Research Article

Received: September 23, 2018; Accepted: November 26, 2018

ประสิทธิภาพของสารสกัดโมโนกลีเซอร์ไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา แคนดิดา อัลบิแคนส์ที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลในห้องปฏิบัติการ

In vitro Efficacy of Monoglycerides Synthesized from Virgin Coconut Oil in Fluconazole-Resistant *Candida albicans*

ธนาศักดิ์ รักษ์มณี*, นันทวรรณ กระจ่างตา, ยุทธพงศ์ โลไธสงค์,
กษิตินษ์ นันทวิสุทธิ์ และบุรฉัตร เรืองดิษฐ์
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120
วรดา สโมสรสุข
ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120
Thanasak Rakmanee*, Nantawan Krajangta, Yuthapong Lothaisong,
Kasitin Nuntavisuth and Burachattra Ruangdit
Faculty of Dentistry, Thammasat University, Rangsit Centre,
Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120
Worada Samosornsuk
Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย คือ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ในการกำจัดรา แคนดิดา อัลบิแคนส์ (*Candida albicans*) สายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อยาฟลูโคนาโซล (fluconazole) เปรียบเทียบกับน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ นำราแคนดิดาสายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อยาฟลูโคนาโซล (ATCC 62342 และ 90028 ตามลำดับ) มาทดสอบกับสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 18 และ 36 ด้วยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่น (broth microdilution) โดยใช้เชื้อปริมาณ 10^{-6}-10^{1} ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (CFU/mL) ซึ่งเพาะเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยงเชื้อ 96 หลุม (96-well tissue culture plate) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** rthanasa@staff.tu.ac.th

24 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายแต่ละหลุมมาเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อซาโบรอดเด็กโทรส (sabouraud dextrose agar) เพื่อดูประสิทธิภาพการกำจัดราของสารทดลองทั้ง 2 ความเข้มข้นนี้ ซึ่งพบว่าสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 36 สามารถกำจัดเชื้อดีที่สุด จึงเลือกมาทดสอบต่อโดยเปรียบเทียบกับสารกลุ่มอื่น ๆ ได้แก่ สารสกัดโมโนกลีเซอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 36 ที่เตรียมล่วงหน้า 3 สัปดาห์ น้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ความเข้มข้นร้อยละ 36 ยาฟลูโคนาโซลความเข้มข้น 8 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้วิธีการทดสอบเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น การศึกษานี้พบว่าสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 36 สามารถกำจัดราแคนดิดา อัลบิแคนส์ ทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้นเชื้อ 10^3 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ซึ่งเท่ากับกลุ่มที่ใช้ยาฟลูโคนาโซลความเข้มข้น 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา และความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสายพันธุ์ที่ไวต่อยา ขณะที่สารสกัดโมโนกลีเซอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 18 ก็สามารถกำจัดเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ แต่ต่ำกว่าอยู่ที่ระดับ 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าให้ผลเช่นเดียวกับสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 36 ที่เตรียมล่วงหน้า 3 สัปดาห์ ขณะที่น้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ความเข้มข้นร้อยละ 36 ไม่สามารถกำจัดราทั้ง 2 สายพันธุ์ ดังนั้นจึงสรุปว่าสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์สามารถกำจัดราแคนดิดา อัลบิแคนส์ ทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ดื้อและไวต่อยาฟลูโคนาโซลได้ที่ระดับความเข้มข้นเชื้อ 10^3 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ผลเทียบเท่าการใช้ยาฟลูโคนาโซลและสูงกว่าสารทดสอบชนิดอื่นในการทดลองนี้ ทั้งนี้พบว่าน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ไม่สามารถกำจัดรานี้

คำสำคัญ : แคนดิดา อัลบิแคนส์; สารสกัดโมโนกลีเซอไรด์; น้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์; ยาฟลูโคนาโซล

Abstract

The aim of this study was to evaluate whether monoglyceride (MG) extracted from virgin coconut oil (VCO) has a fungicidal effect on both fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant strains of *C. albicans*, comparing with VCO. Both strains of *C. albicans* were evaluated with 18% and 36% (v/v) MG using broth micro-dilution technique with concentrations ranging from 10^{-6}-10^1 CFU/mL. The experiment was performed in 96-well tissue-culture plates. After 24-hr incubation at 35 °C, each solution was cultured on Sabouraud dextrose agar for another 24-hr to evaluate the fungicidal effects. The 36 % MG was selected as the most effective MG concentration and then used to compare the fungicidal effect with a 3-week prepared 36 % MG, 36 % VCO, 8 µg/ml and 0.25 µg/ml fluconazole. The evaluation was tested with the broth micro-dilution. The present study showed that 36 % MG extracted has a fungicidal ability as similar effect as fluconazole to kill both susceptible and fluconazole-resistant strains of *C. albicans* at 10^3 CFU/mL, while 18 % MG demonstrated this ability at 10^2 CFU/mL. Comparing 36 % MG with other groups, the 3-week prepared 36% MG demonstrated a less fungicidal ability at 10^2 CFU/mL. Interestingly, the fungicidal effect was not observed in the 36 % VCO. Thirty-six percent of MG extracted from VCO demonstrated a fungicidal ability as similar effect as fluconazole against both susceptible and fluconazole-resistant strains of *C. albicans* at 10^3 CFU/mL, which was higher than 18 % MG and 3-week prepared 36 % MG. Of note, there was no fungicidal effect of 36 % VCO.

Keywords: *Candida albicans*; extracted monoglyceride; virgin coconut oil; fluconazole

1. บทนำ

ราแคนดิดา อัลบิแคนส์ *(Candida albicans)* เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ที่พบได้ตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ในหลายระบบรวมถึงภายในช่องปาก การติดเชื้อราในช่องปากอาจเกี่ยวข้องกับผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง สามารถแพร่กระจายสู่ระบบหมุนเวียนโลหิตและก่อการติดเชื้อในกระแสเลือด (candidemia) และเข้าสู่อวัยวะภายใน (systemic candidiasis) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในผู้ป่วยได้ [1,2] การติดเชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์ ยังเป็นสาเหตุหลักของโรคปากอักเสบเหตุฟันเทียม (denture stomatitis) [3] โดยมีลักษณะอาการเป็นรอยแดงเหมือนแผลกดเจ็บใต้ฐานฟันปลอม ซึ่งพบได้บ่อยถึงร้อยละ 65 ของผู้ใส่ฟันเทียมทั้งปากชนิดถอดได้ หรือเรียกได้ว่าโรคนี้เป็นพยาธิสภาพในช่องปากที่เกิดร่วมกับภาวะการติดเชื้อราแคนดิดาที่ฐานฟันปลอมแบบเรื้อรัง (candida-associated denture stomatitis) [4] แล้วส่งผลให้เกิดการอักเสบเรื้อรังของเนื้อเยื่อใต้ฐานฟันเทียม มีหลายการศึกษาที่แสดงความสัมพันธ์ของราชนิดนี้กับโรคปากอักเสบเหตุฟันเทียม ซึ่งจะพบราแคนดิดา อัลบิแคนส์ อยู่ในคราบจุลินทรีย์ (bacterial plaque) บนผิวฟันปลอม [5-7] โดยเฉพาะบนฐานฟันปลอมด้านติดเนื้อเยื่อที่ไม่ใช่บนเยื่อบุของเพดานปาก ซึ่งกล่าวได้ว่าการเกิดโรคปากอักเสบเหตุฟันเทียมนั้นมีความ สัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของราตระกูลแคนดิดาบนคราบจุลินทรีย์ที่เกาะติดบนฐานฟันเทียม ราและแบคทีเรียนั้นจะอาศัยอยู่ร่วมกันได้ในคราบโปรตีนที่ติดบนฟันเทียม [6] ซึ่งคราบเหล่านี้อาจเกิดเมื่อใช้งานฟันเทียมในช่องปากแต่ขาดการดูแลสุขอนามัยอย่างเหมาะสม ทำให้มีเชื้อต่าง ๆ เจริญได้ ซึ่งในปี ค.ศ. 1980 Arendorf และ Walker สังเกตพบว่ารากลุ่มแคนดิดาจะสร้างโคโลนี (colonized) ได้บริเวณผิวฟันและผิวฟันเทียม [6] และยังสามารถอยู่ร่วมกับแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ สเตรปโตคอคคัส แซงเกวียส (*Streptococcus sanguis)* สเตรปโตคอคคัส ซาลิวาริส *(Streptococcus salivaris)* สเตรปโตคอคคัส ไมติส *(Streptococcus mitis)* ฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลิเอตัม *(Fusobacterium nucleatum)* และแอคติโนมัยเซส วิคออัส (*Actinomyces viscous)* เป็นต้น [7-9]

สภาวะการอักเสบใต้ฐานฟันปลอม (denture-induced stomatitis) ยังพบว่ามีการผลิตกรดออกมาจากจุลินทรีย์ที่เกาะอยู่บนฐานฟันเทียมด้านที่ติดกับเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นสาเหตุให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นเกิดการอักเสบมากยิ่งขึ้น [3] การศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (light and electron microscope) พบว่าคราบจุลินทรีย์ที่พบบนฐานฟันปลอมมีลักษณะโครงสร้างเหมือนคราบจุลินทรีย์ที่ปรากฏอยู่บนฟันตามธรรมชาติ แต่ต่างกันที่มักพบราแคนดิดา อัลบิแคนส์ ที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคปากอักเสบเหตุฟันเทียมนั่นเอง [3] ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าราแคนดิดา อัลบิแคนส์ ยังสามารถเกาะติดกับส่วนของไฮดรอกซีแอบพาไทท์ที่เคลือบด้วยน้ำลาย (saliva-coated hydroxy-apatite) และบนผิวของฟันปลอมอคริลิก (acrylic denture) ได้อย่างดี และสามารถเจริญได้ทั้งบนผิวฟันผิวรากฟันและฐานฟันปลอมพลาสติก (acrylic denture base) [9] การเจริญของราแคนดิดานั้นจะเริ่มก่อตัวบนโปรตีน (protein pellicle) ที่เคลือบอยู่บนผิวฟันเทียม [3,6,10] โดยโปรตีนนี้จะเป็นส่วนหนึ่งของน้ำลาย [11] การก่อตัวของคราบจุลินทรีย์ที่เกาะกับผิวฟันเทียมที่อยู่ในช่องปากใช้ระยะเวลาก่อตัวเต็มที่

1 สัปดาห์ และมีโปรตีนในน้ำลายเป็นตัวช่วยให้เกิดลักษณะการรวมกลุ่มเหมือนแผ่นฟิล์มบนผิวฟันเทียม มีการศึกษาพบว่าถ้าเพาะราแคนดิดาบนแผ่นอคริลิกเรซินที่มีน้ำลายหรือเซรุ่มเคลือบอยู่เป็นเวลา 4-5 วัน เชื้อจะเจริญเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับการเพิ่มจำนวนของบลาสโตคอนิเดีย (blastoconidia) และไฮฟี (hyphae) ที่เพิ่มขึ้นของรา ซึ่งถือเป็นช่วงที่มีการเจริญของเชื้อสูงสุดแล้วจะหยุดอยู่คงที่ ซึ่งตรงข้ามกับการเจริญของเชื้อในแผ่นอคริลิกเรซินที่ไม่มีการเคลือบด้วยเซรุ่ม ราแคนดิดา อัลบิแคนส์ จะมีการเจริญเต็มที่ในระยะเวลา 1 วัน แต่หลังจากนั้นจะมีการรวมกลุ่มของบลาสโตคอนิเดียที่ลดลง ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าที่ระยะเวลา 6 วัน ถือเป็นเวลาที่เหมาะสมในการเพาะราแคนดิดาบนแผ่นอคริลิกเรซินที่มีน้ำลายเคลือบอยู่ [3,6,7]

การรักษาสภาวะติดเชื้อราแคนดิดา (candidiasis) ตามแนวทางของสถาบันติดเชื้อแห่งสหรัฐ (Infectious Diseases Society of America) (IDSA) ปี ค.ศ. 2004 แนะนำให้ใช้ยาในกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ แอมโฟเทอริซินบี (amphotericin B) แคสโพฟังจิน (caspofungin) โคลไตรมาโซล (clotrimazole) ฟลูโคนาโซล (fluconazole) ไอทราโคนาโซล (itraconazole) และโวริโคนาโซล (voriconazole) [12] อย่างไรก็ตาม ยากลุ่มแอมโฟเทอริซินบี (amphotericin B) นั้นมีผลข้างเคียงต่อไต ระบบเลือด และอาจเกิดอาการแพ้อย่างรุนแรงได้ ส่วนยาในกลุ่มอาโซล (azole) โดยเฉพาะฟลูโคนาโซล พบว่ามีรายงานอุบัติการณ์การดื้อยาต่อราแคนดิดา อัลบิแคนส์ สูงถึงร้อยละ 33 [13] นอกจากนี้มีผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการดื้อยาของราแคนดิดา อัลบิแคนส์ ต่อยาในกลุ่มอาโซล ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเชื้อในระดับยีนจนทำให้เกิดเชื้อกลายพันธุ์ ดังนั้นการค้นหาแนวทางการรักษาใหม่เพื่อใช้กับผู้ป่วยที่ติดเชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์ ที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลจึงถือเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่ง [1,14]

น้ำมันมะพร้าวแบ่งได้เป็น 2 ชนิดหลัก ได้แก่ น้ำมันมะพร้าวทั่วไป [refined, bleached, deodorized (RBD) coconut oil] และน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ (virgin coconut oil, VCO) [15] น้ำมันมะพร้าวทั่วไป คือ น้ำมันมะพร้าวที่ผลิตจากเนื้อมะพร้าวแห้ง (copra) แล้วผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (refine) กระบวนการฟอกสี (bleach) และการกำจัดกลิ่น (deodorize) ก่อนที่จะนำไปใช้บริโภค ซึ่งส่วนมากจะถูกนำมาใช้เพื่อการประกอบอาหาร [10] น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ คือ น้ำมันมะพร้าวที่ผ่านกระบวนการผลิตที่เรียกว่าการสกัดเย็น (cold process หรือ cold pressed) เนื่องจากไม่มีการใช้ความร้อน หรือใช้ความร้อนระดับต่ำในกระบวนการผลิต ทำให้ได้น้ำมันที่มีคุณภาพพิเศษ มีกลิ่นหอม รสชาติดี อุดมด้วยวิตามินอีและสารต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) [15,16] น้ำมันมะพร้าวมีความแตกต่างจากน้ำมันจากพืชอื่นทั่วไป เนื่องจากพบกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) ในปริมาณมาก เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่มาจากพืชซึ่งมักจะเป็นกรดไขมันชนิดที่ไม่อิ่มตัว ส่วนกรดไขมันอิ่มตัวโดยมากจะพบในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ น้ำมันมะพร้าวจะประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวขนาดความยาวปานกลาง (medium-chain fatty acids, MCFA) [17] มากกว่าร้อยละ 92 ที่มีจำนวนคาร์บอน 8-12 อะตอม กรดไขมันอิ่มตัวที่สำคัญของน้ำมันมะพร้าว ได้แก่ กรดลอริก (lauric acid) กรดคาโปรอิก (caproic acid) กรดคาปริลิก (caprylic acid) กรดคาปริก (capric acid) และกรดไมริสติก (myristic acid) [16] นอกจากนี้พบว่าน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์เป็นน้ำมันจากพืชชนิดเดียวที่มีปริมาณกรดลอริกสูง โดยมีสัดส่วนถึงร้อยละ 48.4-52.8 [16,18,19] ซึ่งอาจพบกรดลอริกนี้ได้ในไขมันจากสัตว์ เช่น นม เนย แต่จะพบปริมาณเพียง 3 % ของกรดไขมันทั้งหมด [20] การศึกษาผล

ของกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) [21] ที่ได้จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์พบว่าสามารถฆ่าแบคทีเรียที่มักปนเปื้อในอาหาร เช่น บาซิลลิคัส ซับทิลิส (*Bacillus subtilis*) เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*) ซาโมเนลลา เอนเทอริทิดิส (*Salmonella enteritidis*) และสแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) [21] ทั้งนี้ยังพบว่าสารสกัด กรดลอริก (lauric acid) ก็ยังสามารถฆ่าและยับยั้งการเจริญเติบโตของสแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส รวมถึงเชื้อก่อโรคอื่น ๆ เช่น สแตปฟิโลคอคคัส เอพิเดอมิดิส (*Staphylococcus epidermidis*) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแคนดิดา อัลบิแคนส์ [22] นอกจากนี้ยังมีข้อมูลว่าอนุพันธ์ของกรดลอริก (lauric acid derivative) สามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของสแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส [23] และแคนดิดา อัลบิแคนส์ [24] เช่นกัน

เมื่อกรดไขมันขนาดโมเลกุลปานกลางจับกับกลีเซอรอล (glycerol) จะทำให้เกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชั่น (esterification) ด้วยพันธะเอสเทอร์ (ester bond) [25,26] แต่หากกรดไขมันที่มีขนาดโมเลกุลปานกลางจับกับกลีเซอรอลที่ตำแหน่งที่ 1 หรือ 3 จะได้เป็นโมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) กรดไขมันอิ่มตัวในน้ำมันมะพร้าวก็เป็นโมเลกุลไตรกลีเซอร์ไรด์ [27] ซึ่งถ้ามีเอนไซม์ไลเปส (lipase) มาทำปฏิกิริยากับหมู่กลีเซอรอล (glycerol) และน้ำ จะเกิดปฏิกิริยากลีเซอโรไลซิส (glycerolysis reaction) ได้เป็นไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) และโมโนกลีเซอไรด์ [22,28] ซึ่งในช่องปากมีเอนไซม์ลิงกัวไลเปส (lingual lipase enzyme) ที่เป็นส่วนประกอบหลักในน้ำลาย [28] หากผสมกับน้ำมันมะพร้าวจะสามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis reaction) เกิดเป็นโมโนกลีเซอไรด์และไดกลีเซอไรด์ได้เช่นกัน [29, 0] ซึ่งทั้งกรดไขมันและโมโนกลีเซอไรด์นั้นพบว่ามีสมบัติการต้านอจุลชีพ ไวรัสและรา [11,18] มีการศึกษาพบว่าโมโนกลีเซอไรด์ที่สกัดจากน้ำมันมะพร้าวมีฤทธิ์ในการฆ่าไวรัสและแบคทีเรีย โดยจะละลายลิพิดและฟอสโฟลิพิดที่ห่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการแตกออกของเซลล์ ทั้งนี้ยังพบว่าการต้านแบคทีเรียนั้นสัมพันธ์กับการขัดขวางการเกิดซิกแนลทรานส์ดักชัน (signal transduction) ในกระบวนการจำลองตัวเองของเซลล์ด้วย [2,20,31,32] นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งหรือกำจัดรา ยีสต์ และโปรโตซัว การศึกษาฤทธิ์การต้านราของสารที่เป็นอนุพันธ์ของกรดลอริกในรากลุ่มเพนนิซิเลียม กลุ่มแอสเพอจิลัส และกลุ่มฟิวซาเรียม พบว่ากลไกในการต้านราเกิดได้ 2 รูปแบบ คือ การยับยั้งการเกิดสปอร์ เจิร์มมิเนชัน (spore germination) และการยับยั้งการเจริญแบบเรเดียล (radial growth) [2,20,31,32]

ความรู้เรื่องโรคปากอักเสบเหตุฟันเทียมอันมีสาเหตุมาจากราแคนดิดา อัลบิแคนส์ และสมบัติของเชื้อกลุ่มนี้ที่ก่อปัญหาการดื้อต่อยาต้านราที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่าสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ อาจมีสมบัติในการต้านหรือยับยั้งรากลุ่มแคนดิดา อัลบิแคนส์ ได้ ซึ่งอาจช่วยเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการพัฒนาสมบัติดังกล่าวของน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ให้เป็นประโยชน์กับผู้ป่วยโรคปากอักเสบจากฟันเทียมต่อไปในอนาคต

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแคนดิดา อัลบิแคนส์ ที่ดื้อต่อยาและไวต่อยาต้านราฟลูโคนาโซล เปรียบเทียบกับน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ

3. สมมติฐานการวิจัย

น้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวมากถึงร้อยละ 92 โดยพบกรดลอริกมากที่สุดประมาณร้อยละ 48.4-52.8 [29] การศึกษากลไกของสารอนุพันธ์ของกรดลอริกในการต้านรากลุ่มเพนนิซิเลียม กลุ่มแอสเพอจิลัส และกลุ่มฟิวซาเรียมนั้น คาดว่าเมื่อสกัดสารโมโนกลีเซอไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ตามวิธีของ Wang และคณะ ในปี ค.ศ. 1993 [26] สารสกัดนี้จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราที่ดื้อต่อยาต้านราได้ ซึ่งมีตัวแปรต้น ได้แก่ สารสกัดโมโนกลีเซอร์ไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ เปรียบ เทียบกับยาต้านราฟลูโคนาโซล (fluconazole) และ น้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ ส่วนตัวแปรตาม ได้แก่ ค่าความเข้มข้นของสารต้านราน้อยที่สุดที่ไม่พบการเจริญ เติบโตของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ (experimental research) ที่ใช้น้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ [ยี่ห้อปาริสุทธิ์ ผลิตโดยบริษัทแนชเจอรัลมายด์ (ประเทศไทย) จำกัด] และโมโนกลีเซอไรด์สกัดจากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปส โดยทดลองในห้องปฏิบัติการคณะสหเวชศาสตร์ ชั้น 3 อาคารปิยชาติ และวิเคราะห์ผลที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

4.1 การเตรียมราแคนดิดา อัลบิแคนส์

ราแคนดิดา อัลบิแคนส์ สายพันธุ์มาตรฐาน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ แคนดิดา อัลบิแคนส์ ATCC 90028 เป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อยาฟลูโคนาโซล และแคนดิดา อัลบิแคนส์ ATCC 62342 เป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล (บริษัท American Type Culture Collection 10801 University Boulevard Manassas, VA 20110 USA) ซึ่งเตรียมเชื้อตามคำแนะนำของผู้ผลิต โดยใส่น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดที่มีราอยู่ จากนั้นถ่ายสารละลายนี้ใส่ลงไปในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดด้วยจุกสำลีแล้วพันด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าในแนวราบด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน ถ่ายสารจากหลอดทดลองที่บ่มไว้มา 200 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเอสดีบี (Sabouraud-dextrose broth, SDB บริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา) แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าในแนวราบด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นดูดราจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่บ่มไว้แล้ว 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 30 (บริษัท OReC ประเทศนิวซีแลนด์) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จะได้ราที่เป็นสต๊อก (stock culture) แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และเมื่อต้องการนำเชื้อรามาทดสอบการเพาะเลี้ยงราทั้ง 2 สายพันธุ์ จากสต๊อก จะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเจลเอสดีเอ (Sabouraud dextrose agar, SDA บริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าในแนวราบด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลองต่อไป

4.2 การเตรียมสารละลายยาฟลูโคนาโซล

สารละลายยาฟลูโคนาโซลจะละลายจากยาฟลูโคนาโซล (บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) ปริมาณ 5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นตั้งต้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้ออาพีเอมไอ-1640 จนได้ความเข้มข้น 8 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งทั้ง 2 ความเข้มข้น ที่เลือกนี้ผู้วิจัยได้ทดสอบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของยานี้ต่อประสิทธิภาพการฆ่าราแคนดิดาทั้ง 2 สายพันธุ์ แล้วด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป (Sensititre™ Yeastone™-

บริษัท Thermo Fisher Scientific, Inc. ประเทศสิงคโปร์) โดยทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาฟลูโคนาโซลที่สามารถยับยับยั้งการเจริญของราแคนดิดา อัลบิแคนส์ ทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งดูจากสีของสารละลายที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละหลุมของชุดทดสอบ แล้วอ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดหรือค่าเอมไอซี (MIC, minimal inhibitory concentration) โดยผู้วิจัยพบว่าจากหลุมแรกที่สารละลายยังคงเป็นสีน้ำเงินหรือม่วงเข้ม ถัดไปจนถึงหลุมที่สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู ซึ่งการทดลองพบว่าค่าเอมไอซีของยาฟลูโคนาโซลที่สามารถยับยั้งการเจริญของราแคนดิดา อัลบิแคนส์ ความเข้มข้น 10^3 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ในสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาตอบสนองที่ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสายพันธุ์ไวต่อยาที่ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ผลการทดลองไม่ได้เผยแพร่)

4.3 การสกัดโมโนกลีเซอไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์

สกัดสารโมโนกลีเซอไรด์ตามวิธีของ Wang และคณะ (1993) [26] โดยผสมน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาณ 20 มิลลิลิตร กับกลีเซอรอล 8 กรัม และน้ำ 160 ไมโครลิตร ในขวดชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร (125-mL Erlenmeyer flask บริษัท Duran ประเทศเยอรมัน) ปิดให้สนิท แล้วบ่มในตู้บ่มสาร (Incubator รุ่น Precision บริษัท Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยใช้เครื่องเขย่า (Benchop Incubator shaker รุ่น Innova® 40 บริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา) ด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนกระทั่งส่วนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติมผงไลเปส (amano lipase PS รุ่น 534641 บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศญี่ปุ่น) ปริมาณ 250 มิลลิกรัม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นลดอุณหภูมิลงเหลือ 25 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 3 วัน แล้วนำส่วนผสมที่ได้ไปละลายในคลอโรฟอร์ม (chloroform บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศฝรั่งเศส) และกรองผ่านกรวยที่มีโซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate บริษัท OReC ประเทศนิวซีแลนด์) และกระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 1 (Whatman® No.1, บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) เพื่อกำจัดผงไลเปสและกลีเซอรอลส่วนเกินออก จากนั้นทำส่วนผสมที่ได้ให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยในเครื่องกลั่นระเหยสาร (Rotary Evaporator Model R-205 + V-800 บริษัท Büchi Labortechnik AG ประเทศสวิสเซอร์แลนด์) เมื่อได้สารสกัดแล้วจะเก็บไว้ในขวดแก้วปลอดเชื้อที่ปิดฝาสนิทและเก็บที่อุณหภูมิห้อง

4.4 การเตรียมน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์และสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์เพื่อใช้ในการทดลองฆ่ารา

เนื่องจากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์และโมโนกลีเซอไรด์ที่สกัดได้เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นก่อนนำไปทดสอบจึงต้องเตรียมให้สามารถละลายน้ำ โดยการศึกษานี้ใช้ ทวีน-20 (Tween® 20 P1379 จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศฝรั่งเศส) เป็นตัวเชื่อมประสานเพื่อทำละลายในอาหารเลี้ยงเชื้ออาพีเอมไอ-1640 ชนิดที่มีแอลกลูตามีน แต่ไม่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต (RPMI-1640 without sodium bicarbonate supplemented with L-glutamine บริษัท Gibco ประเทศสหรัฐอเมริกา) ซึ่งผู้วิจัยได้ทดสอบเปรียบเทียบอัตราส่วนการละลายของน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์และสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์ต่อทวีน-20 และอาหารเลี้ยงเชื้ออาพีเอมไอ-1640 จนได้อัตราส่วนการทำละลายที่เหมาะสมที่สุด คือ 40 : 10 : 50 ตามลำดับ (ผลการทดสอบไม่ได้เผยแผ่) โดยเริ่มจากการนำน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์หรือสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์มาผสมกับทวีน-20 ตามอัตราส่วน จากนั้นเขย่า

ด้วยเครื่องเขย่าสารให้เข้ากัน แล้วจึงผสมอาหารเลี้ยงเชื้ออาพีเอมไอ-1640 (RPMI 1640) ตามอัตราส่วนที่กำหนดลงไป เขย่าให้เข้ากันหลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่องเขย่าสารด้วยความถี่สูง (sonicator) เป็นเวลา 5 วินาที จำนวน 4 ครั้ง เพื่อให้สารรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกันและยังช่วยกำจัดเชื้ออื่น ๆ ที่อาจปนเปื้อนในสารละลายที่เตรียมได้ (ผลการทดลองเพาะเชื้อไม่ได้เผยแผ่) จากนั้นเก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดแก้วแบบมีฝาปิดที่ปราศจากเชื้อ ณ อุณหภูมิห้อง

4.5 การทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดราแคนดิดา อัลบิแคนส์ ทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อยาและไวต่อยาฟลูโคนาโซลของสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ความเข้มข้น 18 และ 36 %

การทดสอบในขั้นตอนนี้ใช้วิธีบรอทไมโครไดลูชัน (broth microdilution) เพื่อหาความสามารถในการฆ่าราของสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 18 และ 36 ต่อราทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งทั้ง 2 ความเข้มข้น นี้เลือกจากความสามารถในการละลายตัวของสารทดสอบและอัตราส่วนของสารทดลองต่อปริมาณรา (ดังอภิปรายโดยละเอียดในบทวิจารณ์) โดยราทั้ง 2 สายพันธุ์เตรียมที่ความเข้มข้น 1 แมคฟาร์แลนด์ จากนั้นเจือจางเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้ออาพีเอมไอ-1640 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-6} จนถึง 10^{1} ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในถาดหลุม 180 ไมโครลิตร และใส่ราที่เจือจางแต่ละความเข้มข้นลงในหลุม 20 ไมโครลิตร รวมปริมาตรทั้งหมด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บในตู้อบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเชื้อตั้งต้น โดยนำเชื้อที่ความเข้มข้น 10^{2} และ 10^{3} ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตรของราทั้ง 2 สายพันธุ์มา 100 ไมโครลิตร และนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเจลเอสดีเอ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีแล้วคำนวณหาเชื้อตั้งต้น นำราแคนดิดาที่อยู่ในถาดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 96 หลุม (96-well tissue culture plate บริษัท ไบโอเมด ประเทศไทย) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเจลเอสดีเอ เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการฆ่าราแคนดิดา โดยนำสารละลายรามาปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเจลเอสดีเอ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.6 การทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดราแคนดิดาทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อยาฟลูโคนาโซลของสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ที่เตรียมทันที เปรียบเทียบกับสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์ที่เตรียมล่วงหน้า 3 สัปดาห์ น้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์และยาฟลูโคนาโซล

ผลการทดลองข้างต้นพบว่าสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 36 มีประสิทธิภาพในการฆ่าราได้ดีกว่าความเข้มข้นร้อยละ 18 การทดสอบความสามารถในการฆ่าราแคนดิดาครั้งนี้จึงเลือกสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 36 ที่สกัดทันที เปรียบเทียบกับสารสกัดที่เตรียมทิ้งไว้ 3 สัปดาห์ และสารทดสอบชนิดอื่น ๆ ได้แก่ น้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ความเข้มข้นร้อยละ 36 และยาฟลูโคนาโซลความเข้มข้น 8 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งกลุ่มควบคุม คืออาหารเลี้ยงเชื้อเจลเอสดีบี ดังแสดงรูปที่ 1 โดยเตรียมความเข้มข้นราที่ 1 แมคฟาร์แลนด์ จากนั้นเจือจางเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้ออาพีเอมไอ-1640 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-6} จนถึง 10^{1} ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ใส่สารละลายที่จะใช้ทดสอบการฆ่าเชื้อที่ปริมาตร 180 ไมโครลิตรลงในถาดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 96 หลุม และใส่ราลงในหลุม 20 ไมโครลิตร รวมได้ปริมาตรทั้งหมด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนับจำนวนเชื้อตั้งต้นตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้ว จากนั้นนำสารละลายราปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเจลเอสดีเอ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจนับการเจริญของราต่อไป โดยเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีที่ขึ้นตั้งแต่ความเข้มข้นเชื้อ 10^{-6} ถึง 10^{1} ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ของสารสะลายแต่ละชนิดที่ใช้ทดสอบ โดยกำหนดให้มีโคโลนีเชื้อขึ้นได้ไม่เกินร้อยละ 0.1 ของจำนวนเชื้อที่ความเข้มข้นนั้น จึงจะแสดงว่ามีฤทธิ์ฆ่ารามากกว่าหรือเท่ากับ 99.9 %

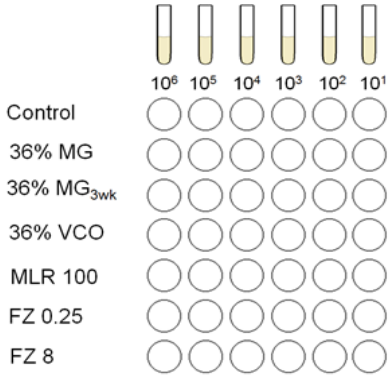

Figure 1 Demonstrating experimental and control groups with concentrations of test solution

4.7 ผลการสกัดโมโนกลีเซอไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์

หลังสกัดโมโนกลีเซอร์ไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ตามขั้นตอนที่ได้กล่าวไปแล้ว พบว่าสารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวใส มีกลิ่นอ่อน ๆ ของมะพร้าว เมื่อนำไปเทผสมกับน้ำกลั่นจะเกิดการแยกชั้นออกเป็นชั้นน้ำและชั้นน้ำมัน โดยจะเก็บรักษาภายในขวดปราศจากเชื้อและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องดังแสดงในรูปที่ 2

Figure 2 Monoglyceride (MG) extracted from virgin coconut oil (VCO)

4.8 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดราแคนดิดา อัลบิแคนส์ ทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อยาฟลูโคนาโซลของสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ความเข้มข้นร้อยละ 18 และ 36

การทดสอบพบว่าสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ความเข้มข้นร้อยละ 36 มีความสามารถในการกำจัดราแคนดิดาทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อยาที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ 10^{3} ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดโมโนกลีเซอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 18 สามารถกำจัดเชื้อได้ที่ระดับต่ำกว่าที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^{2} ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม แม้ว่าสารนี้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 36 จะสามารถกำจัดเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน แต่พบว่าลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นนั้นจะมีความแตกต่างกัน กล่าวคือ สายพันธุ์ที่ไวต่อยาฟลูโคนาโซลจะพบโคโลนีมีขนาดเล็กและมีจำนวนน้อยกว่า ขณะที่สายพันธุ์ดื้อต่อยา พบว่าโคโลนีที่ได้จะมีขนาดใหญ่กว่าและสามารถเจริญได้ในจำนวนมากกว่า ดังแสดงในรูปที่ 3

4.9 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดราแคนดิดาทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อยาฟลูโคนาโซลของสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ที่เตรียมทันทีเปรียบเทียบกับสารสกัด

โมโนกลีเซอไรด์ที่เตรียมล่วงหน้า 3 สัปดาห์ น้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ และยาฟลูโคนาโซล

การทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดราแคนดิดาทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อยาฟลูโคนาโซลพบว่าสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 36 สามารถยับยั้งการเจริญของราทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^3 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร แต่สารสกัดโมโนกลีเซอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 36 ที่เตรียมล่วงหน้า 3 สัปดาห์ สามารถกำจัดราแคนดิดาทั้ง 2 สายพันธุ์ ต่ำกว่าที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ส่วนสารละลายยาฟลูโคนาโซลความเข้มข้น 8 สามารถยับยั้งการเจริญของราแคนดิดา อัลบิแคนส์ ในสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^3 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร และในสายพันธุ์ไวต่อยาเป็นที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับการทดสอบผลด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป (Sensititre™ Yeastone™) ในตรงข้ามพบว่าน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ความเข้มข้นร้อยละ 36 ไม่สามารถกำจัดเชื้อทั้ง 2 ชนิด

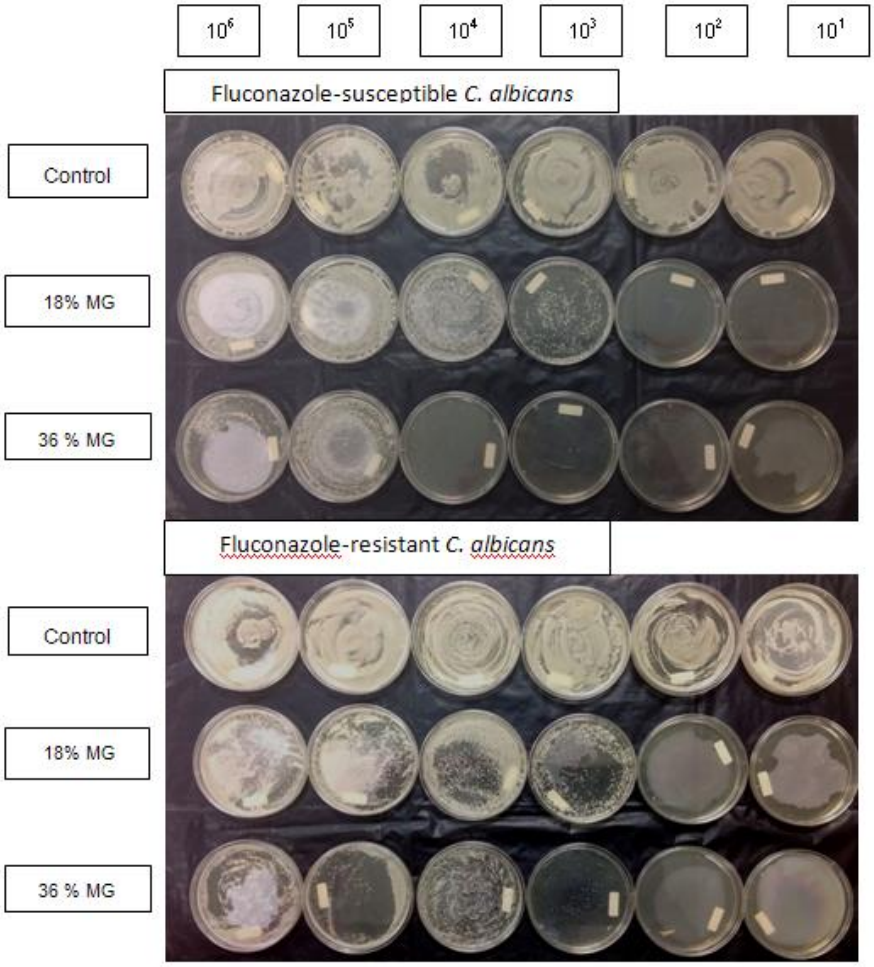

Figure 3 Demonstrating fungicidal ability of monoglyceride (MG) extracted from virgin coconut oil (VCO) in both fluconazole-resistant and susceptible *C. albicans*

5. วิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษานี้ใช้การสกัดโมโนกลีเซอร์ไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ ที่ใช้วิธีการสกัดเช่นเดียวกับการศึกษาของ Wang และคณะ (1993) [26] ซึ่งพบว่าการสกัดแต่ละครั้งอาจได้โมโนกลีเซอร์ไรด์ที่มีสมบัติต่างกัน อาจเนื่องจากใช้น้ำมันมะพร้าวที่เป็นสารตั้งต้นจากช่วงการผลิตที่ต่างกัน สารโมโนกลีเซอร์ไรด์ที่ได้อาจมีสมบัติที่ต่างกันด้วย หรือการใช้สารคลอโรฟอร์มที่นำมาเป็นตัวทำละลายก่อนการกรองผ่านโซเดียมซัลเฟต หากเป็นคลอโรฟอร์มที่มีการเปิดใช้งานมาแล้วเป็นระยะเวลานาน อาจส่งผลให้โมโนกลีเซอร์ไรด์ที่สกัดได้มีความผิดปกติไป โดยอาจเกิดการคงเหลือของคลอโรฟอร์มที่ไม่สามารถระเหยได้หมด ซึ่งจะพบว่ามีกลิ่นคลอโรฟอร์มปะปนอยู่ในสารสกัดดังกล่าวได้ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าในการสกัดโมโนกลีเซอร์ไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์มีหลายปัจจัยที่ควรควบคุมเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีสมบัติที่ดีสูงสุด

ขั้นตอนการเตรียมสารละลายเพื่อนำมาทดสอบในการศึกษานี้พบว่าทั้งน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์และสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์จากน้ำมันมะพร้าวสามารถละลายในอาหารเลี้ยงเชื้ออาพีเอมไอ (RPMI) โดยมีสารทวีน-20 เป็นตัวเชื่อมประสานในอัตราส่วนที่เหมาะสมโดยไม่พบการแยกตัวของชั้นน้ำและน้ำมัน ทั้งนี้พบว่าเมื่อใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายแทนสารละลายที่เตรียมได้ จะไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกันและเกิดการแยกตัวเป็นชั้นน้ำและชั้นน้ำมัน ดังนั้นในการทดลองนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้ออาพีเอมไอเป็นตัวทำละลายร่วม อย่างไรก็ตาม มีรายงานเกี่ยวกับสารทวีน-20 ที่ใช้เป็นตัวเชื่อมประสานว่าสามารถก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยจะทำให้เกิดการแตกของเซลล์ได้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.5 [33] อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เลือกใช้สารทวีน-20 ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เกิดการละลายของสารได้ คิดเป็นความเข้มข้นร้อยละ 10 ของสารละลายที่เตรียมได้ ซึ่งถือเป็นความเข้มข้นที่ค่อนข้างสูง และอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรหาตัวเชื่อมประสานชนิดอื่นที่มีความเหมาะสมมากกว่ามาใช้ทดแทน หรืออาจใช้ร่วมกันมากกว่า 1 ชนิด เช่น คำแนะนำของมอสตาฟา (Mostafa) และคณะ (2011) [34] ได้เสนอให้ใช้สารสแปน (Span) ร่วมกับทวีน (Tween) เพื่อทำให้สารละลายมีความเสถียรมากขึ้น โดยพิจารณาจากค่าสมดุลไฮโดรไฟล์-ไลโปไฟล์ (hydrophile-lipophile balance, HLB) ที่มีความใกล้เคียงกับระบบสารที่ต้องการจะเตรียมมากที่สุด

หลังจากเตรียมสารละลายชนิดต่าง ๆ เพื่อใช้สำหรับการทดลองเรียบร้อยแล้ว ก่อนนำไปทดลองจะต้องมีการทำให้สารปราศจากเชื้อ เพื่อให้แน่ใจว่าในการทดลองจะไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่น ๆ ซึ่งการศึกษานี้ได้ทดลองวิธีการทำให้ปลอดเชื้อโดยวิธีต่าง ๆ โดยพบว่าสารละลายกลุ่มที่นำไปเข้าหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) มีการแยกชั้นของสารละลายเกิดขึ้น และกลุ่มที่นำไปเข้าตู้อบความร้อนอุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส จะเกิดการเดือดของสารละลาย และสารระเหยออกจากหลอดทดลองไปจนหมด ส่วนกลุ่มที่ผสมด้วยเครื่องโซนิค (sonication) แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร และกลุ่มที่ผ่านการสั่นด้วยเครื่องโซนิคเพียงอย่างเดียว พบว่าสารละลายยังคงสภาพเป็นเนื้อเดียวกัน และเมื่อนำไปทดสอบความปราศจากเชื้อพบว่าไม่มีโคโลนีของเชื้ออื่น ๆ เกิดขึ้น ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้วิธีการทำให้สารปลอดเชื้อโดยผ่านการสั่นด้วยเครื่องโซนิคเพียงอย่างเดียว ซึ่งเมื่อนำสารละลายที่ผ่านกระการทำให้ปลอดเชื้อแล้ว ทั้งแบบที่ผ่านและไม่ผ่านกระดาษกรอง มาทดสอบประสิทธิภาพในการกาจัดราแคนดิดาอัลบิแคนส์ทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อยา พบว่าสาร

ละลายทั้ง 2 กลุ่ม นี้สามารถฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตรเท่ากัน แต่ที่ระดับความเข้มข้น 10^3 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร สารทั้ง 2 กลุ่ม ก็สามารถกำจัดเชื้อได้บางส่วน โดยกลุ่มที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองจะพบมีจำนวนโคโลนีของเชื้อเจริญขึ้นมากกว่ากลุ่มที่ผ่านการสั่นด้วยเครื่องโซนิคเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าอนุภาคบางส่วนของโมโนกลีเซอไรด์อาจมีขนาดใหญ่ จึงไม่สามารถผ่านกระดาษกรองออกมา ซึ่งมีการศึกษาของ Hetal และคณะ (2012) ที่กล่าวถึงขนาดอนุภาคของโมโนกลีเซอร์ไรด์ว่ามีขนาดมากกว่า 10 ไมโครเมตร [35] และเป็นขนาดที่ใหญ่กว่ารูกระดาษกรองที่ใช้ในการศึกษานี้ จึงเป็นไปได้ว่าวิธีการทำให้สารละลายปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร นั้นอาจทำให้อนุภาคบางส่วนของโมโนกลีเซอไรด์ถูกแยกออกไป ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อลดลง อย่างไรก็ตาม หากอนุภาคของโมโนกลีเซอไรด์ไม่สามารถผ่านช่องรูของกระดาษกรองได้เลย ควรจะมีส่วนของสารเหลือค้างบนกระดาษกรอง ซึ่งจากการสังเกตการพบว่าเกิดมีชั้นฟิล์มบาง ๆ เคลือบที่ผิวหน้าของกระดาษกรองเหลืออยู่ นอกจากนี้หลักการทำงานของเครื่องโซนิคที่ใช้ในการผสมจะทำให้เกิดการแตกของเซลล์ได้จากการทำให้อนุภาคสั่นสะเทือนด้วยความถี่สูง จึงอาจกล่าวได้ว่าการนำสารละลายที่เตรียมได้มาผสมด้วยวิธีการสั่นแบบโซนิคเพียงอย่างเดียวนั้นก็สามารถทำให้ปราศจากเชื้อและเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเตรียมสารละลายโมโนกลีเซอไรด์นี้

สำหรับผลการทดสอบความสามารถในการกำจัดราแคนดิดา อัลบิแคนส์ของสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ การศึกษานี้ได้ทดลองเตรียมสารละลายโมโนกลีเซอร์ไรด์ที่หลายความเข้มข้น โดยมีสารทวีน-20 เป็นตัวเชื่อมประสานในสัดส่วนเท่ากันที่ร้อยละ 10 และพบว่าสารละลายที่เตรียมได้มีเฉพาะความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 40 เท่านั้น ที่สามารถรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกันและไม่กลับมาแยกชั้นเมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นเวลานาน โดยหากตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 วัน ในกลุ่มที่มีระดับความเข้มข้นของสารสกัดสูงมากขึ้น สารละลายจะเกิดการแยกตัวเป็นชั้นน้ำและชั้นน้ำมัน ไม่สามารถนำไปทดสอบ ซึ่งในขั้นตอนการทดลองประสิทธิภาพการฆ่ารานั้น ผู้วิจัยได้ผสมสารละลายที่เตรียมไว้ที่ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมทดลองแบบ 96 หลุม แล้วผสมร่วมกับสารละลายราอีก 20 ไมโครลิตร ดังนั้นจึงคำนวณได้ความเข้มข้นสุดท้ายของโมโนกลีเซอไรด์เป็นร้อยละ 18 และ 36 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดสอบปรากฏว่าสารสกัดโมโนกลีเซอร์ไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 18 สามารถกำจัดราแคนดิดา อัลบิแคนส์ ทั้งสายพันธุ์ดื้อต่อยาและสายพันธุ์ไวต่อยาได้ที่ระดับความเข้มข้นเชื้อ 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร เท่ากัน แต่ลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นต่างกัน กล่าวคือ ในสายพันธุ์ที่ไวต่อยาโคโลนีที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็กและมีจำนวนน้อยกว่า ขณะที่สายพันธุ์ดื้อต่อยาลักษณะโคโลนีกลับมีขนาดใหญ่และมีจำนวนมากกว่า ในทำนองเดียวกันผลของสารสกัดโมโนกลีเซอร์ไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 36 จะพบว่าสามารถกำจัดราแคนดิดา อัลบิแคนส์ ทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้ที่ระดับความเข้นข้นรา 10^3 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร โดยลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นต่างกันดังที่กล่าวไปแล้ว ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโมโนกลีเซอไรด์ ผลทดสอบมีแนวโน้มทำให้เกิดการทำลายเชื้อได้มากขึ้น โคโลนีมีขนาดเล็กลงและจำนวนน้อยลง ผลการทดลองนี้จึงอาจกล่าวได้ว่าเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโมโนกลีเซอร์ไรด์ให้สูงขึ้น จะส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดราแคนดิดาได้เพิ่มขึ้นด้วย

การทดสอบความสามารถในการกำจัดราแคนดิดา อัลบิแคนส์ ของสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ เปรียบเทียบกับสารทดสอบกลุ่ม

อื่น ๆ ได้แก่ น้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ และยาต้านราฟลูโคนาโซล โดยใช้วิธีบรอทไมโครไดลูชั่น (broth microdilution plate) และนำรามาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเจลเอสดีเอ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ ซึ่งผลการทดลองจากการศึกษานี้พบว่าสารสกัดโมโนกลีเซอร์ไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ความเข้มข้นร้อยละ 36 สามารถกำจัดราแคนดิดาสายพันธุ์ไวต่อยาและดื้อต่อยาได้ที่ระดับความเข้มข้นเชื้อ 10^3 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร โดยลักษณะโคโลนีของเชื้อจากแต่ละสายพันธุ์จะมีความแตกต่างกันเช่นเดียวกับผลจากการทดลองก่อนหน้า นอกจากนี้เมื่อทดลองเปรียบเทียบกับสารสกัดโมโนกลีเซอร์ไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ความเข้มข้นร้อยละ 36 ที่เตรียมไว้เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ก่อนนำมาทดลอง พบว่ากำจัดเชื้อได้ลดลงที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อที่ 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่โมโนกลีเซอไรด์ที่นำมาทดสอบนั้นเมื่อเตรียมไว้เป็นระยะเวลานานจะมีการเสื่อมประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ ซึ่งได้เคยกล่าวไว้ในการศึกษาของ Wang และคณะ (1993) ที่รายงานเกี่ยวกับสมบัติของโมโนกลีเซอร์ไรด์ที่สกัดออกมาว่ามีอายุการใช้งานได้ประมาณ 2-4 สัปดาห์ โดยประสิทธิภาพจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป [26] Marina และคณะ (2009) [18] ได้ศึกษาส่วนประกอบในน้ำมันมะพร้าว พบว่าน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์เป็นน้ำมันจากพืชชนิดเดียวที่มีปริมาณกรดลอริกสูง โดยมีสัดส่วนของกรดลอริกมากที่สุดถึงร้อยละ 46-48 และในการศึกษาล่าสุดได้ย่อยสลายน้ำมันมะพร้าวด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากราแคนดิดา รูโกซา (*Candida rugosa* lipase) แสดงให้เห็นว่ากรดลอริกเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ที่พบได้สูงถึงร้อยละ 48.4-52.8 [29] ทั้งนี้มีหลักฐานทางวิชาการที่พบว่ากรดลอริกสามารถฆ่าและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งราแคนดิดาอัลบิแคนส์ [18] ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้นำน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ที่เป็นสารตั้งต้นของโมโนกลีเซอร์ไรด์มาทดลองเปรียบเทียบผลนี้ด้วย สำหรับน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์จะใช้วิธีการเตรียมสารละลายเช่นเดียวกับการเตรียมสารสกัดโมโนกลีเซอร์ไรด์ โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่เตรียมเท่ากัน คือ ร้อยละ 40 และในขั้นตอนการทดลองก็ได้ทำเช่นเดียวกัน คือ เตรียมสารละลายน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ที่ปริมาตร 180 ไมโครลิตร แล้วใส่สารลงในแต่ละหลุมทดลองแบบ 96 หลุม และผสมร่วมกับสารละลายรา 20 ไมโครลิตร ทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันมะพร้าวเป็นร้อยละ 36 และใช้สารสารทวีน-20 ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้ออาพีเอมไอเป็นตัวทำละลายเช่นเดียวกับกลุ่มการทดลองอื่น ๆ ซึ่งผลการทดลองพบว่าน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ความเข้มข้นร้อยละ 36 ไม่สามารถกำจัดราแคนดิดาทั้ง 2 สายพันธุ์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารออกฤทธิ์ คือ กรดลอริกที่มีอยู่ในน้ำมันมะพร้าวนั้นอยู่ในรูปของไตรกลีเซอร์ไรด์ ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการย่อยสลาย ซึ่งสัมพันธ์กับการศึกษาของ Lieberman และคณะ (2006) ที่พบว่าสมบัติในการต้านจุลชีพ ไวรัส และรา จะมีอยู่เฉพาะในกรดไขมันและโมโนกลีเซอไรด์เท่านั้น ส่วนไดกลีเซอไรด์และไตรกลีเซอไรด์จะไม่มีสมบัติดังกล่าว [11] ซึ่งมีผลคล้ายคลึงกับการทดลองที่ศึกษาผลของน้ำมันมะพร้าวทั่วไปและน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ที่เปรียบเทียบกับสารสกัดโมโนลอริน โดยพบว่าน้ำมันมะพร้าวทั้ง 2 ชนิด ไม่มีความสามารถกำจัดแบคทีเรียสแตปฟิโลคอคคัส ออเรียส แต่อย่างใด [23] ดังนั้นเมื่อทดลองโดยใช้น้ำมันมะพร้าวที่อยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์จึงไม่พบความสามารถในการกำจัดเชื้อเกิดขึ้น แต่เมื่อผ่านกระบวนการแปลงรูปให้เป็นโมโนกลีเซอไรด์แล้วจึงมีความสามารถกำจัดเชื้อ

ส่วนของการเตรียมสารละลายยาต้านราฟลูโคนาโซลความเข้มข้น 8 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผู้วิจัยได้เลือกความเข้มข้นดังกล่าวเพื่อนำมาทดสอบ โดยอ้างอิงมาจากการทดลองหาค่าเอมไอซีของยาฟลูโคนาโซลที่มีต่อราแคนดิดา สายพันธุ์ ATCC 90028 (ไวต่อยา) และ ATCC 62342 (ดื้อต่อยา) โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (YEAST ONE with anidulafungin and Micafungin, SENSITITRE®) ซึ่งผลการทดลองพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของราที่ 10^3 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ราแคนดิดาสายพันธุ์ดื้อต่อยาและสายพันธุ์ไวต่อยามีค่าเอมไอซีของยาฟลูโคนาโซลอยู่ที่ 8 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อทดสอบความสามารถในการกำจัดราแคนดิดาทั้ง 2 สายพันธุ์ ผลการทดลองมีความสอดคล้องกับผลที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูปก่อนหน้า

6. สรุปผลการทดลอง

สารสกัดโมโนกลีเซอไรด์จากน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ความเข้มข้นร้อยละ 36 สามารถกำจัดราแคนดิดา อัลบิแคนส์ ได้ทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อยาฟลูโคนาโซล ที่ระดับความเข้มข้นของรา 10^3 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร เท่ากับการใช้ยาฟลูโคนาโซลซึ่งให้ผลสูงกว่าสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 18 และสารสกัดโมโนกลีเซอไรด์ที่เตรียมล่วงหน้า 3 สัปดาห์ ทั้งนี้ไม่พบความสามารถดังกล่าวในน้ำมันมะพร้าวกลั่นบริสุทธิ์ อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองภายในห้องปฏิบัติการของการศึกษานี้ใช้ราแคนดิดาอัลบิแคนส์ เพียง 2 สายพันธุ์ เท่านั้น คือ สายพันธุ์ไวต่อยาฟลูโคนาโซล (ATCC 90028) และสายพันธุ์ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล (ATCC 62342) ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐานจากบริษัทผู้ผลิตในต่างประเทศ ดังนั้นจึงควรมีการทดสอบเพิ่มเติมโดยใช้เชื้อสายพันธุ์อื่น ๆ ที่อาจมาจากการเก็บตัวอย่างที่ได้จากช่องปากผู้ป่วยจริงมาทดสอบ

7. References

[1] Pootong, A., Sam-angsri, J., Thongmalila, N., Khantisitiporn, O. and Cowawintawee wat, S., 2011, The effect of lemongrass volatile oil on pathogenic *Candida albicans*, Thammasat Int. J. Sci. Tech. 20(4): 293-301.

[2] Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Steingrims son, O. and Thormar, H., 2001, *In vitro* killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides, Antimicrob. Agents. Chemother. 45: 3209-3212.

[3] Wanasaengsakul, S., Khongkhawithun, P. And Tienthong, T., 2008, *In vitro* efficacy of polident in reducing *Candida* biofilm on surface of acrylic resin, J. Dent. Assoc. Thai. 178-188.

[4] Figueiral, M. H., Azul, A., Pinto, E. and Fonseca, P. A., 2007, Denture- related stomatitis: Identification of aetiological and predisposing factors – a large cohort, J. Oral. Rehabil. 34: 448-455.

[5] Barnabe, W., de Mendonca Neto, T., Pimenta, F.C., Pegoraro, L.F. and Scolaro, J. M., 2004, Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, S*treptococcus mutans* and *Candida albicans*, J. Oral. Rehabil. 31: 453-459.

[6] Salerno, C., Pascale, M., Contaldo, M., Esposito, V., Busciolano, M., Milillo, L., Guida, A., Petruzzi, M. and Serpico, R.,

2011, Candida- associated denture stomatitis, Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal. 16(2): e139-143.

[7] Webb, B.C., Thomas, C.J., Willcox, M.D., Harty, D.W. and Knox, K.W., 1998, Candida-associated denture stomatitis, Aetiology and management: A review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity, Aust. Dent. J. 43: 45-50.

[8] Nikawa, H., Hamada, T. and Yamamoto, T., 1998, Denture plaque past and recent concerns, J. Dent. 26: 299-304.

[9] Cannon, R.D. and Chaffin, W.L., 1999, Oral colonization by *Candida albicans*, Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 10: 359-383.

[10] Webb, B.C., Thomas, C.J., Willcox, M.D., Harty, D.W. and Knox, K.W., 1998, Candida-associated denture stomatitis, Aetiology and management: A review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida* species, Aust. Dent. J. 43: 160-166.

[11] Lieberman, S., Enig, M.G. and Preuss, H.G., 2006, A Review of monolaurin and lauric acid: Natural virucidal and bactericidal agents, Alter. Com. Therapi. 12: 310-314.

[12] Pappas, P.G., Rex, J.H., Sobel, J.D., Filler, S.G., Dismukes, W.E., Walsh, T.J. and , Edwards, J.E. , 2004, Guidelines for treatment of candidiasis, Clin. Infect. Dis. 38: 161-189.

[13] Barchiesi, F., Maracci, M., Radi, B., Arzeni, D. , Baldassarri, I. , Giacometti, A. and Scalise, G., 2002, Point prevalence, microbiology and fluconazole suscepti bility patterns of yeast isolates colonizing the oral cavities of HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy, J. Antimicrob. Chemother. 50: 999-1002.

[14] Boken, D.J., Swindells, S. and Rinaldi, M.G., 1993, Fluconazole- resistant Candida albicans, Clin. Infect. Dis. 17: 1018-1021.

[15] Fabian, M.D., Olivia Erin, M.B., Edward, T.C. and Ian, M. S. V. , 2007, Standards for Essential composition and quality factors of commercial virgin coconut oil and its differentiation from RBD coconut oil and copra oil, Philip. J. Sci. 136: 119-129.

[16] Patil, U. and Benjakul, S., 2018, Coconut milk and coconut oil: Their manufacture associated with protein functionality, J. Food. Sci. 83: 2019-2027.

[17] Sankararaman, S. and Sferra, T.J., 2018, Are we going nuts on coconut oil?, Curr. Nutr. Rep. 7: 107-115.

[18] Marina, A.M., Che Man, Y.B. and Aminb, I., 2009, Virgin coconut oil: Emerging functional food oil, Trends Food. Sci. Tech. 20: 481-487.

[19] Ghani, N.A.A., Channip, A.A., Chok Hwee Hwa, P., Ja'afar, F., Yasin, H.M., Usman, A., 2018, Physicochemical properties, antioxidant capacities, and metal contents of virgin coconut oil produced by wet and dry processes, Food. Sci. Nutr.

6: 1298-1306.

[20] Řihakova, Z., Filip, V., Plockova, M., Šmidrkal, J. and Červenkova, R., 2002, Inhibition of *Aspergillus niger* DMF 0801 by monoacylglycerols prepared from coconut oil, Czech. J. Food. Sci. 20: 48-52.

[21] Nguyen, V.T.A., Le, T.D., Phan, H.N. and Tran, L.B., 2017, Antibacterial activity of free fatty acids from hydrolyzed virgin coconut oil using lipase from *Candida rugosa*, J. Lipids. 2017: 7170162.

[22] Kabara, J.J., Swieczkowski, D.M., Conley, A.J. and Truant, J.P., 1972, Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents, Antimicrob. Agents. Chemother. 2: 23-28.

[23] Manohar, V., Echard, B., Perricone, N., Ingram, C., Enig, M., Bagchi, D. and Preuss, H.G., 2013, *In vitro* and *in vivo* effects of two coconut oils in comparison to monolaurin on *Staphylococcus aureus*: Rodent studies, J. Med. Food. 16: 499-503.

[24] Seleem, D., Chen, E., Benso, B., Pardi, V. and Murata, R.M., 2016, *In vitro* evaluation of antifungal activity of monolaurin against *Candida albicans* biofilms, Peer J. 4: e2148.

[25] Batovska, D.I., Todorova, I.T., Tsvetkova, I. V. and Najdenski, H. M., 2009, Antibacterial study of the medium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: individual effects and synergistic relationships, Pol. J. Microbiol. 58: 43-47.

[26] Wang, L.Y.B., Parkin, K. and Johnson, E., 1993, Inhibition of *Listeria monocyto genes* by monoacylglycerols synthesized from coconut oil and milkfat by lipase-catalyzed glycerolysis, J. Agric. Food. Chem. 41: 1000-1005.

[27] Thakur, N., Garg, G., Sharma, P.K. and Kumar, N., 2012, Nanoemulsions: A review on various pharmaceutical application, Global. J. Pharm. 6: 222-225.

[28] Hamosh, M., Klaeveman, H.L., Wolf, R.O. and Scow, R.O., 1975, Pharyngeal lipase and digestion of dietary triglyceride in man, J. Clin. Invest. 55: 908-913.

[29] Nguyen, T.A.V., Le, T.D., Phan, H.N. and Tran, L.B., 2018, Hydrolysis activity of virgin coconut oil using lipase from different sources, Scientifica. (Cairo) 14: 1-6 .

[30] Wang, D., Wang, J., Wang, B. and Yu, H., 2012, A new and efficient colorimetric high- throughput screening method for triacylglycerol lipase directed evolution, J. Mole. Cat. B: Enz. 82: 18-23.

[31] Hornung, B., Amtmann, E. and Sauer, G., 1994, Lauric acid inhibits the maturation of vesicular stomatitis virus, J. Gen. Virol. 75: 353-361.

[32] Projan, S.J., Brown-Skrobot, S., Schlievert, P.M., Vandenesch, F. and Novick, R.P., 1994, Glycerol monolaurate inhibits the production of beta-lactamase, toxic shock toxin-1, and other staphylococcal exopro teins by interfering with signal transduc

tion, J. Bacteriol. 176: 4204-4209.

[33] Eskandani, M., Hamishehkar, H. and Ezzati Nazhad Dolatabadi, J., 2013, Cyto/ Genotoxicity study of polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (tween 20), J. DNA. Cell. Biol. 32: 498-503.

[34] Mostafa, S., Seham, A.H., Mohammed, H. and Nahed, M., 2011, Development of stable o/w emulsions of three different oils, Int. J. Pharm. Stud. Res. 2(3): 45-51.

[35] Prajapati, H. N., Dalrymple, D. M. and Serajuddin, A. T., 2012, A comparative evaluation of mono-, di- and triglyceride of medium chain fatty acids by lipid/ surfactant/ water phase diagram, solubility determination and dispersion testing for application in pharmaceutical dosage form development, Pharm. Res. 29: 285-305.