขอบเขตการยับยั้งเชื้อของน้ำยาบ้วนปากทุกตำรับ แต่เมื่อทดสอบด้วยวิธี broth microdilution พบว่าตำรับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมทั้งน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้ มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์มากกว่าน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 80 (รูปที่ 3)

บทวิจารณ์

การทดสอบฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์ของน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้ด้วยวิธี disc diffusion นั้นไม่พบขอบเขตการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ใช้ทดสอบ เนื่องจากโดยวิธีนี้ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวหรือตะไคร้ที่แสดงฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของ

ราแคนดิดาอัลบิแคนส์ คือ 250 และ 120 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ตามลำดับ การทดสอบด้วยวิธีนี้ต้องอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสมของสารทดสอบ สารที่ไม่มีขั้วหรือไม่สามารถแพร่ได้ดีไม่เหมาะในการทดสอบ⁽²⁷⁾ นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการแพร่ เช่น ขนาดของสารประกอบที่มีฤทธิ์ ความเข้มข้นของสารประกอบ เป็นต้น ก็มีอิทธิพลต่อการแปลผลของการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารต่าง ๆ ด้วยวิธีนี้ ส่วนการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution สามารถนำมาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิด โดยในการศึกษานี้เลือกความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับน้ำยาบ้วนปากน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ไม่ผสมน้ำมันหอมระเหย และเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดในกลุ่มที่มีค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อประมาณร้อยละ 80 ทั้งนี้เนื่องจากการให้ตำรับที่พัฒนามีฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์ ที่ดีและมีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิด



* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05)

รูปที่ 3 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของราแคนดิดาอัลบิแคนส์ของน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ตำรับ คือ ตำรับที่ผสมเฉพาะน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว (8 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) ตำรับที่ผสมเฉพาะน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ (4 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) และตำรับที่ผสมทั้งน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว (8 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) และตะไคร้ (4 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) ทดสอบโดยวิธี broth microdilution

Figure 3 Comparisons of inhibitory effect against *C. albicans* by three formulas of alcohol free mouthwash containing *Melaleuca cajuputi* Powell (8 µl/ml) or *Cymbopogon citratus* (4 µl/ml) or both *Melaleuca cajuputi* Powell (8 µl/ml) and *Cymbopogon citratus* (4 µl/ml) essential oils

น้อยที่สุด จึงได้ดำรับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว (8 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) และตะไคร้ (4 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อร้อยละ 80 โดยประมาณ การศึกษานี้มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมา เช่น การศึกษาของ Hammer และคณะในปี ค.ศ. 1999⁽¹⁹⁾ ที่ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงราแคนดิดาอัลบิแคนส์ของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวด้วยวิธี agar dilution พบว่ามีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) เท่ากับร้อยละ 1 โดยปริมาตร (10 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) ส่วนน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ทดสอบด้วยวิธี broth microdilution และ agar dilution มีค่า MIC เท่ากับร้อยละ 0.06 โดยปริมาตร (6 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) และการศึกษาของ Taweechaisupapong และคณะในปี ค.ศ. 2012⁽¹⁸⁾ ที่พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์สายพันธุ์คลินิกจากผู้ป่วย โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.5 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร

การใช้สารต้านเชื้อจุลินทรีย์หรือน้ำมันหอมระเหยมากกว่าหนึ่งชนิดมาผสมกันมีโอกาสเกิดการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic) หรือการต้านฤทธิ์กัน (antagonistic) หรือมีฤทธิ์ต้านเชื้อเท่าเดิม (addictive) ขึ้นอยู่กับสารที่เป็นองค์ประกอบ⁽²⁸⁾ จากการศึกษาพบว่าการผสมระหว่างน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของ ราแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้มากกว่าน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยเพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาอื่นๆ ได้แก่ การศึกษาของ Tad-tong และคณะในปี ค.ศ. 2014⁽²⁹⁾ ที่แสดงถึงการเสริมฤทธิ์กันในการต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์สายพันธุ์ ATCC 10231 ระหว่างน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และข่า (*Alpinia galanga*) และการศึกษาของ Juniatik และคณะในปี ค.ศ. 2017⁽²⁴⁾ ที่พบว่าน้ำยาบ้วนปากชนิดนาโนอิมัลชันส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้และมะกรูด (*Kaffir Lime oil*) ช่วยเสริมฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์สายพันธุ์ ATCC 10231 เช่นเดียวกัน นอกจากนี้มีการศึกษาของ Zhang และคณะในปี ค.ศ. 2015⁽³⁰⁾ ที่นำน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ด (*Melaleuca leucadendra*) ซึ่งเป็นพืชในสกุล Myrtaceae

เช่นเดียวกับเสม็ดขาว มาผสมกับยาต้านเชื้อรามาตรฐานในกลุ่ม azole พบว่าช่วยเสริมฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์ แต่มีการศึกษาของ Rosato และคณะในปี 2009⁽³¹⁾ ที่แสดงถึงการมีฤทธิ์ต้านเชื้อเท่าเดิมโดยนำน้ำมันหอมระเหยจากต้นทรีที (*Melaleuca alternifolia* หรือ tree tea) มาผสมกับ nystatin แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างจากการใช้น้ำมันหอมระเหยจากต้นทรีทีเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามหากต้องการทราบว่าน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดในการศึกษานี้เสริมฤทธิ์กันในการต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์หรือไม่ ควรมีทดสอบเพิ่มเติมที่หลายความเข้มข้นและใช้การคำนวณเพื่อบอกฤทธิ์ของสารที่นำมาผสมกัน

ดังนั้นการศึกษานี้จึงสามารถนำไปเป็นแนวทางในการพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้ โดยอาจทำการปรับปรุงส่วนผสมของน้ำยาบ้วนปากให้เกิดความเข้ากันได้มากขึ้นหรือปรับสัดส่วนของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด⁽³²⁾ เพื่อใช้เป็นทางเลือกเสริมการรักษาด้วยยาต้านเชื้อราของรอยโรคปากอักเสบเหตุฟันเทียมที่มีการติตราแคนดิดาอัลบิแคนส์ร่วมด้วย โดยเฉพาะในผู้สูงอายุที่ไม่สามารถทำความสะอาดช่องปากได้อย่างเหมาะสม มีปัญหาทักษะการใช้มือ รวมถึงผู้ที่มีโรคทางระบบที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อราในช่องปากเนื่องจากการใช้น้ำยาบ้วนปากจัดเป็นรูปแบบที่ใช้งานง่าย^(33,34) และหากต้องการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ ควรทำการศึกษาทางห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบการคงตัวของน้ำยาบ้วนปาก ความเป็นพิษต่อเซลล์ และผลทางคลินิกต่อไป

บทสรุป

ภายใต้ข้อจำกัดในงานวิจัยสรุปได้ว่า ตำรับน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและตะไคร้ที่พัฒนาขึ้นมีฤทธิ์ต้านราแคนดิดาอัลบิแคนส์ดีกว่าน้ำยาบ้วนปากปราศจากแอลกอฮอล์ที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวหรือน้ำมันหอมระเหยตะไคร้อย่างใดอย่างหนึ่ง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.ธนพัฒน์ ศาสตร์เจริญ ศูนย์วิจัยทางทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้คำแนะนำด้านสถิติ ขอขอบคุณคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่

ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ สถานที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและจัดสรรทุนอุดหนุนงานวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปีงบประมาณ 2561

เอกสารอ้างอิง

- Maller UD, Maller VS. Candidiasis in denture wearers-a literature review. *JIADS* 2010; 11(1): 27-30.
- Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil* 1987; 14(3): 217-227.
- Budtz-Jorgensen E. Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. *J Oral Pathol* 1981; 10(2): 65-80.
- Jainkittivong A, Aneksuk V, Langlais RP. Oral mucosal conditions in elderly dental patients. *Oral Dis* 2002; 8(4): 218-223.
- Jainkittivong A, Aneksuk V, Langlais RP. Oral mucosal lesions in denture wearers. *Gerodontology* 2010; 27(1): 26-32.
- Gonsalves WC, Wrightson AS, Henry RG. Common oral conditions in older persons. *Am Fam Physician* 2008; 78(7): 845-852.
- Institute for Population and Social Research Mahidol University, Fundamental of Thai Gerontology Research and Development Institute. *Situation of the Thai Elderly 2016*. 1st ed. Bangkok: Amarin Printing and Publishing Public Company Limited; 2016: 138. (in Thai)
- Mandali G, Sener ID, Turker SB, Ulgen H. Factors affecting the distribution and prevalence of oral mucosal lesions in complete denture wearers. *Gerodontology* 2011; 28(2): 97-103.
- Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MA. Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol* 2000 2011; 55(1): 250-265.
- Perumal P, Mekala S, Chaffin WL. Role for cell density in antifungal drug resistance in *C. albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(7): 2454-2463.
- Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL, Redding SW. Redding SW. Denture stomatitis: a role for Candida biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98(1): 53-59.
- Bagh T, Chatra L, Shenai P, Veena KM, Rao PK. Antifungal drugs used in dentistry. *Int J Dent Health Sci* 2014; 1(4): 523-539.
- Barnett ML. The rationale for the daily use of an antimicrobial mouthrinse. *J Am Dent Assoc* 2006; 137 Suppl: 16S-21S.
- Industrial Product Standards Act, B.E. 2511 (1968) Notification of the Ministry of Industry No. 3749. Mouthwash. vol. 124, special part 155 dated 16th October B.E. 2550. (in Thai)
- Ellepola AN, Samaranayake LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Dis* 2001; 7(1): 11-17.
- Galbraith LK, Bailey D, Kelly L, et al. Treatment for alteration in oral mucosa related to chemotherapy. *Pediatr Nurs* 1991; 17(3): 233-236.
- Budsaba T, Chintana I, Phenphichar W. Antifungal Activity of *Melaleuca cajuputi* Powell essential oil alcohol free mouthwash against *Candida albicans*. Proceeding of the 5th Annual Meeting of The Royal College of Dental Surgeons of Thailand by The Thai Association of Oral and Maxillofacial Surgery and The Endodontic Society of Thailand: Expanding Knowledge for Better Dental Practices. 14-16 September 2016, at Bangkok Thailand.

18. Taweechaisupapong S, Chitropas P, Khunkitti W. Inhibitory effect of lemongrass oil and its major constituents on *Candida* biofilm and germ tube formation. *S Afr J Bot* 2012; 81: 95-102.
19. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999; 86(6): 985-990.
20. Tanit N. Potentiality of *Melaleuca cajuputi* Powell cultivation to develop for economic plantation purpose. *J Sirindhorn Peat Swamp Forest Study and Res* 2002; 3: 93-105. (in Thai)
21. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(1): 50-62.
22. Khonsung P. Review article: *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. *Thai J Pharmacol* 2012; 34(2): 37-51.
23. Satthanakul P, Taweechaisupapong S, Paphangkorakit J, Pesee M, Timabut P, Khunkitti W. Antimicrobial effect of lemongrass oil against oral malodour micro-organisms and the pilot study of safety and efficacy of lemongrass mouthrinse on oral malodour. *J Appl Microbiol* 2015; 118(1): 11-17.
24. Juniatic M, Hidayati K, Wulandari FP, et al. Formulation of nanoemulsion mouthwash combination of Lemongrass oil (*Cymbopogon citratus*) and Kaffir Lime oil (*Citrus hystrix*) against *Candida albicans* ATCC 10231. *Trad Med J* 2017; 22(1): 7-15.
25. Rassem HA, Nour AH, Yunus RM. Techniques for extraction of essential oils from plants: a review. *AJBAS* 2016; 10(16): 117-127.
26. Nakamoto K, Tamamoto M, Hamada T. In vitro effectiveness of mouthrinses against *Candida albicans*. *Int J Prosthodont* 1995; 8(5): 486-489.
27. Pauli A. Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. *Med Res Rev* 2006; 26(2): 223-268.
28. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. *Medicines* 2017; 4(3): 58.
29. Tadtong S, Watthanachaiyingcharoen R, Kamkaen N. Antimicrobial constituents and synergism effect of the essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Alpinia galanga*. *Nat Prod Commun* 2014; 9(2): 277-280.
30. Zhang J, Wu H, Jiang D, Yang Y, Tang W, Xu K. The antifungal activity of essential oil from *Melaleuca leucadendra* (L.) L. grown in China and its synergistic effects with conventional antibiotics against *Candida*. *Nat prod res* 2018: 1-4.
31. Rosato A, Vitali C, Piarulli M, Mazzotta M, Argentieri MP. In vitro synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *Phytomedicine* 2009; 16(10): 972-975.
32. Bassole IH, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 2012; 17(4): 3989-4006.
33. Ellepola AN, Samaranayake LP. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11(2): 172-198.
34. Felton D, Cooper L, Duqum I, et al. Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontists. *J Am Dent Assoc* 2011; 142: 1S-20S.