การพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นที่ต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพ

Development of Virgin Coconut Oil Mouthwash against *Candida albicans* Biofilms

ธนวรรษ อินทรแก้วศรี[1], ดรุณี โอวิทยากุล[2], เพ็ญพิชชา วนจันทรรักษ์[3]
[1]โรงพยาบาลทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช
[2]ภาควิชาทันตกรรมครอบครัวและชุมชน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[3]ศูนย์วิจัยทางทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Thanawat Intarakaewsri[1], Darunee Owittayakul[2], Phenphichar Wanachantararak[3]
[1]Thungsong Hospital, Nakorn Si Thammarat
[2]Department of Family and Community Dentistry, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University
[3]The Dental Research Center, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University

ชม. ทันตสาร 2563; 41(3) : 55-64
CM Dent J 2020; 41(3) : 55-64

Received: 28 January, 2020
Revised: 18 March, 2020
Accepted: 8 April, 2020

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นและเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพกับยาไนสแตติน

วิธีการศึกษา: เตรียมตำรับน้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นทั้งหมด 9 ตำรับ โดยมีส่วนประกอบ 3 ส่วน คือ น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น โพรพิลีนไกลคอล และน้ำกลั่น สร้างแผ่นชีวภาพโดยใช้เชื้อยีสต์แคนดิดาอัลบิแคนส์สายพันธุ์ ATCC 10231 ในไมโครเวลเพลทขนาด 96 หลุมที่เคลือบด้วยน้ำลายจากอาสาสมัคร นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพ โดยหาปริมาณเชื้อที่ลดลงภายหลังจากสัมผัสน้ำยาบ้วนปากจาก

Abstract

Objectives: To develop mouthwashes formulated from virgin coconut oil and to compare their antifungal activities against *C. albicans* biofilm with those of nystatin.

Materials and Methods: A total of nine formulas of mouthwash containing coconut oil, propylene glycol and distilled water were prepared. *C. albicans* biofilm was formed on a 96-well plate precoated with unstimulated saliva. The antifungal activity of each mouthwash formula was determined by a reduction of viable yeast cells after

Corresponding Author:

ดรุณี โอวิทยากุล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ภาควิชาทันตกรรมครอบครัวและชุมชน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

Darunee Owittayakul
Assistant Professor, Department of Family and Community Dentistry, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
E-mail: ***darunee.o@cmu.ac.th, jeeleeja@gmail.com***

น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นตำรับต่าง ๆ เป็นเวลานาน 10 นาที ซึ่งมียาไนสแตตินและน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมบวกและลบตามลำดับ ประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อราในรูปแบบแผ่นชีวภาพด้วยวิธีการนับจำนวนโคโลนี และคำนวณร้อยละการลดลงของปริมาณเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพ

ผลการศึกษา: ยาไนสแตติน น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นบริสุทธิ์ และน้ำกลั่น สามารถลดปริมาณเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพ ร้อยละ 82.36±4.61, 42.83±7.6 และ 7.38±8.22 ตามลำดับ ตำรับน้ำยาบ้วนปากน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นที่มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อราในรูปแบบแผ่นชีวภาพเทียบเท่ายาไนสแตติน ได้แก่ ตำรับที่ 1 (น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นร้อยละ 60 : โพรพิลีนไกลคอลร้อยละ 40 : น้ำกลั่นร้อยละ 0) ตำรับที่ 2 (50:40:10) ตำรับที่ 4 (70:30:0) ตำรับที่ 5 (60:30:10) และตำรับที่ 7 (80:20:0) (p>0.05) โดยตำรับเหล่านี้สามารถลดปริมาณเชื้อราในรูปแบบแผ่นชีวภาพได้ร้อยละ 75 ถึง 90 ขณะที่ตำรับน้ำยาบ้วนปากที่ 5 ที่มีอัตราส่วนน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น ต่อโพรพิลีนไกลคอล ต่อน้ำกลั่น (60:30:10) เพื่อลดความหนืดของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น มีปริมาณการลดลงของเชื้อราในรูปแบบแผ่นชีวภาพ ร้อยละ 83.75±5.75 ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับยาไนสแตติน (p>0.05)

บทสรุป: ตำรับน้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นที่พัฒนาขึ้นในอัตราส่วนน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น ต่อโพรพิลีนไกลคอล ต่อน้ำกลั่น (60:30:10) มีฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งใกล้เคียงกับยาไนสแตติน

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านเชื้อรา แคนดิดาอัลบิแคนส์ แผ่นชีวภาพ น้ำมันมะพร้าว น้ำยาบ้วนปาก

fungal biofilm was exposed to the test mouthwash formulations for 10 minutes. Nystatin and distilled water were used as positive and negative controls, respectively. Viability of the biofilms was investigated by cultivation and expressed in percentage of fungal biofilm reduction.

Results: Nystatin, virgin coconut oil and distilled water were able to reduce *C. albicans* biofilm by 82.36±4.61%, 42.83±7.61% and 7.38±8.22%, respectively. The mouthwashes formulated with virgin coconut oil, propylene glycol and distilled water that expressed anti-candida biofilm as effective as nystatin included these formulas 1 (60:40:0), 2 (50:40:10), 4 (70:30:0), 5 (60:30:10), and 7 (80:20:0) (p> 0.05). These formulas of virgin coconut oil reduced viable cells in the fungal biofilms ranging from 75% to 90%. The mouthwash formula 5 with the ratio of virgin coconut oil, propylene glycol and distilled water (60:30:10) seemed to be the solution of interest. This mouthwash was able to reduce viable cells in the fungal biofilms by 83.75±5.75% that was not statistically different from the effect of nystatin (p> 0.05).

Conclusions: Virgin coconut oil mouthwash liquefied by the addition of propylene glycol (30%) and distilled water (10%) has shown an efficacy in reducing *C. albicans* biofilm significantly that was not inferior that of nystatin.

Keywords: antifungal activity, *Candida albicans*, biofilms, coconut oil, mouthwash

บทนำ

โรคเชื้อราในช่องปาก (oral candidiasis) เกิดจากการติดเชื้อแคนดิดา (candida) โดยสายพันธุ์ก่อโรคที่พบได้มากที่สุด คือ แคนดิดาอัลบิแคนส์ (*Candida albicans*)[1] ซึ่งมีปัจจัยก่อความรุนแรง (virulence factor) สูงกว่าสายพันธุ์อื่นในกลุ่มเดียวกัน[2] และการสร้างแผ่นชีวภาพ (biofilm) ทำให้เชื้อรามีความสามารถในการเกิดโรคและต้านทานต่อยาต้านเชื้อรามากขึ้น[3] การรักษาโรคเชื้อราในช่องปากนิยมใช้ยาต้านเชื้อราเฉพาะที่ (topical antifungal agent) รูปแบบอม ซึ่งอาจทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์[4,5] รสชาติไม่พึงประสงค์และต้องใช้หลายครั้งต่อวัน อาจส่งผลต่อการให้ความร่วมมือของผู้ป่วยในการรักษาได้ ดังนั้นสารสกัดจากธรรมชาติอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เพื่อลดผลข้างเคียงจากการใช้ยา

น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นเป็นสารสกัดธรรมชาติที่มีกลิ่นหอม รสชาติดี หาซื้อได้ง่าย สามารถนำมาใช้อมกลั้วปาก (oil-pulling) วันละ 1 ครั้ง ซึ่งใช้ครั้งละ 1 ช้อนโต๊ะ อมกลั้วปาก นาน 10-15 นาที แล้วบ้วนทิ้ง[6] โดยคุณสมบัติที่ดีของน้ำยาบ้วนปาก คือ มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ มีรสชาติดี มีกลิ่นหอมน่าใช้ ไม่ระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อในช่องปาก ไม่ทำให้เกิดอาการข้างเคียง รวมถึงมีราคาย่อมเยา[7] มีการศึกษาพบว่าน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก[8-13] และเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์[13-15] สามารถลดเหงือกอักเสบและแผ่นคราบจุลินทรีย์[16,17] อีกทั้งไม่มีรายงานถึงอาการปวดแสบปวดร้อน การรับรสเปลี่ยน หรืออาการไม่พึงประสงค์อื่น ๆ ภายหลังจากการใช้น้ำมันมะพร้าวอมกลั้วปาก[10,18] การศึกษาที่ประเมินความพึงพอใจของหลังการใช้น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นบริสุทธิ์อมกลั้วปาก พบว่าผู้ใช้มีความพึงพอใจเรื่องกลิ่น รสชาติ รู้สึกปากสะอาด กลิ่นปากลดลง ทั้งนี้พบว่ามีผู้ใช้ไม่พึงพอใจในเรื่อง ระยะเวลาอมบ้วนที่นานถึง 10 นาที และความข้นหนืดของน้ำมัน ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการใช้น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นอมบ้วนในชีวิตประจำวัน อีกทั้งน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นที่มีขายตามท้องตลาดในประเทศไทยมีราคาค่อนข้างสูง[16] ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นที่มีความข้นหนืดน้อยลงและมีต้นทุนต่ำลง โดยมีส่วนผสมเป็นโพรพิลีนไกลคอล และน้ำกลั่น ซึ่งโพรพิลีนไกลคอลเป็นของเหลวใส ไม่มีกลิ่น ไม่มีรสชาติ[19] และอีกทั้งมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา[20] นอกจากนี้การศึกษานี้ยังต้องการเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพกับยาไนสแตติน (Nystatin) ซึ่งเป็นยาต้านเชื้อราเฉพาะที่ที่นิยมใช้รักษาโรคเชื้อราในช่องปาก ดังนั้นตำรับน้ำยาบ้วนปากที่พัฒนาควรช่วยลดความหนืดของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น ลดต้นทุน แต่มีประสิทธิภาพฆ่าเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพได้ดีเทียบเท่ายาไนสแตติน

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. การขอรับรองโครงการ

งานวิจัยนี้ผ่านการรับรองโครงการศึกษาวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ์ สวัสดิภาพและป้องกันภยันตรายของผู้ถูกวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เอกสารเลขที่ 7/2561 และผ่านการรับรองด้านความปลอดภัยทางชีวภาพจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับส่วนงานชุดที่ 5 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Approval No. CMUIBC A-0561017)

2. การเตรียมตำรับน้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยใช้น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นบริสุทธิ์ (CoCo Delight®, GPO, Bangkok, Thailand) ซึ่งผ่านการตรวจสอบคุณภาพ ไม่พบเชื้อจุลชีพเจือปนรับรองโดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ทำการเตรียมตำรับน้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น 9 ตำรับ ซึ่งมีส่วนประกอบ 3 ส่วน ได้แก่ น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น โพรพีลีนไกลคอล (propylene glycol) และน้ำกลั่น โดยปรับสัดส่วนของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น และโพรพีลีนไกลคอล ดังตารางที่ 1 ทั้งนี้โพรพีลีนไกลคอล ทำหน้าที่เป็นตัวทำอิมัลชัน (emulsifier) เพื่อให้น้ำมันมะพร้าวและน้ำกลั่นเข้ากัน จากนั้นนำตำรับน้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นทั้ง 9 ตำรับไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพเป็นเวลา 10 นาที ตามวิธีการทดลองข้างต้น เปรียบเทียบกับยาไนสแตติน น้ำกลั่น และสารละลายโพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol solution: PS) ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เข้มข้นร้อยละ 20, 30 และ 40

3. การเตรียมแคนดิดาอัลบิแคนส์ (*C. albicans* cell suspension preparation)

เชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์สายพันธุ์ ATCC 10231

จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์แห่งชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงจุลชีพแซบบรอทเด็กซ์โตรสบรอท (Sabouraud-2% Dextrose Broth, Merck®, Germany) ในตู้อบเลี้ยงเชื้อชนิดใช้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง[21] จากนั้นนำเชื้อที่เจริญเต็มที่แล้วมาปรับให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน (McFarland No. 0.5 ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ซึ่งมีเชื้ออยู่ 1-2 × 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร)[22] โดยใช้เครื่องเดนสิโตมิเตอร์ (densitometer, DEN-1B, Biosan SIA, Latvia)

4. การเก็บตัวอย่างน้ำลาย (Saliva sample collection) เพื่อนำไปใช้สร้างแผ่นชีวภาพ

เก็บน้ำลายจากอาสาสมัคร 1 ราย โดยมีเกณฑ์คัดเลือกอาสาสมัคร (inclusion criteria) คือ เป็นผู้ที่มีอายุมากกว่า 18 ปี สุขภาพแข็งแรง ปฏิเสธการสูบบุหรี่ และมีอัตราการหลั่งน้ำลายขณะกระตุ้นมากกว่า 1 มิลลิลิตรต่อนาที[23] รวมถึงมีเกณฑ์การคัดอาสาสมัครออก (exclusion criteria) คือ ตั้งครรภ์ หรือให้นมบุตร สูบบุหรี่ และรับประทานยาปฏิชีวนะก่อนหรือระหว่างการทดลองเป็นเวลา 3 เดือน[16,23] ทำการเก็บตัวอย่างน้ำลายช่วงเช้า 9.00-11.00 น.[24,25] ในขณะไม่ได้รับการกระตุ้น (unstimulated salivation) ด้วยวิธีการบ้วนน้ำลาย (spitting method)[25]

5. การสร้างแผ่นชีวภาพของเชื้อทดสอบ

น้ำลายของอาสาสมัครปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่องปั่นที่จำนวนรอบ 1,500 G นาน 15 นาที ดูดของเหลวส่วนบนของน้ำลายผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน (Minisart®, Sartorius, Germany) เพื่อกรองเชื้อจุลชีพออกจากน้ำลาย[13] นำน้ำลายที่ผ่านการกรองปริมาตร 100 ไมโครลิตรมาเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงจุลชีพแบบแข็ง (Sabouraud -4% Dextrose Agar, Merck®, Germany) เพื่อตรวจสอบว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพ จากนั้นจึงนำน้ำลายที่ผ่านการกรองปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมของไมโครเพลท 96 หลุมชนิดก้นแบน นำไปเพาะเชื้อในตู้อบเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง[26] ดูดน้ำลายออกแล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate-buffered solution: PBS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เบา ๆ 2 ครั้ง เพื่อกำจัดน้ำลายส่วนเกิน[26] แล้วเติมเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพาะเชื้อในตู้อบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที เพื่อให้เกิดการยึดเกาะในระยะเริ่มต้น[26-28] เมื่อครบเวลาดูดสารละลายในแต่ละหลุมออกทั้งหมด ล้างแต่ละหลุม

ตารางที่ 1 *ส่วนประกอบของตำรับน้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าว และ สารละลายโพรพิลีนไกลคอล*

Table 1 *Compositions of mouthwash formulae from coconut oil and propylene glycol solution*

สารทดสอบ	ร้อยละส่วนประกอบ น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น : โพรพีลีนไกลคอล :น้ำกลั่น
น้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าวตำรับที่ 1 (1^{st}MW)	60 : 40 : 0
น้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าวตำรับที่ 2 (2^{nd}MW)	50 : 40 : 10
น้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าวตำรับที่ 3 (3^{rd}MW)	40 : 40 : 20
สารละลายโพรพิลีนไกลคอล ร้อยละ 40 (PS40)	0 : 40 : 60
น้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าวตำรับที่ 4 (4^{th}MW)	70 : 30 : 0
น้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าวตำรับที่ 5 (5^{th}MW)	60 : 30 : 10
น้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าวตำรับที่ 6 (6^{th}MW)	50 : 30 : 20
สารละลายโพรพิลีนไกลคอล ร้อยละ 30 (PS30)	0 : 30 : 70
น้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าวตำรับที่ 7 (7^{th}MW)	80 : 20 : 0
น้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าวตำรับที่ 8 (8^{th}MW)	70 : 20 : 10
น้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าวตำรับที่ 9 (9^{th}MW)	60 : 20 : 20
สารละลายโพรพิลีนไกลคอล ร้อยละ 20 (PS20)	0 : 20 : 80

ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 200 ไมโครลิตร 2 ครั้ง เพื่อล้างเอาเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะออก เติมแซบบรอท เด็กซ์-โตรส บรอท ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปเพาะเชื้อในตู้อบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนอาหารทุก 24 ชั่วโมง[29,30] เมื่อครบ 48 ชั่วโมง ดูดสารละลายในแต่ละหลุมออกทั้งหมด ล้างแต่ละหลุมด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 200 ไมโครลิตร 2 ครั้ง สังเกตคราบแผ่นชีวภาพบริเวณก้นของหลุมจานเพาะเลี้ยง

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพของตำรับน้ำยาบ้วนปาก

ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพของตำรับน้ำยาบ้วนปากจากน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นทั้ง 9 ตำรับ ที่เตรียมในข้อ 2 โดยใช้ยาไนสแตตินความเข้มข้น 100,000 ยูนิต/มิลลิลิตร (nystatin, Sigma, USA) เป็นตัวควบคุมบวก น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และน้ำมันมะพร้าวสกัดบริสุทธิ์ (virgin coconut oil) เป็นสารทดสอบ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำการทดลองซ้ำ 3 หลุม นำไปบ่มในตู้อบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารละลายในหลุมออกทั้งหมด ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 200 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 200 ไมโครลิตร ลงในหลุม ขูดเชื้อบริเวณก้นหลุมๆ ละ 10 ครั้ง ในลักษณะทิศทางเดียวกัน ด้วยไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อ[31] ดูดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และแผ่นชีวภาพปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในหลอดเอฟเพนดอร์ฟ (eppendorf) และเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 800 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเขย่าเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) ด้วยความเร็วสูงสุด[32] เป็นเวลา 3 นาที[27] เพื่อให้แผ่นชีวภาพกระจายตัวจนได้เป็นเซลล์แขวนลอยของแผ่นชีวภาพ ทำการเจือจางความเข้มข้นลดลงทีละ 10 เท่า (10-fold serial dilution) ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ นำสารละลายแขวนลอยของแผ่นชีวภาพปริมาตร 100 ไมโครลิตร มากระจายให้ทั่วบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงจุลชีพแบบแข็ง เพาะเชื้อในตู้อบเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายรูปจานเพาะเชื้อ เพื่อนำเข้าโปรแกรม อิมเมจ เจ (Image J, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) นับจำนวนโคโลนีราแคนดิดาอัลบิแคนส์ ซึ่งมีลักษณะนูน สีครีมขาว[33] มีหน่วยเป็นโคโลนีต่อมิลลิลิตร และบันทึกผล ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณค่าร้อยละการลดลงของปริมาณเชื้อรา (Percentage of fungal reduction) จากสมการ

$$\text{ร้อยละการลดลงของปริมาณเชื้อ} = \frac{(\text{จำนวนโคโลนีของเชื้อตั้งต้น(CFU/mL)}-\text{จำนวนโคโลนีของเชื้อหลังจากทดสอบสาร(CFU/mL)})}{(\text{จำนวนโคโลนีของเชื้อตั้งต้น(CFU/mL))}} \times 100$$

7. การทดสอบทางสถิติ

นำค่าร้อยละการลดลงของปริมาณเชื้อรามาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One Way - ANOVA) ร่วมกับวิธีของดันเนตต์ (Dunnett T3 test) กำหนดระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p = 0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS รุ่น 17 (SPSS Inc., Chicago, Iiilinois, USA)

ผลการศึกษา

เชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพภายหลังจากสัมผัสสารทดสอบต่างๆ เป็นเวลา 10 นาที พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละการลดลงของปริมาณเชื้อราของยาไนสแตติน น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นบริสุทธิ์ และน้ำกลั่น มีค่าเท่ากับ 82.36±4.61, 42.83±7.61 และ 7.38±8.22 ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพของสารทั้ง 3 ชนิดนั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) นอกจากนั้น พบว่าน้ำยาบ้วนปากตำรับที่ 1 (ที่มีอัตราส่วนน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นร้อยละ 60 : โพรพิลีนไกลคอลร้อยละ 40 : น้ำกลั่นร้อยละ 0) ตำรับที่ 2 (50:40:10) ตำรับที่ 4 (70:30:0) ตำรับที่ 5 (60:30:10) และตำรับที่ 7 (80:20:0) มีฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพไม่แตกต่างจากยาไนสแตติน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยสามารถลดปริมาณเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพได้ร้อยละ 75 ถึง 90 ส่วนเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์สกัดเย็น พบว่าน้ำยาบ้วนปากตำรับที่ 1, 2, 3 (40:40:20), 4, 5 และ 7 มีฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นมากกว่าน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นบริสุทธิ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น พบว่าน้ำยาบ้วนปากทั้ง 9 ตำรับมีฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพมากกว่าน้ำกลั่น โดยตำรับที่ 1-8 มีค่าเฉลี่ยร้อยละการลดลงของปริมาณเชื้อรามากกว่าน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

ดังแสดงในตารางที่ 2 และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อราในรูปแบบแผ่นชีวภาพระหว่างน้ำยาบ้วนปากตำรับที่ 2, 4, 5 และ 7 กับตำรับที่ 1 พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละการลดลงของปริมาณเชื้อราไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

ส่วนสารละลายโพรไพลีนไกลคอลในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ความเข้มข้นร้อยละ 40 (PS40), 30 (PS30) และ 20 (PS20) นั้น มีฤทธิ์ลดปริมาณเชื้อราร้อยละ 70, 45 และ 25 โดยประมาณตามลำดับ นอกจากนั้นพบว่าน้ำยาบ้วนปากตำรับที่มีน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นร้อยละ 60 ผสมอยู่ในสารละลายโพรไพลีนไกลคอลความเข้มข้นร้อยละ 40 (ตำรับที่ 1) มีฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพมากกว่าตำรับที่ 2, 3 และ PS40 โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตำรับที่ 1 กับตำรับที่ 3 (p<0.001) และตำรับที่ 1 กับ PS40 (p=0.003) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตำรับที่ 1 และ 2 (p=0.071) ส่วนกลุ่มสารทดสอบที่มีความเข้มข้นโพรไพลีนไกลคอลร้อยละ 30 พบว่าตำรับที่ 4, 5 ที่มีน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นผสมอยู่ร้อยละ 70 และ 60 ตามลำดับ มีฤทธิ์ต้านเชื้อรามากกว่าตำรับที่ 6 ที่ผสมน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นร้อยละ 50 และ PS30 อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.001) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตำรับที่ 4 และ 5 (p=0.513) สำหรับกลุ่มสารทดสอบที่มีความเข้มข้นโพรไพลีนไกลคอลร้อยละ 20 พบว่าตำรับที่ 7 ที่มีน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นในอัตราส่วนร้อยละ 80 มีฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพมากกว่าตำรับที่ 8 และ 9 ที่มีสัดส่วนน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นร้อยละ 70 และ 60 ตามลำดับ และ PS 20 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างตำรับที่ 9 และ PS 20 (p>0.05)

บทวิจารณ์

ผลการทดลองพบว่า น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นบริสุทธิ์ มีฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพ และสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้[13] โดยน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นบริสุทธิ์ มีองค์ประกอบด้วยกรดไขมันสายคาร์บอนขนาดกลาง (medium chain fatty acid) ซึ่งมีจำนวนอะตอมสายคาร์บอน 6-12 ตัว ในปริมาณสูง ได้แก่ กรดลอริก (C12:0) และกรดคาปริก (C10:0) มีฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์[34]

ตารางที่ 2 *ค่าเฉลี่ยร้อยละการลดลงของปริมาณเชื้อราเปรียบเทียบระหว่างตำรับน้ำยาบ้วนปาก สารละลายโพรพิลีนไกลคอล น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นบริสุทธิ์ ยาไนสแตติน และน้ำกลั่น*

Table 2 *Mean percentage of fungal reduction of mouthwash formulae, propylene glycol solutions, virgin coconut oil, nystatin and distilled water*

Substances		Mean (Standard deviation)
1.	4th MW	89.92 (3.31)[a]
2.	1st MW	89.81 (8.21)[a]
3.	5th MW	83.75 (5.75)[a]
4.	Nystatin	82.36 (4.61)[a]
5.	2nd MW	77.00 (3.64)[ab]
6.	7th MW	75.74 (10.92)[ab]
7.	PS40	68.72 (7.59)[b]
8.	3rd MW	63.32 (8.58)[b]
9.	6th MW	51.41 (6.76)[c]
10.	8th MW	47.43 (13.88)[c]
11.	PS30	46.12 (9.49)[c]
12.	Virgin coconut oil	42.83 (7.61)[c]
13.	9th MW	26.19 (11.27)[cd]
14.	PS20	25.27 (10.95)[cd]
15.	Distilled water	7.38 (8.22)[d]

[a-d] *Values with different letters are statistically significant different (p < 0.05)*

ส่วนกลไกการออกฤทธิ์ต้านเชื้อรายังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากการศึกษาพบว่าเมื่อเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์สัมผัสกรดคาปริกความเข้มข้น 10 มิลลิโมลต่อลิตร เป็นเวลา 30 นาที จะพบไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเชื้อมีการจัดเรียงที่ไม่เป็นระเบียบ (disorganization) แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ (cell wall)[34]

ตัวทำอิมัลชันที่ใช้ผสมตำรับน้ำยาบ้วนปากมีหลายชนิด ได้แก่ ทวีน (Tween) และโพรพิลีนไกลคอล โดยทวีนหรือโพลีซอร์เบต (polysorbate) เป็นของเหลว สีค่อนข้างเหลือง มีกลิ่นเฉพาะ มีลักษณะหนืดคล้ายน้ำมันและมีรสชาติขม[21] ส่วนโพรพิลีนไกลคอลเป็นสารไร้สี ไร้กลิ่น มีความหนืดน้อยกว่า[35] มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา[20] และนิยมนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง ทั้งนี้การนำโพรพิลีนไกลคอลมาใช้เป็นส่วนผสมของน้ำยาบ้วนปาก อาจทำให้เกิดอาการแพ้ (allergic reaction) หรือระคายเคืองของผิวหนังได้ (skin irritation) ได้ โดยพบว่าอัตราการเกิดอาการแพ้หรือระคายเคืองแปรผันตรงตามความความเข้มข้นของโพรพิลีนไกลคอล[36] ในการทดสอบผื่นแพ้สัมผัส (contact allergy) โดยวิธีแพ็ทช์เทสต์ (patch test) ด้วยโพรพิลีนไกลคอลร้อยละ 100 พบว่าผู้ทดสอบ 3 ใน 16 ราย (ร้อยละ 18.75) มีอาการระคายเคืองของผิวหนังเล็กน้อย แต่ไม่พบอาการระคายเคืองของผิวหนังเมื่อทดสอบด้วยโพรพิลีนไกลคอลร้อยละ 50[37] ดังนั้นการใช้โพรพิลีนไกลคอล ความเข้มข้นต่ำกว่าร้อยละ 50 จึงน่าจะเป็นความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อการระคายเคืองผิวหนัง[38] อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่พบว่ามีผู้ทดสอบร้อยละ 3.5 เกิดผื่นแพ้สัมผัสภายหลังการสัมผัสสารละลายโพรพิลีนไกลคอลความเข้มข้นร้อยละ 30 ด้วยวิธีแพ็ทเทสต์[39] ทั้งนี้ยังไม่พบการศึกษาที่รายงานถึงความเข้มข้นของโพรพิลีนไกลคอลที่ส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อในช่องปาก

จากการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพ พบว่าน้ำยาบ้วนปากตำรับที่ 1, 4, 5 และ 7 มีค่าเฉลี่ยร้อยละการลดลงของปริมาณเชื้อรามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นบริสุทธิ์ และสารละลายโพรพีลีนไกลคอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 40, 30 และ 20 ตามลำดับ การผสมโพรพีลีนไกลคอลความเข้มข้นร้อยละ 40, 30 และ 20 กับน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น จะช่วยเพิ่มฤทธิ์การต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น

จากการศึกษานี้ตำรับน้ำยาบ้วนปากที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพเทียบเท่ากับยาไนสแตติน ได้แก่ ตำรับที่ 1, 2, 4, 5 และ 7 โดยตำรับที่ 2 และ 5 เป็นตำรับที่มีน้ำกลั่นเป็นส่วนประกอบร้อยละ 10 ยังคงมีฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์เทียบเท่าตำรับที่ 1 และ 4 ซึ่งไม่มีน้ำกลั่นเป็นส่วนประกอบ การผสมน้ำกลั่นในตำรับน้ำยาบ้วนปากมีวัตถุประสงค์เพื่อลดต้นทุน ลดความข้นหนืดของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น ทำให้สามารถใช้อมบ้วนได้ง่ายขึ้น และยังเอื้อประโยชน์ในขบวนการผลิตน้ำยาบ้วนปาก เนื่องจากเป็นส่วนที่สามารถเติมสีหรือแต่งกลิ่นได้ แต่อัตราส่วนของน้ำกลั่นที่เป็นส่วนประกอบของน้ำยาบ้วนปากต้องไม่เกินร้อยละ 10 เนื่องจากการเติมน้ำกลั่นมากกว่าร้อยละ 10 จะทำให้ฤทธิ์การต้านเชื้อราของตำรับน้ำยาบ้วนปากลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ฉะนั้นในการพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา จึงเลือกตำรับที่เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนร้อยละ 10 ดังนั้นน้ำยาบ้วนปากตำรับที่ 5 ที่มีส่วนประกอบของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น โพรพีลีนไกลคอล และน้ำกลั่น ในอัตราส่วนร้อยละ 60, 30 และ 10 ตามลำดับ น่าจะเป็นตำรับที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพ เนื่องจากมีความหนืดของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นลดลง และต้นทุนการผลิตต่ำกว่าตำรับที่ 1 และ 4

ในการศึกษานี้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเป็นระยะเวลา 10 นาที โดยอ้างอิงระยะเวลาที่ใช้น้ำมันมะพร้าวอมกลั้วปาก[6] ซึ่งอาจไม่สะดวกในชีวิตประจำวันสำหรับผู้ป่วยบางราย[16] ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงฤทธิ์ต้านเชื้อราของตำรับน้ำยาบ้วนปากที่พัฒนาขึ้นในระยะเวลาสัมผัสที่น้อยลง เพื่อความสะดวกในการใช้อมบ้วนปาก

บทสรุป

ตำรับน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนประกอบของน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น โพรพีลีนไกลคอลและน้ำกลั่น (60:30:10) มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์ในรูปแบบแผ่นชีวภาพเทียบเท่ากับยาไนสแตติน อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ จึงควรมีการศึกษาทางคลินิกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.ธนพัฒน์ ศาสตระรุจิ ศูนย์วิจัยทางทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้ให้คำปรึกษาด้านสถิติ และคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ห้องปฏิบัติการวิจัย รวมถึงจัดสรรทุนวิจัยจากงบประมาณเงินได้มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2561

เอกสารอ้างอิง

1. Samaranayake LP, K. Cheung LK, Samaranayake YH. Candidiasis and other fungal diseases of the mouth. *Dermatol Ther* 2002; 15(3): 251-269.
2. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 2013; 4(2): 119-128.
3. Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol* 2012; 2012: 528521. doi:10.1155/2012/528521
4. Bennett JE. Antimicrobial agents: antifungal agents. In: Goodman LS, Gilman A, Hardman JG, Limbird LE, ed: *Goodman & gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 9thed. New York: McGraw-Hill; 1996. 1175-1191.
5. Epstein JB, Polsky B. Oropharyngeal candidiasis: a review of its clinical spectrum and current therapies. *Clin Ther* 1998; 20(1): 40-57.
6. Shanbhag VKL. Oil pulling for maintaining oral hygiene - a review. *J Tradit Complement Med* 2017; 7(1): 106-109.
7. Santos A. Evidence-based control of plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 13-16.
8. Jauhari D, Srivastava N, Rana V, Chandna P. Comparative evaluation of the effects of fluoride mouthrinse, herbal mouthrinse and oil pulling on the caries activity and *Streptococcus mutans* count using Oratest and Dentocult SM strip mutans kit. *Int J Clin Pediatr Dent* 2015; 8(2): 114-118.
9. Owittayakul D, Palee K, Khongkhunthian S, Wanachantararak P. Effect of coconut oil on salivary total bacterial and *Streptococcus mutans* counts. *CM Dent J* 2018; 39(1): 75-83.
10. Peedikayil FC, Remy V, John S, Chandru TP, Sreenivasan P, Bijapur GA. Comparison of antibacterial efficacy of coconut oil and chlorhexidine on *Streptococcus mutans*: an *in vivo* study. *J Int Soc Prev Community Dent* 2016; 6(5): 447-452.
11. Saravanan D, Ramkumar S, Vineetha K. Effect of oil pulling with sesame oil on plaque-induced gingivitis: a microbiological study. *J Orofac Res* 2013; 3: 175-180.
12. Sood P, Devi MA, Narang R, Swathi V, Makkar DK. Comparative efficacy of oil pulling and chlorhexidine on oral malodor: a randomized controlled trial. *J Clin Diagn Res* 2014; 8(11): 18-21.
13. Thaweboon S, Nakaparksin J, Thaweboon B. Effect of oil-pulling on oral microorganisms in biofilm models. *Asia J Public Health* 2011; 2(2): 62-66.
14. 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): 384-387.
15. Shino B, Peedikayil FC, Jaiprakash SR, Ahmed Bijapur G, Kottayi S, Jose D. Comparison of antimicrobial activity of chlorhexidine, coconut oil, probiotics, and ketoconazole on *Candida albicans* isolated in children with early childhood caries: an *in vitro* study. *Scientifica* 2016; 1016: 7061587. doi: 10.1155/2016/7061587.
16. Owittayakul D, Palee K, Khongkhunthian S, Langkapin W, Wanachantararak P, Bhatia P. Efficacy of coconut oil and 0.12 % chlorhexidine mouthrinses in reduction of plaque and gingivitis: a two-week randomized clinical trial. *J Dent Assoc Thai* 2018; 68: 360-369.

17. Peedikayil FC, Sreenivasan P, Narayanan A. Effect of coconut oil in plaque related gingivitis - a preliminary report. *Niger Med J* 2015; 56(2): 143-147.
18. Singla N, Acharya S, Martena S, Singla R. Effect of oil gum massage therapy on common pathogenic oral microorganisms - a randomized controlled trial. *J Indian Soc Periodontol* 2014; 18(4): 441-446.
19. LaKind JS, McKenna EA, Hubner RP, Tardiff RG. A review of the comparative mammalian toxicity of ethylene glycol and propylene glycol. *Crit Rev Toxicol* 1999; 29(4): 331-65.
20. Kinnunen T, Koskela M. Antibacterial and antifungal properties of propylene glycol, hexylene glycol, and 1,3-butylene glycol in vitro. *Acta Derm Venereol* 1991; 71(2): 148-150.
21. American College of Toxicology. Final report on the safety assessment of polysorbates 20, 21, 40, 60, 61, 65, 80, 81, and 85. *Int J Toxicol* 1984; 3: 1-82.
22. Lee JA, Chee HY. *In vitro* antifungal activity of equol against *Candida albicans*. *Mycobiology* 2010; 38(4): 328-330.
23. Wiegand A, Bliggenstorfer S, Magalhaes AC, Sener B, Attin T. Impact of the *in situ* formed salivary pellicle on enamel and dentine erosion induced by different acids. *Acta Odontol Scand* 2008; 66(4): 225-230.
24. Fenoll-Palomares C, Muñoz Montagud JV, Sanchiz V, et al. Unstimulated salivary flow rate, pH and buffer capacity of saliva in healthy volunteers. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96(11): 773-783.
25. Muddugangadhar BC, Sangur R, Rudraprasad IV, Nandeeshwar DB, Kumar BH. A clinical study to compare between resting and stimulated whole salivary flow rate and pH before and after complete denture placement in different age groups. *J Indian Prosthodont Soc* 2015; 15(4): 356-366.
26. Cavalcanti YW, Wilson M, Lewis M, et al. Salivary pellicles equalise surfaces' charges and modulate the virulence of *Candida albicans* biofilm. *Arch Oral Biol* 2016; 66: 129-140.
27. Jin Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch Oral Biol* 2004; 49(10): 789-798.
28. Madeira PL, Carvalho LT, Paschoal MA, et al. *In vitro* effects of lemongrass extract on *Candida albicans* biofilms, human cells viability, and denture surface. *Front Cell Infect Microbiol* 2016;6:71. doi: 10.3389/fcimb.2016.00071
29. Queiroz JR, Fissmer SF, Koga-Ito CY, et al. Effect of diamond-like carbon thin film coated acrylic resin on *Candida albicans* biofilm formation. *J Prosthodont* 2013; 22(6): 451-455.
30. Suwanampai P , Itthidecharon C , Wanachantararak P , Suanpoot P. Efficiency of non-thermal atmospheric pressure plasma on killing *Candida albicans* biofilm. *CM Dent J* 2019; 40(3): 113-123. (in Thai)
31. Santos JD, Piva E, Vilela SF, Jorge AO, Junqueira JC. Mixed biofilms formed by C. albicans and non-albicans species: a study of microbial interactions. *Braz Oral Res* 2016; 30: 1-8.
32. Estivill D, Arias A, Torres-Lana A, Carrillo-Muñoz AJ, Arévalo MP. Biofilm formation by five species of Candida on three clinical materials. *J Microbiol Methods* 2011; 86(2): 238-242.

33. Saigal S, Bhargava A, Mehra SK, Dakwala F. Identification of *Candida albicans* by using different culture medias and its association in potentially malignant and malignant lesions. *Contemp Clin Dent* 2011; 2(3): 188-193.
34. Bergsson G, Arnfinnsson J, Steingrimsson O, Thormar H. *In vitro* killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(11): 3209-3212.
35. Monument chemical technical product information. [http://www.monumentchemical.com]. Propylene Glycol [cited 2020 Jan 27]; Available from: https://monumentchemical.com/uploads/files/TDS/PG%20-%20TDS.pdf.
36. American College of Toxicology. Final report on the safety assessment of propylene glycol and polypropylene glycols. *Int J Toxicol* 1994; 13(6): 473-491.
37. Willis CM, Stephens JM, Wilkinson JD. Experimentally-induced irritant contact dermatitis. determination of optimum irritant concentrations. *Contact Dermatitis* 1988; 18: 20-24.
38. Fiume MM, Bergfeld WF, Belsito DV, et al. Safety assessment of propylene glycol, tripropylene glycol, and PPGs as used in cosmetics. *Int J Toxicol* 2012; 31(5): 245S-260S.
39. Warshaw EM, Botto NC, Maibach HI, et al. Positive patch-test reactions to propylene glycol: a retrospective cross-sectional analysis from the North American contact dermatitis group, 1996 to 2006. *Dermatitis* 2009; 20(1): 14-20.