

ฤทธิ์ของน้ำมันมะพร้าวต่อการยับยั้งเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ ในห้องปฏิบัติการ

เพียงโสภณ ห่วงญาติ น.บ.*, รัศมี เกศสุวรรณรักษ์ น.บ., ว.ท.*,
ปฐมาพร ปรีชากกร ภ.บ., ภ.ม., ประ.ด.**

*สถาบันทันตกรรม ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

**สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

Antifungal Activities of Coconut Oil on *C. albicans* in Vitro

Piangsopin Huangyart, D.D.S.*,

Rassami Kessuwanrak, D.D.S., Dip.Thai Board of General Dentistry*,

Patamaporn Pruksakorn, B Pharm., M Pharm Sc., Ph.D.**

*Institute of Dentistry, Talad Khwan, Mueang, Nonthaburi, 11000, Thailand

**Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public
Health, Talad Khwan, Mueang, Nonthaburi, 11000, Thailand

(E-mail: piangsopin10@gmail.com)

(Received: 20 July, 2023; Revised: 19 September, 2023; Accepted: 3 January, 2024)

Abstract

Background: The elderly have changing physical and oral conditions that affect various oral diseases, including oral candidiasis. Antifungal resistance and adverse effects have been described, resulting in reduced therapeutic efficacy. **Objectives:** The purpose of this study was to examine the antifungal effect of coconut oil on *C. albicans* in Vitro **Methods:** Coconut oil used for evaluating the antifungal effect on *C. albicans* was measured using an agar well diffusion method and specific dyes in the detection of antifungal compounds from coconut oil using a thin layer chromatography agar overlay technique. The broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC), crystal violet assay was used to determine the influence of coconut oil on *C. albicans* biofilm development, and Time-kill measurements were done to assess the fungicidal kinetics by counting viable fungal after 0, 2, 4, and 6 hours, respectively. **Results:** Coconut oil had no antifungal effect in the study's agar well diffusion method, bioautography agar overlay assay, as well as the broth microdilution method. Nystatin's minimum inhibitory concentration (MIC) was discovered to be 0.12207 unit/ ml. The effect of coconut oil on *C. albicans* biofilm development found that coconut oil at concentrations of 0.3–3% v/v could reduce *C. albicans* biofilm formation by 20-40%, and the time kill study found that nystatin at a concentration of 80,000 units/mL could kill *C. albicans* by the second hour of the test, whereas coconut oil at 80 percent v/v, was not able to kill *C. albicans*. Moreover, the levels of *C. albicans* had risen. **Conclusion:** This study did not find that coconut oil can inhibit *C. albicans*. However, coconut oil was found that at a concentration of 0.3-3% v/v, it could reduce the biofilm formation of *C. albicans* by 20 to 40%.

Keywords: Antifungal, Coconut oil, *C. albicans*

บทคัดย่อ

ภูมิหลัง: ผู้สูงอายุมีสภาวะทางร่างกายและสภาวะช่องปากที่เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลต่อโรคต่าง ๆ ในช่องปาก เช่น การติดเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ โดยเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์มีความต้านทานต่อยาต้านเชื้อราและผลข้างเคียงจากการใช้ยาได้ทำให้ประสิทธิภาพของยาลดลงได้ **วัตถุประสงค์:** ศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันมะพร้าวต่อการยับยั้งเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในห้องปฏิบัติการ **วิธีการ:** ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์โดยวิธี agar well diffusion, bioautography agar overlay assay, broth microdilution assay, การยับยั้งสร้างไบโอฟิล์ม และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราต่อหน่วยเวลา (time-kill curve) เพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6 **ผล:** ฤทธิ์ของน้ำมันมะพร้าวต่อการยับยั้งเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ด้วยวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ agar well diffusion assay, bioautography agar overlay assay, และ broth microdilution assay พบว่าน้ำมันมะพร้าวในความเข้มข้นที่ได้ทำการศึกษามาไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้ พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (minimum inhibitory concentration; MIC) ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.12207 หน่วยต่อมิลลิกรัม และน้ำมันมะพร้าวที่ความเข้มข้น 0.33% v/v สามารถลดการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ ได้มากกว่า 20-40% อีกทั้งฤทธิ์น้ำมันมะพร้าวในการยับยั้งเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ต่อหน่วยเวลา (time kill assay) พบว่าน้ำมันมะพร้าวที่ความเข้มข้น 80% v/v ไม่สามารถยับยั้งเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้และทำให้เชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์มีการเพิ่มจำนวนขึ้น **สรุป:** การศึกษานี้ไม่พบว่าน้ำมันมะพร้าวจะสามารถยับยั้งเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้ แต่พบว่าน้ำมันมะพร้าวที่ความเข้มข้น 0.3-3% v/v สามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้ 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: ฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ, น้ำมันมะพร้าว, แคนดิดาอัลบิแคนส์

วนำ (Introduction)

ปี 2564 ประเทศไทยจะเข้าสู่ “สังคมสูงอายุอย่างสมบูรณ์” (complete aged society) หมายถึง สังคมที่มีประชากรอายุ 60 ปีขึ้นไป มากกว่าร้อยละ 20 ของประชากรทั้งหมด จากการสำรวจสภาวะสุขภาพช่องปากแห่งชาติ ครั้งที่ 8 ประเทศไทย จากกลุ่มตัวอย่างอายุ 60

ปีขึ้นไป พบว่ามีความชุกของปากอักเสบเหตุฟันเทียมในผู้ใส่ฟันเทียมบางส่วนถอดได้ร้อยละ 16.6, ฟันเทียมทั้งปากร้อยละ 10.5 และ oral candidiasis ร้อยละ 0.6 ตามลำดับ oral candidiasis เป็นการติดเชื้อฉวยโอกาสที่พบบ่อยในช่องปากอันมีสาเหตุมาจากการเจริญของเชื้อ *Candida spp.* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *C. albicans* ซึ่งมักพบถึงร้อยละ 50 ของผู้ป่วยที่เป็น oral candidiasis¹ ผู้สูงอายุที่ใส่ฟันเทียมและภาวะภูมิคุ้มกันที่ลดลงล้วนเป็นปัจจัยส่งเสริมการติดเชื้อราได้ *Candida spp.* มีความสามารถในการเกาะติดกับพื้นผิวของวัสดุเทียม² ซึ่งความหลากหลายของพื้นผิวเทียมและพื้นผิวธรรมชาติ เช่น ฟัน, ฟันที่ได้รับการอุดมา, ฟันเทียม ที่พบในช่องปากอาจเป็นแหล่งกักเก็บเชื้อ และเป็นที่มาของการติดเชื้อถ้าไม่ได้รับการทำความสะอาดอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ^{2, 3} และเชื้อสามารถก่อตัวบนพื้นผิวเหล่านี้ได้อย่างรวดเร็ว และก่อตัวเป็นแผ่นชีวภาพเชื้อราแบคทีเรีย (candida-bacterial biofilm) ที่ซับซ้อน มีพันธูกรรมที่ต้านทานต่อการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ⁴⁻⁶ มีการศึกษาพบว่า free fatty acid เช่น medium-chain fatty acids (MCFA) ที่พบบ่อยและเป็นส่วนประกอบของน้ำมันมะพร้าว มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตต่อ *Staphylococcus aureus*^{7, 8} ยังมีการศึกษาที่รายงานที่พบเช่นเดียวกันว่า medium-chain fatty acids (MCFA) มีฤทธิ์ต้านเชื้อกลุ่ม A streptococci, กลุ่ม B streptococci, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhea*, *Chlamydia trachomatis*, และ *C. albicans*.^{9, 10} และมีการศึกษาในห้องปฏิบัติการความไวของน้ำมันมะพร้าว ต่อ *Candida* หลายสายพันธุ์¹¹ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของน้ำมันมะพร้าวต่อการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ในห้องปฏิบัติการ

วัตถุและวิธีการ (Materials and Methods)^{12, 13}

เชื้อราที่ใช้ในการศึกษาคือ *C. albicans* DMST 5815 ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ผ่านคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย สถาบันทันตกรรม กรมการแพทย์ 9 เมษายน 2564 นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร sabouraud dextrose agar (SDA) ที่ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนอาหารใหม่อย่างน้อยทุกสัปดาห์ ตัวอย่าง

ทดสอบ คือ น้ำมันมะพร้าวธรรมชาติ (จีพีโอ โคโค ดีไลท์) ผลิตโดยองค์การเกษตรกรรม ใช้ Nystatin ชนิดน้ำแขวนตะกอน ความเข้มข้น 100,000 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ทิสตาติน) ผลิตโดยบริษัท ที. โอ. ฟาร์มา จำกัด เป็นตัวอย่างควบคุมเชิงบวก (positive control) และใช้ไดเมทิลซัลโฟไซด์ (DMSO, Sigma) เป็นตัวทำละลายสำหรับเชื้อจากสารทดสอบการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อ *C. albicans* โดยวิธี agar well diffusion method ทดสอบใช้อาหารแข็ง sabouraud dextrose agar นำมาเจาะรูลงบนอาหารแข็ง โดยใช้ sterile cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร โดยใช้ sterile cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ทำการกระจายเชื้อราสำหรับทดสอบลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงด้วย sterile cotton swab จากนั้นใส่ตัวอย่างทดสอบลงในแต่ละหลุมปริมาณหลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยตัวอย่างทดสอบประกอบด้วย น้ำมันมะพร้าวธรรมชาติ, น้ำมันมะพร้าวผสมกับ DMSO สัดส่วน 1:1, ไดเมทิลซัลโฟไซด์ และ nystatin ชนิดน้ำแขวนตะกอน นำจานเพาะเชื้อไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-5 วัน และอ่านผลการทดสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นด้วย vernier caliper ทำการทดลองซ้ำสามครั้ง และรายงานเป็นค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสในหน่วยมิลลิเมตร **การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี bioautography agar overlay assay** ดังนี้

- 1) การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของน้ำมันมะพร้าวบน thin-layer chromatography (TLC) นำน้ำมันมะพร้าวปริมาณ 3 ไมโครลิตร มาจุด (spot) ลงบนแผ่น TLC โดยให้น้ำมันมะพร้าวเป็นจุดเดียว นำแผ่น TLC ที่เตรียมได้ใส่ลงในภาชนะปิดที่อิมมัตด้วยส่วนผสมของตัวทำละลายอินทรีย์ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับแยกสาร เมื่อตัวทำละลายนำพาสารสกัดตัวอย่างเคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC จนกระทั่งตัวทำละลายเกือบถึงส่วนบนสุดของแผ่น TLC แล้ว นำแผ่น TLC ออกจากภาชนะและทำให้แห้ง ทำการบันทึกของสารมีสีและสารไม่มีสีที่มองเห็นได้ภายใต้แสง UV โดยใช้ดินสอทำเครื่องหมายลงบนแผ่น TLC โดยตรงจากนั้นนำแผ่น TLC ที่เตรียมได้ไปใช้สำหรับการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ต้าน *C. albicans* โดยวิธี bioautography agar overlay assay
- 2) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี bioautography agar overlay assay เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด SDB 200 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปราศจากเชื้อโดย autoclave ปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้เย็นลงจนกระทั่ง

อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสแล้วเติมเชื้อ *C. albicans* ที่อยู่ในระยะ late-log phase 500 ไมโครลิตร ผสมเชื้อให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างสม่ำเสมอโดยการเขย่าเบา ๆ แล้วเทลงบนเพลทปราศจากเชื้อที่วางแผ่น TLC ไว้ให้เย็น มีความหนาที่แผ่น TLC ประมาณ 0.3 มิลลิเมตร นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นฉีดพ่นสารละลาย 0.25 % MTT ลงบนแผ่นนั้นให้ทั่ว แล้วนำไปบ่มเลี้ยงต่อที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ตำแหน่งที่มีสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* อยู่บน TLC จะปรากฏเป็นวงไม่มีสีบนพื้นสีม่วง **การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยวิธี broth microdilution assay** การทดสอบใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการตาม National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) guideline โดยเตรียมสารทดสอบ น้ำมันมะพร้าวในอาหาร RPMI-MOPS (RPMI 1640 medium, without sodium bicarbonate ที่มีส่วนประกอบของ 2 mM L- glutamine และ 165 mM morpholinepropanesulfonic acid (MOPS)) ให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของความเข้มข้นที่ต้องการศึกษาเตรียมเป็น two-fold serial dilution ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใน 96-well culture plate ชนิด flat bottom ทำการทดสอบตัวอย่างทดสอบน้ำมันมะพร้าว 3 ซ้ำ ใช้ nystatin สำหรับ positive control และใช้ DMSO สำหรับ negative control จากนั้นนำเชื้อ *C. albicans* ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (มีความหนาแน่นของเชื้อ $1-5 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) มาเจือจางเชื้ออีกครั้งด้วยอาหาร RPMI-MOPS ในอัตราส่วน 1:500 แล้วใส่เชื้อที่เตรียมได้ดังกล่าวปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม บ่มเพาะเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากครบกำหนดการบ่มเลี้ยงอ่านผลการทดสอบโดยดูความขุ่นเป็นตัวบ่งชี้การเจริญของเชื้อรา ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ตัดสินจากความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อราในหลุม **การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งสร้างไบโอฟิล์มเชื้อ *C. albicans* ทดสอบโดยการเตรียมเชื้อ *C. albicans* ในอาหาร RPMI-MOPS (RPMI 1640 medium, without sodium bicarbonate ที่มีส่วนประกอบของ 2 mM L- glutamine และ 165 mM morpholine propanesulfonic acid (MOPS)) ให้มีความขุ่นเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร เท่ากับ 0.38 สำหรับใช้ในการทดสอบ จากนั้นใช้เชื้อสำหรับการทดสอบปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของ**

24-well culture plate แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้าง *C. albicans* ที่ไม่เกาะออกด้วย phosphate buffered saline (PBS) 2 ครั้ง แล้วเติมอาหาร RPMI-MOPS ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลุม แล้วเติมตัวอย่างทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในแต่ละหลุม โดยทำการทดสอบตัวอย่างทดสอบทั้งหมดความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังครบกำหนดการเพาะเลี้ยง ล้างไปโอฟิล์ม 3 ครั้งด้วย PBS ตีด้วย absolute methanol นาน 10 นาที และย้อมไปโอฟิล์ม ด้วย 1% crystal violet นาน 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง ทิ้งให้แห้ง แล้วเติม DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อละลายไปโอฟิล์มที่ย้อมติดสี ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง microplate reader แล้วนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไปโอฟิล์มจากสมการ % inhibition = ((control- test)/ control) x 100

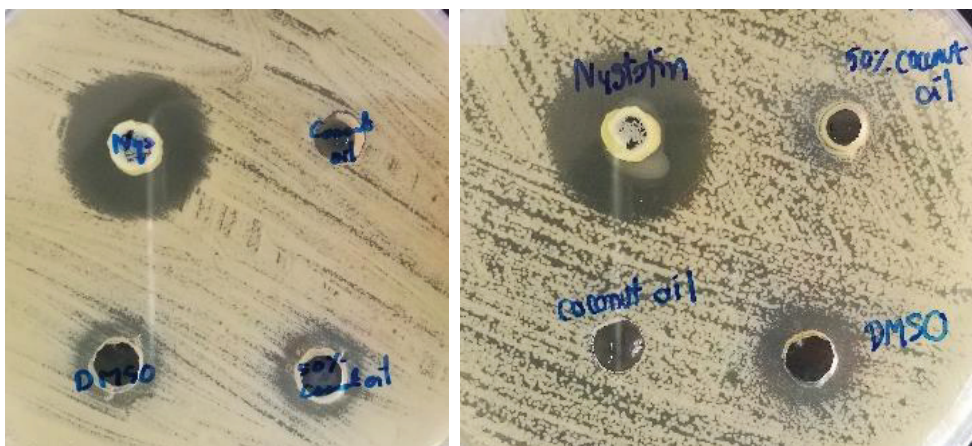
การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อหน่วยเวลา (time-kill curve) การทดสอบ time-kill curve ของตัวอย่างทดสอบทำโดยเตรียมเชื้อราใน 0.85% sodium chloride (NaCl) ให้มีความขุ่นเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 สำหรับใช้ใน

การทดสอบ จากนั้นใช้เชื้อสำหรับการทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ใน sterile plastic tube ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วเติมตัวอย่างทดสอบปริมาตร 4 มิลลิลิตรลงไป แล้วบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นการเก็บตัวอย่างเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 0, 2, 4 และ 6 นำตัวอย่างเพาะเลี้ยงที่เก็บได้มา spread ลงบนอาหาร SDA บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและจำนวนเชื้อที่ลดลง

ผล (Results)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อ *C. albicans* โดยวิธี agar well diffusion

การทดสอบไม่พบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารทดสอบ และเมื่อใช้น้ำมันมะพร้าวผสมกับ DMSO ที่สัดส่วน 1:1 (50% coconut oil) พบ clear zone ขนาด 12-14 มิลลิเมตร ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของ clear zone จากทดสอบด้วย DMSO ที่มี clear zone ขนาด 14-16 มิลลิเมตร และเมื่อใช้ nystatin ชนิดน้ำแขวนตะกอนเป็นสารทดสอบพบว่ามียูฤทธิ์ในการต้านเชื้อราโดยพบ clear zone ขนาด 20-32 มิลลิเมตร (รูปที่ 1) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสของตัวอย่างทดสอบแสดงในตารางที่ 1



รูปที่ 1 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ด้วยวิธี agar well diffusion (A) Nystatin เพื่อเป็นกลุ่มควบคุมบวก, (B) น้ำมันมะพร้าวใน DMSO ความเข้มข้น 50% v/v, (C) DMSO, (D) น้ำมันมะพร้าวธรรมชาติ 100%

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ของสารทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยวิธี agar well diffusion method

เชื้อทดสอบ	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (มิลลิเมตร)*											
	Coconut oil 100%			Coconut oil 50% v/v			Nystatin			DMSO		
<i>C.albicanss</i>	NZ	NZ	NZ	14	12	14	28	32	20	14	14	16

หมายเหตุ NZ หมายถึง ไม่มี inhibition zone
* รวมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหลุม (well) 8 มิลลิเมตร

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans*
โดยวิธี Bioautography agar overlay assay

นำน้ำมันมะพร้าว มาวิเคราะห์แยกองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง

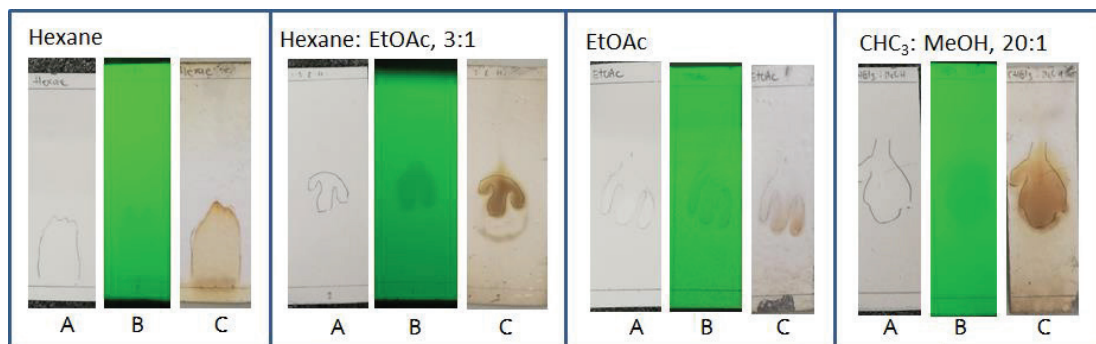
ตารางที่ 2 ชนิดของ mobile phase

ชนิดของ mobile phase	อัตราส่วน
Hexane	-
Hexane: Ethyl acetate	3:1
Ethyl acetate	-
Chloroform: Methanol	20:1

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันมะพร้าว บน thin-layer chromatography (TLC) โดยใช้วัฏภาค

(thin layer chromatography, TLC) วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เลือกใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันมะพร้าว แสดงดังตารางที่ 2

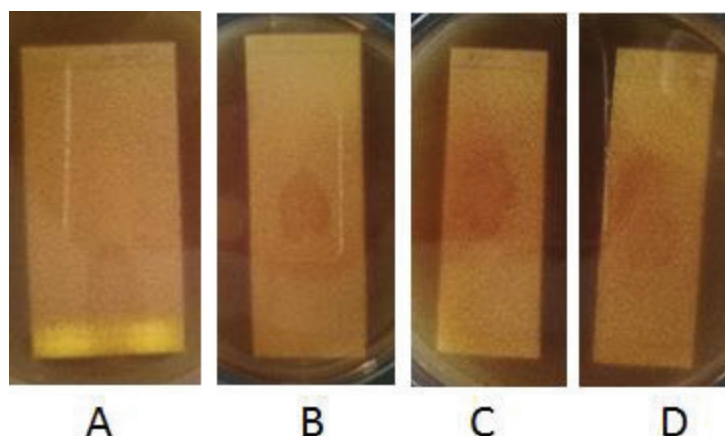
เคลื่อนที่ชนิดต่าง ๆ แสดงผล ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงรูปแบบบน TLC ของน้ำมันมะพร้าวเมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดต่าง ๆ (A) ดูด้วยตาเปล่า, (B) ส่องภายใต้แสง UV 254 nm และ (C) ย้อมด้วย Cerium (IV) sulfate ($Ce(SO_4)_2$) และให้ความร้อน

เมื่อนำแผ่น TLC มาวิเคราะห์การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี thin-layer chromatography (TLC) bioautography agar overlay assay พบว่า

น้ำมันมะพร้าวที่นำมาใช้ศึกษาไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* โดยไม่ปรากฏ clear zone บนแถบของน้ำมันมะพร้าวบนแผ่น TLC ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงผลของน้ำมันมะพร้าวในการต้านเชื้อรา *C. albicans* เมื่อทดสอบด้วยวิธี thin-layer chromatography (TLC) bioautography agar overlay assay ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (A) Hexane, (B) Hexane: EtOAc, 3:1, (C) EtOAc และ (D) $CHCl_3$: MeOH, 20:1

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา

โดยวิธี broth microdilution assay

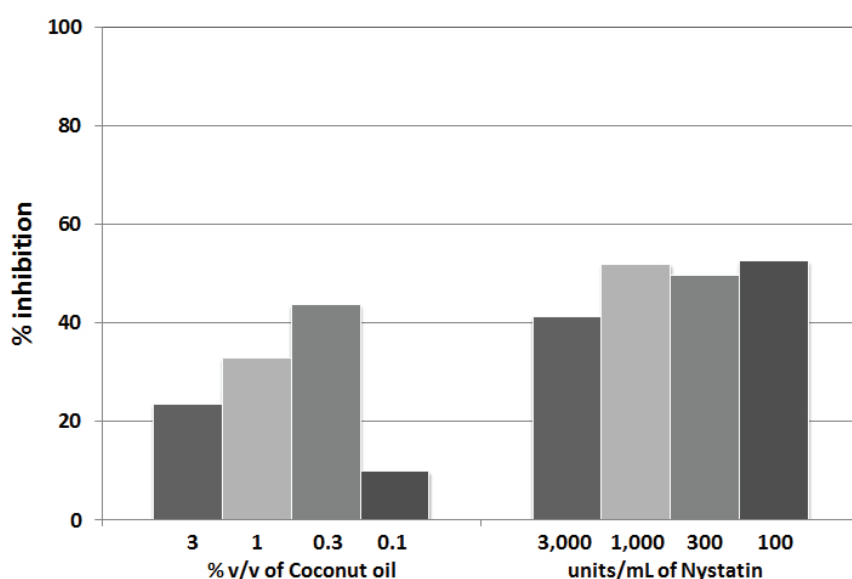
จากการทดลองพบว่าน้ำมันมะพร้าวที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการทดสอบ คือ 4% v/v ไม่มีฤทธิ์ด้านการเจริญของ *C. albicans* โดยพบความขุ่นซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การเจริญของเชื้อราในน้ำมันมะพร้าวทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษาใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ และเมื่อเทียบความขุ่นกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) ที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ nystatin พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* ได้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (minimum inhibitory concentration; MIC)

ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.12207 หน่วยต่อมิลลิลิตร

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง

สร้างไบโอฟิล์มเชื้อ *C. albicans*

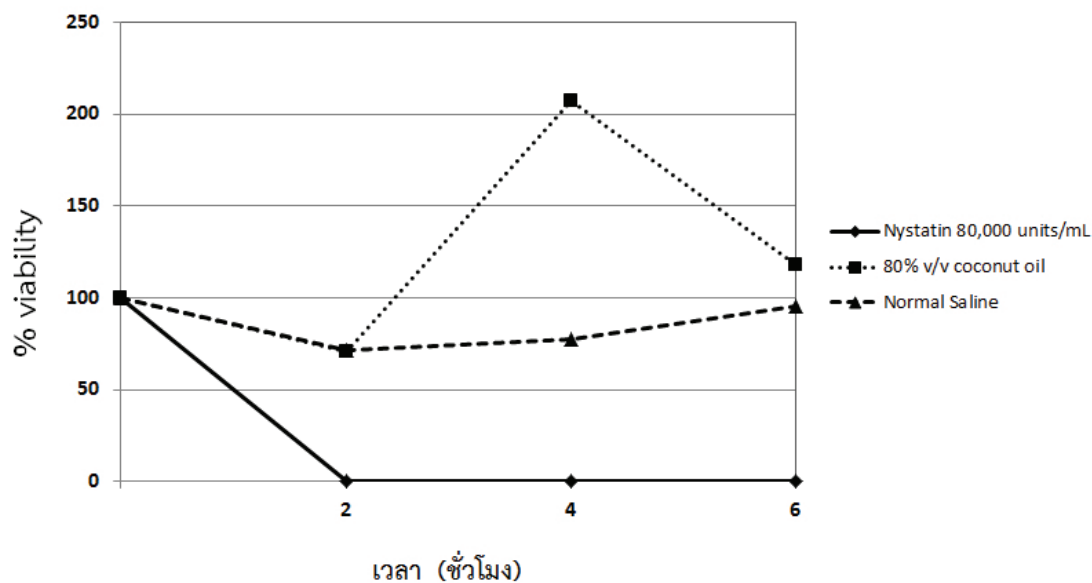
การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มของน้ำมันมะพร้าวและ nystatin พบว่าน้ำมันมะพร้าวที่ความเข้มข้น 0.3 – 3% v/v สามารถลดการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อรา *C. albicans* ได้มากกว่า 20% และ nystatin ที่ความเข้มข้น 100-1,000 units/mL สามารถลดการเกิดไบโอฟิล์มลงได้มากกว่า 50% ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (% inhibition)

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อหน่วยเวลา (time-kill curve) พบว่าน้ำมันมะพร้าวที่ความเข้มข้น 80% v/v ไม่สามารถฆ่าเชื้อ *C. albicans* ได้ และทำให้เชื้อ *C. albicans* มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ในขณะที่ nystatin ที่ความเข้มข้น

80,000 units/mL สามารถฆ่าเชื้อ *C. albicans* ได้ภายในชั่วโมงที่ 2 ของการทดสอบ และ normal saline ไม่ได้มีผลให้เชื้อเพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างชัดเจนในระยะเวลา 6 ชั่วโมงที่ทำการศึกษา ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงผล time-kill curve ของน้ำมันมะพร้าวและ nystatin

วิจารณ์ (Discussion)

น้ำมันมะพร้าวที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็นน้ำมันมะพร้าวธรรมชาติ 100% ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น oil ไม่สามารถละลายน้ำได้ ในขณะที่วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราจะมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลักในสภาวะที่ทำการทดสอบ โดยใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ คุณสมบัติการไม่ละลายน้ำของน้ำมันมะพร้าวนี้อาจส่งผลต่อการทดสอบ เนื่องจากน้ำมันไม่สามารถแพร่กระจายในน้ำได้จึงอาจไม่สามารถสัมผัสกับตัวเชื้อได้โดยตรง ดังนั้นตัวอย่างทดสอบน้ำมันมะพร้าวจึงเลือกใช้ทั้งแบบน้ำมันมะพร้าวธรรมชาติ 100% และน้ำมันมะพร้าวที่ผสมกับตัวพาเพื่อช่วยละลายคือ DMSO สัดส่วน 1:1 (50% v/v coconut oil in DMSO) นอกจากนี้ ใช้ nystatin ชนิดน้ำแขวนตะกอนและ DMSO เป็น positive control และ vehicle control ตามลำดับ เมื่อนำสารทดสอบมาศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อ *C. albicans* ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า น้ำมันมะพร้าวธรรมชาติ 100% ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. albicans* ซึ่งอาจจะเป็นเพราะน้ำมันมะพร้าวไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราหรือคุณสมบัติของการละลายของน้ำมันมะพร้าวบนอาหารเลี้ยงเชื้อจึงไม่พบวงใสเกิดขึ้นบริเวณที่ทดลอง เมื่อใช้สารทดสอบน้ำมันมะพร้าว ผสมตัวทำละลาย DMSO ความเข้มข้น 50% v/v พบ clear zone ขนาดเล็กบริเวณรอบหลุม และให้ผล clear zone ที่มีขนาดใกล้เคียงกับการทดสอบด้วย DMSO จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ที่เกิดขึ้นนี้เป็นผลมาจากตัวทำละลาย DMSO เพราะมีหลายการศึกษาที่พบว่า DMSO มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้^{14, 15}

เมื่อนำน้ำมันมะพร้าว มาวิเคราะห์แยกองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (thin-layer chromatography; TLC) และเลือกใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระบบตัวทำละลายต่าง ๆ เช่น เฮกเซน (Hexane), เอทิล อะซิเตท (EtOAc), เฮกเซน: เอทิลอะซิเตท (Hexane: EtOAc) อัตราส่วน 3:1, คลอโรฟอร์ม: เมทานอล (CHCl₃: MeOH) อัตราส่วน 20:1 พบว่ารูปแบบบน TLC ของน้ำมันมะพร้าวเมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ดังกล่าว มีลักษณะเป็นแถบใหญ่รวมกัน ไม่ได้เกิดแบนแยกสารออกจากกันอย่างชัดเจน ซึ่งต้องศึกษาหาวิธีการอื่นเพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมี โดยการศึกษานี้มีค่า Rf อยู่ระหว่าง 0.27-0.45 และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* ด้วยวิธี thin-layer chromatography (TLC) bioautography agar overlay assay พบว่า น้ำมันมะพร้าวในปริมาณที่ใช้ศึกษา (3 ไมโครลิตร) ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* โดยไม่พบ clear zone บนแถบของน้ำมันมะพร้าวบนแผ่น TLC เมื่อพ่น MTT ลงบนผิวหน้าอาหารแข็งที่เคลือบบนแผ่น TLC นอกจากนี้ ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* ด้วยวิธี Broth microdilution assay พบว่าน้ำมันมะพร้าวที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการทดสอบ คือ 4% v/v ไม่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. albicans* ในขณะที่ nystatin แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (minimum inhibitory concentration; MIC) ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.12207 หน่วยต่อมิลลิลิตร

การศึกษาผลของน้ำมันมะพร้าวในการยับยั้งสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* ทำการทดสอบใน 24-well

microtiter plate ชนิด flat bottom แทน 96-well microtiter culture plate ชนิด flat bottom เนื่องจากการทดสอบใน 24-well microtiter plate ชนิด flat bottom สามารถเห็นแผ่นไบโอฟิล์มเชื้อ *C. albicans* ได้ชัดเจนกว่า 96-well microtiter culture plate ชนิด flat bottom จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* ของน้ำมันมะพร้าวและ nystatin พบว่าสารทดสอบทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มได้ โดย nystatin มีค่า % inhibition ที่สูงกว่าน้ำมันมะพร้าวในความเข้มข้นที่ทำการศึกษามาก อย่างไรก็ตามจากการทดสอบนี้ยังไม่สามารถอธิบายได้ว่าน้ำมันมะพร้าวมีฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* ในขั้นตอนใด ซึ่งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* นั้นมีอยู่ 3 ระยะ คือ early phase คือระยะเริ่มแรกที่เชื้อ *C. albicans* ซึ่งมีลักษณะเป็น blastospores (yeast cell) ที่มีการยึดติดบนพื้นผิว เช่น เยื่อเมือกในช่องปาก, ฟันเทียม เป็นต้น จากนั้นเชื้อจะเจริญเติบโตเกิดเป็น microcolonies และเชื้อจะมีขนาดใหญ่และหนาขึ้น พื้นผิวไม่เรียบ ระยะต่อมาคือ intermediate phase มีการผลิต extracellular matrix เป็นสารที่มีคุณสมบัติคล้ายผนังเซลล์ คือ polysaccharides เป็นระยะที่มีการเชื่อมยึดติดกันของสารที่หลั่งนอกเซลล์ ทำให้ไบโอฟิล์มมีความเหนียวแน่นขึ้น และระยะสุดท้ายคือ maturation phase เชื้อ *C. albicans* ยังผลิต extracellular matrix มากขึ้น ไบโอฟิล์มมีการเติบโตขึ้นและมีความซับซ้อนมากยิ่งขึ้น จน yeast cells ตัวใหม่ก็จะหลุดออกจากไบโอฟิล์มเดิม และสร้างไบโอฟิล์มใหม่ต่อไป อีกทั้งยังมีการศึกษาว่า ไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* สามารถสื่อสารระหว่างเซลล์ได้ (quorum sensing) และมียีนที่สามารถควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มได้ (genetic control)¹⁶⁻¹⁹

นอกจากนี้ได้ทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อทดสอบผลของน้ำมันมะพร้าวในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราต่อหน่วยเวลา (time kill assay) พบว่า nystatin ความเข้มข้น 80.000 units/mL สามารถฆ่าเชื้อ *C. albicans* ได้ภายในชั่วโมงที่ 2 ของการทดสอบ ในขณะที่น้ำมันมะพร้าวความเข้มข้น 80% v/v ไม่สามารถฆ่าเชื้อ *C. albicans* ได้ และพบว่าเชื้อมีการเจริญเพิ่มมากขึ้น ส่วนเชื้อ *C. albicans* ที่อยู่ใน normal saline พบว่าปริมาณเชื้อไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนในช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษา และการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบผลของน้ำมันมะพร้าวต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* DMST 5815 ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐาน จึงควรมีการศึกษาฤทธิ์ดังกล่าวเพิ่มเติมกับเชื้อ *C. albicans* สายพันธุ์อื่น ๆ ที่แยกได้จาก clinical specimens ด้วย

สรุป (Conclusion)

น้ำมันมะพร้าวในความเข้มข้นที่ได้ทำการศึกษาไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* ในทุกการทดสอบ ได้แก่ agar well diffusion assay, bioautography agar overlay assay, และ broth microdilution assay ส่วนการศึกษาผลของน้ำมันมะพร้าวในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* พบว่าน้ำมันมะพร้าวที่ความเข้มข้น 0.3-3% v/v สามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อรา *C. albicans* ลงได้ประมาณ 20-40% เนื่องจากน้ำมันมะพร้าวมีหลายส่วนประกอบจึงควรศึกษาวิธีการสกัดส่วนประกอบของน้ำมันมะพร้าวที่เหมาะสม ว่าฤทธิ์ส่วนประกอบของน้ำมันมะพร้าวใดสามารถช่วยยับยั้งกระบวนการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. albicans* ได้

References

1. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J* 2002;78(922):455-9.
2. Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* 2006;6(7):979-86.
3. Coulthwaite L, Verran J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. *Br J Biomed Sci* 2007;64(4):180-9.
4. Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23(5):377-83.
5. Rautemaa R, Ramage G. Oral candidosis--clinical challenges of a biofilm disease. *Crit Rev Microbiol* 2011;37(4):328-36.
6. Seleem D, Benso B, Noguti J, Pardi V, Murata RM. In Vitro and in vivo antifungal activity of Lichochalcone-A against *Candida albicans* biofilms. *PLoS One* 2016;11(6):e0157188.
7. Widianingrum DC, Noviandi CT, Salasia SIO. Antibacterial and immunomodulator activities of virgin coconut oil (VCO) against *Staphylococcus aureus*. *Heliyon* 2019;5(10):e02612.
8. Tangwatcharin P, Khopaibool P. Activity of virgin coconut oil, lauric acid or monolaurin in combination with lactic acid against *Staphylococcus aureus*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2012;43(4):969-85.
9. Bergsson G, Arnfinnsson J, Steingrímsson O, Thormar H. In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(11):3209-12.
10. Shilling M, Matt L, Rubin E, Visitacion MP, Haller NA, Grey SF, et al. Antimicrobial effects of virgin coconut oil and its medium-chain fatty acids on *Clostridium difficile*. *J Med Food* 2013;16(12):1079-85.
11. Ogbolu DO, Oni AA, Daini OA, Oloko AP. In vitro antimicrobial properties of coconut oil on *Candida* species in Ibadan, Nigeria. *J Med Food* 2007;10(2):384-7.
12. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* 2016;6(2):71-9.
13. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(9):2475-9.
14. Basch H, Gadebusch HH. In vitro antimicrobial activity of dimethylsulfoxide. *Appl Microbiol* 1968;16(12):1953-4.
15. Hazen KC. Influence of DMSO on antifungal activity during susceptibility testing in vitro. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;75(1):60-3.
16. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001;183(18):5385-94.
17. Coskun O. Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanb* 2016;3(2):156-60.
18. Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol* 2006;8(9):1382-91.
19. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* 2013;62(Pt 1):10-24.