เรียนรู้เพื่อรับใช้สังคม

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืช เพื่อใช้เป็นสารกันเสียในเจล

THE EFFICACY TESTS OF PLANT EXTRACTS AS THE PRESERVATIVE USED IN GEL

ปุณณ์นิษฐา บุปผาธนรัชต์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
พ.ศ. 2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืช เพื่อใช้เป็นสารกันเสียในเจล

THE EFFICACY TESTS OF PLANT EXTRACTS AS THE PRESERVATIVE USED IN GEL

ปุณณ์นิษฐา บุปผาธนรัชต์

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
เมื่อวันที่ 28 ตุลาคม พ.ศ. 2562

.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนิดา อัศวพิชยนต์
ประธานกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ

.....
ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนี ชาญณรงค์
กรรมการ

.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชวาลินี อัศวเหม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชวาลินี อัศวเหม
กรรมการ

.....
อาจารย์ ดร.ปารภัทร โศภารักษ์
ประธานหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)

.....
ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล
กรรมการ

.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชาญ จันทร์วิทยานุชิต
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืช เพื่อใช้เป็นสารกันเสียในเจล

ปุณณ์นิษฐา บุปผาธนรัชต์ 596086
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ปวีณา ว่องตระกูล, วท.ด.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสมุนไพรทั้งหมด 5 ชนิด คือ เปลือกอบเชย ใบพลู รากชะเอมเทศ เหง้าขิงและข่า และนำสารสกัดที่มีฤทธิ์ดีที่สุดไปทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในรูปแบบเจล วิธีการสกัดทำโดยการหมักสมุนไพรในตัวทำละลายเฮกเซนและตัวทำละลาย 95% เอทานอล นำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S.aureus* TISTR 1466 (ATCC 6538) *P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) *E.coli* ATCC 7839 *C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201) และ *A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404) ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดสมุนไพรที่ทำการศึกษาทุกชนิดทั้งที่สกัดด้วยเฮกเซนและ95% เอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ได้ สารสกัดเปลือกอบเชยและใบพลูที่สกัดด้วยเฮกเซนสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษาได้ทุกชนิดและมีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดอื่นๆ ในขณะที่สารสกัดด้วย 95% เอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้เพียงบางชนิด เมื่อทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (MBC/MFC) ด้วยวิธี broth microdilution และ spread plate method ค่า MIC และ MBC/MFC ของสารสกัดเปลือกอบเชยอยู่ในช่วง 0.039-0.312 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.156-1.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.078-0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับและพบว่าสารสกัดเปลือกอบเชยมีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดใบพลูใน เฮกเซนนำสารสกัดเปลือกอบเชยที่สกัดด้วยเฮกเซนผสมลงในผลิตภัณฑ์เจลมีความเข้มข้น 0.3% 1.25% และ 2.5% โดยน้ำหนักเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ โดยวิธี challenge test พบว่าสารสกัดเปลือกอบเชยความเข้มข้น 1.25% และ 2.5% สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิดตามมาตรฐาน ISO 11930 กำหนดตำรับมีความคงตัวดีทางกายภาพและชีวภาพทั้งในสภาวะสลับอุณหภูมิและอุณหภูมิห้องตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ สารกันเสีย สารสกัดสมุนไพร เปลือกอบเชย ใบพลู ขิง ข่า ชะเอมเทศ

THE EFFICACY TESTS OF PLANT EXTRACTS AS THE PRESERVATIVE USED IN GEL

PUNNIDTHA BUPPHATANARAT 596086
MASTER OF SCIENCE (COSMETIC SCIENCES)
THESIS ADVISORY COMMITTEE: PAVEENA WONGTRAKUL, Ph.D.

ABSTRACT

This research aims to study the antimicrobial activities of five herbs, which were cinnamon bark, betel leaves, licorice, ginger, and galangal, then select the most effective herbal extract to be evaluated for their effectiveness as a preservative in cosmetic gels. The extraction method was carried out by maceration of the herbs in hexane and 95% ethanol. The crude extracts were tested for the antimicrobial activities against *S.aureus* TISTR 1466, *P.aeruginosa* TISTR 781, *E.coli* ATCC 7839, *C.albicans* TISTR 5779 and *A.brasiliensis* DMST 15538 by agar well diffusion method. The result showed that all studied extracts macerated in both hexane and 95% ethanol could inhibit gram-positive bacteria and yeast. The cinnamon bark and betel leaves extracts macerated in hexane could inhibit all types of the studied microorganisms. The minimal inhibitoryconcentration (MIC) and minimal bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC) determined by broth microdilution and spread plate methodof cinnamon bark extract were in range of 0.039-0.312 mg/mL and 0.156-1.250 mg/mL 0.078-0.625 mg/mL respectively. The cinnamon bark extract macerated in hexane was mixed into gel formulation giving a concentration of 0.3%, 1.25% and 2.5% by weight in order to determine the antimicrobial effect against the microorganisms by challenge test method. It was found the cinnamol extract at tne concentration of 1.25% and 2.5%could reduce microorganisms the amount of according to ISO 11930. The formulations were physically and biologically stable under both temperature-cycling and ambient conditions through the studied period.

Keywords: Antimicrobial activity, preservatives, herbal extracts, challenge tests

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากทางอาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล ที่ให้คำชี้แนะ คำปรึกษา และได้ถ่ายทอดความรู้ ประสบการณ์ในการปฏิบัติงานที่ดีแก่ข้าพเจ้า ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.พนิดา อัศวพิชยนต์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนี ชาญณรงค์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชวาลินี อัศวเหม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รวมทั้งคำแนะนำ ตรวจสอบ ชี้แนะในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความเรียบร้อยสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และอาจารย์วรพรรณี เผ่าทองศุข อาจารย์ที่ปรึกษาทางด้านปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาให้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ และคณะวิทยาศาสตร์ สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกเครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นสถานที่ปฏิบัติงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาของข้าพเจ้าที่คอยให้กำลังใจและให้คำปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์นี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนและพี่ทุกคนที่คอยช่วยเหลือในทุกเรื่อง ให้ข้อคิดเห็น กำลังใจและมิตรภาพที่ดี

ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่า วิทยานิพนธ์ฉบับนี้คงเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ปุณณ์นิษฐา บุปผาธนรัชต์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญแผนภูมิ	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3 ขอบเขตของการศึกษา	2
1.4 สมมติฐานของการศึกษา	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 พืชสมุนไพร	4
2.2 แบคทีเรียก่อโรคทางผิวหนัง	11
2.3 สารกันเสีย (preservative)	16
2.4 เจล (gel)	17
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	
3.1 สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือ	18
3.2 เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ	20
3.3 วิธีวิจัย	20
3.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดสมุนไพรในตำรับเจล	25
3.5 การทดสอบความคงตัว	27
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 ผลการสกัดสมุนไพร	29
4.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar well diffusion ของสารสกัดสมุนไพร	29

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี broth microdilution method ของสารสกัดสมุนไพร 31
4.4 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อรา ยีสต์ (MFC) ทดสอบโดยวิธี spread plate 33
4.5 การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรในผลิตภัณฑ์เจล โดยวิธี challenge test 34
4.6 การทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์เจลที่มีส่วนผสมของสารสกัดสมุนไพรอบเชยในสภาวะสลับอุณหภูมิ (temperature cycling) 39

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย

5.1 สรุปผลการวิจัย การอภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 40

บรรณานุกรม 46

ประวัติผู้เขียน 49

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รายละเอียดของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษา	10
2	การเตรียมสารในการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) ในสารละลายเฮกเซน โดยวิธี broth dilution method	22
3	การเตรียมสารในการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) ในสารละลายเอทานอล โดยวิธี broth dilution method	23
4	การเตรียมสารในการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) ในยาปฏิชีวนะ โดยวิธี broth dilution method	24
5	ส่วนประกอบของตำรับเจลที่ผสมสารสกัดสมุนไพรที่ทำการศึกษา	25
6	ปริมาณร้อยละของผลผลิต (%yield) ของสารสกัดสมุนไพรทั้งหมด 5 ชนิด ที่เตรียมโดยวิธีการหมัก ด้วยเฮกเซนเปรียบเทียบกับ 95% เอทานอล	28
7	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี Agar well diffusion ของสารสกัดในเฮกเซนของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด	29
8	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี Agar well diffusion ของสารสกัดใน 95% เอทานอลของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด	30
9	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งจุลินทรีย์ (MIC) ศึกษาด้วยวิธี broth micro dilution method	31
10	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) และเชื้อรา ยีสต์ (MFC) ของสารสกัดสมุนไพร	33
11	ประสิทธิภาพการเป็นสารกันเสียของสารสกัดเปลือกอบเชยในระยะเวลา 28 วัน ในผลิตภัณฑ์เจล ($logN_0$-$logN_x$) ตามมาตรฐาน ISO11930	37
12	การประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์เจลทางกายภาพก่อนและหลังการเก็บไว้ ในสภาวะสลับอุณหภูมิ (temperature cycling)	38
13	การประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์เจลทางกายภาพที่เก็บไว้ในสภาวะอุณหภูมิห้อง (room temperature)	39
14	การประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์เจลทางเคมีกายภาพก่อนและหลังการเก็บไว้ สภาวะสลับอุณหภูมิ (temperature cycling)	39

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่		หน้า
1	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.aureus* TISTR 1466 (ATCC 6538) และความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกอบเชยในผลิตภัณฑ์เจล ทดสอบโดยวิธี challenge test	35
2	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) และความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกอบเชยใน ผลิตภัณฑ์เจลทดสอบโดยวิธี challenge test	35
3	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E.coli* ATCC 7839 และความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกอบเชยในผลิตภัณฑ์เจลทดสอบโดยวิธี challenge test	36
4	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201) และความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกอบเชยในผลิตภัณฑ์เจล ทดสอบโดยวิธี challenge test	36
5	ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404) และความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกอบเชยใน ผลิตภัณฑ์เจล ทดสอบโดยวิธี challenge test	37

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สมุนไพรเหง้าข่า	4
2	สมุนไพรเหง้าขิง	6
3	สมุนไพรใบพลู	7
4	สมุนไพรเปลือกอบเชย	8
5	สมุนไพรรากชะเอมเทศ	9
6	เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*	10
7	เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*	11
8	เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*	13
9	เชื้อรา *candida albicans*	14
10	เชื้อรา *Aspergillus brasiliensis*	14
11	โครงสร้างผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และเชื้อรา	42

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เครื่องสำอางเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้เป็นประจำวันสำหรับทุกเพศและทุกวัย เช่น สบู่ ยาสีฟัน แชมพูสระผม เป็นต้น เพื่อทำความสะอาดร่างกายหรือใช้เครื่องสำอางเพื่อดูแลผิวพรรณ โลชั่นทาผิว แป้งทาหน้า และลิปสติกให้เกิดความสวยงาม เครื่องสำอางส่วนใหญ่มีรูปลักษณ์ภายนอกที่สวยงามทั้งภาชนะบรรจุและหีบห่อที่มีสีสันและรูปแบบที่ดึงดูดใจผู้บริโภค เครื่องสำอางเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้ปราศจากเชื้อจึงอาจมีเชื้อโรคปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์ได้ถึงแม้ว่าเครื่องสำอางจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดอันตรายจากจุลินทรีย์ค่อนข้างต่ำ แต่การป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในการใช้เครื่องสำอางเป็นสิ่งที่ควรพิจารณาในการตั้งตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในการเสื่อมสภาพของเครื่องสำอางและยังมีความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้ใช้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ผิวหนังและเยื่อบุอ่อนของมนุษย์มีกลไกป้องกันอันตรายจากจุลินทรีย์อยู่แล้ว แต่ระบบการป้องกันของร่างกายคนเรานี้อาจมีขีดจำกัดและไม่สามารถทำงานได้อย่างสมบูรณ์แบบตลอดเวลา อาจทำให้เครื่องสำอางที่มีเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ส่งผลกระทบกับผู้ใช้ได้โดยเฉพาะในกลุ่มผู้สูงอายุ ผู้ป่วย ผู้ที่มีปัญหาผิวหนัง ผิวหนังที่มีบาดแผล ผู้ที่เป็นโรคผิวหนังและเด็กอายุต่ำกว่า 3 ปีที่พบว่ามีการเกิดปัญหามากที่สุดและเกิดอันตรายร้ายแรงบ่อยที่สุด ทำให้ในกระบวนการผลิตเครื่องสำอางต้องมีการป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ การเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเครื่องสำอาง สามารถส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ได้

ดังนั้นการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จึงเป็นปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางจึงมีการใช้สารเคมีเป็นสารกันเสียเพื่อทำลายและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทำให้เครื่องสำอางมีคุณภาพที่ดีและมีอายุการเก็บรักษาได้นานตลอดอายุการใช้ แต่สารกันเสียในกลุ่มสารเคมีสามารถให้คุณและโทษได้เช่นกัน จึงต้องมีการควบคุมปริมาณการใช้สารกันเสียตามมาตรฐานเครื่องสำอางกำหนดเพื่อลดความเสี่ยงต่อการแพ้ระคายเคือง ผื่น คัน

จากข้อมูลมีงานวิจัยที่นำสมุนไพรมาใช้เป็นสารกันเสียและพบว่า สมุนไพรบางตัวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จึงเป็นแนวโน้มที่น่าจะลดปริมาณสารกันเสียสังเคราะห์ที่เป็นสารเคมีที่ใช้ให้น้อยลงหรือการใช้สมุนไพรเป็นสารกันเสียทดแทนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยสมุนไพรที่นำมาเป็นสารกันเสียต้องมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย ยีสต์หรือเชื้อราตามข้อกำหนดของเครื่องสำอาง

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จึงสนใจนำสารสกัดสมุนไพรที่คัดเลือกมาทั้งหมด 5 ชนิด มาทำการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ เหง้าข่า เหง้าขิง ใบพลู รากชะเอม และเปลือกอบเชย ซึ่งมีรายงานที่น่าสนใจเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ ทำการศึกษาผลของตัวทำละลายต่อการสกัดสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของสารสกัดสมุนไพรดังกล่าวในการใช้เป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาประสิทธิภาพในการสกัดพืชโดยใช้ตัวทำละลายในสารสกัดที่แตกต่างกันในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ตามข้อกำหนดทางเครื่องสำอาง

2. ศึกษาความคงตัวของสูตรเจลคาร์โบเมอร์ที่ใช้สารสกัดสมุนไพรเป็นสารกันเสียในตำรับ

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

1. สกัดสารจากสมุนไพร เหง้าขิง เหง้าข่า ใบพลู รากชะเอม เปลือกอบเชย ด้วยวิธีการหมักต่อเนื่องด้วยตัวทำละลาย2 ชนิดคือ เฮกเซน และ 95% เอทานอล

2. ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อราของสารสกัดพืชทั้ง 5 ชนิด โดยใช้วิธีการ agar disc diffusion

3. ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา ของสารสกัดพืชโดยใช้วิธี broth dilution method

4. ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา

   1) Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

   2) Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

5. เตรียมตำรับเจลที่มีส่วนประกอบของสารสกัดสมุนไพรในปริมาณที่แตกต่างกัน

6. ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อราของตำรับเจลที่มีสารสกัดสมุนไพร โดยวิธีการ Challenge test

7. ทดสอบความคงตัวของตำรับเจลโดยเก็บตัวอย่างในสภาวะสลับอุณหภูมิ Temperature cycling และอุณหภูมิห้อง ดูการเปลี่ยนแปลงของตำรับเจลโดยประเมินความคงตัวทางกายภาพและชีวภาพ

1.4 สมมติฐานของการศึกษา

1. ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดสมุนไพรมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อราของสารสกัดสมุนไพร

2. สารสกัดสมุนไพรพืชทั้ง 5 ชนิด มีฤทธิ์ในการเป็นสารกันเสียทดแทนสารกันเสียสังเคราะห์เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์เจล

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้รับข้อมูลสารสกัดสมุนไพรไปใช้เป็นสารกันเสียในเครื่องสำอางชนิดเจลทดแทนสารกันเสียสังเคราะห์

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากข้อมูลการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านหลายชนิดมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยสมุนไพรบางชนิดเมื่อนำมาสกัดได้สารสำคัญออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อราได้ และพบว่าการนำสมุนไพรมาสกัดหาสารสำคัญต้องใช้วิธีการสกัดและตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสารสำคัญในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และปริมาณการใช้สารสกัดเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมีความสำคัญเพื่อให้สามารถใช้ทดแทนสารกันเสียสังเคราะห์ได้

จากการศึกษาค้นคว้าข้อมูลครั้งนี้มีความสนใจในการนำสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง และควบคุมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางแทนสารกันเสียสังเคราะห์โดยใช้ตัวทำละลายแตกต่างกันในการสกัดสมุนไพร นำสมุนไพรที่ผ่านการสกัดมาตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เพื่อตรวจดูประสิทธิภาพในการควบคุม และยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมของสารสกัดสมุนไพรในการใช้เป็นสารกันเสียในตำรับเครื่องสำอางชนิดเจล และความคงตัวของเครื่องสำอางชนิดเจลที่มีส่วนผสมของสารสกัดสมุนไพร

2.1 พืชสมุนไพร

2.1.1 สมุนไพรเหง้าข่า

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Alpinia galanga (Linn) Swartz*

ชื่อวงศ์ Zingiberaceae

ชื่ออื่น Galangal กฏุกโรหิณี ข่าหยวก ข่าหลวง สะเอเชยและเสะเออเคย

ภาพที่ 1 สมุนไพรเหง้าข่า

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ พืชล้มลุกมีเหง้าใต้ดิน เหง้ามีข้อหรือปล้องเห็นได้ชัดใบเป็นใบเดี่ยวออกเรียงสลับกัน ใบรูปหอกมีปลายแหลมหรือรูปรีปลายใบแหลมขอบใบเรียบ ดอกเป็นช่อออกที่

ปลายยอด ก้านช่อมีผิวเกลี้ยง ดอกมีขนาดเล็ก ที่โคนกลีบดอกมีผลรูปกลมหรือรี สีแดงอมส้มเมื่อแก่จัดจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ภายในมี 2-3 เมล็ด

Rao K, et al. (2010) ศึกษาการสกัดข่าด้วยเมทานอล อะซิโตน และอีเทอร์ไดเอทธิลทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus subtilis* MTCC 2391, *Enterobacter aerogene, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* MTCC 1563, *Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* MTCC 6642, *Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus*และ *Streptococcus epidermis* โดยใช้วิธี agarwell diffussion เพื่อศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้ง (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) จากการศึกษาพบว่าสารสกัดในเมธานอลมีฤทธิ์ดีที่สุดต่อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบทุกชนิด โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วงระหว่าง 0.04 ถึง 1.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และช่วงระหว่าง 0.08 ถึง 2.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ในการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ของสารสกัดข่าในเมธานอลพบว่า สารออกฤทธิ์ประกอบด้วย 5-hydroxymethyl furfural (59.9%), 1, 8 cineole (15.65%), methylcinnamate (9.4%), 3-phenyl-2-butanone (8.5%) และ1, 2 benzenedicarboxylic acid (8.9%) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งทางจุลชีววิทยา

Oonemetta-aree, et al. (2006) ได้ศึกษาคุณสมบัติข่าในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยทำการสกัดข่าด้วยตัวทำละลายเอทานอลเปรียบเทียบกับสารสกัด ขิง ขมิ้น และกระชายด้วยการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายเช่นกัน ใช้วิธีการทดสอบแบบ agar disc diffusion assay ผลที่ได้มาพบว่าสารสกัดข่ามีโซนในการยับยั้งที่มากที่สุด (22.33±5.8 มิลลิเมตร) และการทดสอบโดยใช้วิธี broth dilution method แสดงค่า minimum inhibition concentration (MIC) เท่ากับ 0.325 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ ค่า minimum bactericidal concentration (MBC) เท่ากับ 1.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Prakatthagomol, et al. (2012) ได้ศึกษาการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของ ข่า ขิง และขมิ้นทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ปนเปื้อนในอาหาร โดยใช้สารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าพืชในการทดสอบ สารสกัดหยาบข่าสกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อ *Corynebacterium sp, Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* จำนวน 4 สายพันธุ์ สารสกัดหยาบขิงและขมิ้นสามารถยับยั้งเชื้อ *Corynebacterium sp*. เพียงอย่างเดียว ส่วนน้ำมันหอมระเหยของข่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ดีกว่าสารสกัดหยาบด้วยเอทานอล สารสกัดหยาบข่าด้วย เอทานอลหรือน้ำมันหอมระเหยข่าให้ประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในอาหารได้มากกว่าสารสกัดหยาบหรือน้ำมันหอมระเหยขิง และขมิ้น

2.1.2 ขิง

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Zingiber officinale Roscoe.*
ชื่อวงศ์	Zingiberaceae
ชื่ออื่น	ขิงแกลง, ขิงแดง, ขิงเผือก, สะเอ

ภาพที่ 2 สมุนไพรเหง้าขิง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ พืชล้มลุกขึ้นเป็นกอมีเหง้าใต้ดินเป็นข้อๆ เนื้อในสีขาวหรือเหลืองอ่อน ปลายสุดของข้อจะเป็นที่แทงยอดหรือลำต้นเทียม ใบรูปหอกปลายใบเรียวแหลม ดอกช่อทรงกระบอกแทงขึ้นมาจากเหง้ากลีบดอกสีเหลืองอมเขียวอุ้มน้ำและหลุดร่วงไว ผลแห้งแข็ง มี 3 พู

Singh, et al. (2008) ได้ทำการศึกษาสารสำคัญทางเคมีที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียของขิงในรูปของน้ำมันหอมระเหย และสารสกัดหยาบสกัดด้วยเอทานอล เมทิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และไอโซออกเทนสกัดโดยวิธี hydrodistillation และ ใช้ soxhlet ทำการวิเคราะห์สาระสำคัญด้วยเครื่อง GC-MS โดยการศึกษาพบ geranial (25.9%) เป็นส่วนประกอบสำคัญในน้ำมันหอมระเหยส่วน eugenol (49.8%) พบในสารสกัดหยาบด้วยเอทานอล ในขณะที่พบปริมาณ zingerone 33.6%, 33.3% และ 30.5% สกัดด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนเต-ตระคลอไรด์และไอโซออกเทนตามลำดับ ในการทดสอบทางจุลชีววิทยาของเชื้อราและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคพบว่าน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบขิงที่สกัดด้วยคาร์บอนเตตระคลอไรด์สามารถยับยั้ง Fusarium moniliforme ที่เป็นเชื้อก่อโรคได้ดี สำหรับเชื้อราและแบคทีเรียพบว่าในน้ำมันหอมระเหยขิงมีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดหยาบจากการวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วย GC–MS พบว่าสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เป็นสารในกลุ่ม phenolic compounds

Nooheet (2013) ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคพื้นผิวสัมผัสโดยใช้ส่วนของเหง้าสด 4 ชนิดของพืชตระกูลขิง ได้แก่ ขิง ข่า กระชาย และขมิ้นขาว โดยนำมาสกัดด้วยวิธีการกลั่น

ด้วยน้ำ และเมทานอลนำสารสกัดทั้ง 4 ชนิดมาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยทดสอบที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดขิง สามารถยังยั้งเชื้อ *S.aureus, E.coli* และ *P.aeruginosa* ได้ดีที่สุด มีค่า Minimal Inhibition Concentration เท่ากับ 50 100 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และมีค่า Minimal Bactericidal Concentration เท่ากับ 100 200 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การทดสอบความสามารถในการเป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียบนพื้นผิวปุ่มกดลิฟต์ในโรงพยาบาลพบว่า สารสกัดขิงสามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ร้อยละ 52.13 ถึง 94.95 เมื่อใช้สารสกัดเข้มข้น 50 ถึง 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อสัมผัสกับเชื้อเป็นเวลา 5 นาทีดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสามารถนำสารสกัดสมุนไพรธรรมชาติมาประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์กำจัดเชื้อก่อโรคพื้นผิวเพื่อลดการใช้สารเคมีอีกทางหนึ่ง

2.1.3 ใบพลู

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Piper betle Linn.*

ชื่อวงศ์ Piperaceae

ชื่ออื่น ใบปู, ล่ะบรู่, ปูเหละ, พลู, เปล้าอ้วน, ซีเก๊าะ,ดิ่อเจี่ย

ภาพที่ 3 สมุนไพรใบพลู

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้เลื้อยระบบรากฝอย (Fibrous root system) รากหาอาหารจะอยู่ในดินทำหน้าที่ดูดน้ำและอาหารจากดินมาเลี้ยงลำต้น มีรากขนาดใหญ่ประมาณ 6 ราก และมีรากแขนงแตกแยกออกไปเป็นวงกว้าง ส่วนรากยึดเกาะจะแตกออกตามข้อทำหน้าที่ยึดเกาะกับเสาหรือหลักหรือวัตถุค้ำยันเพื่อให้ลำต้นสูงขึ้นไปและไม่ให้ลำต้นหลุดร่วงออกรากชนิดนี้ไม่ทำหน้าที่หาอาหาร ใบเดี่ยวรูปไข่หรือรูปหัวใจฐานใบมนหรือค่อนข้างกลม ปลายใบแหลมผิวใบเรียบผิวใบด้านบนมีสีเขียวเข้มกว่าผิวใบด้านล่าง ดอกช่ออัดกันแน่น เมล็ดรูปร่างค่อนข้างกลมหรือยาวรีคล้ายรูปไข่

Dwivedi V, et al. (2016) รายงานว่าพลูเป็นพืชสมุนไพรที่มีสารสำคัญที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราได้ โดยพบว่า eugenol เป็นสารออกฤทธิ์ที่อยู่ในส่วนประกอบของใบพลูมีกลไกในการยับยั้งการแพ้ระคายเคือง และยับยั้งการเจริญของเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้

Wongtrakulkeao A, et al. (2015) ศึกษาผลของสารสกัดจากใบพลูที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสมุนไพร ครีมนวดหน้า และครีมขัดผิว โดยทำการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย ทั้งหมด 5 ชนิด *ได้แก่ Escherichia coli, Micrococcus aureus, Staphylococcus aureus, Pseudomonas sp.* และ *Bacillus spp.* และเชื้อราอีก 2 ชนิด *Aspergillus sp.* และ *Candida sp.* ผลที่ได้จากการทดสอบพบว่าประสิทธิภาพของสารสกัดพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้

2.1.4 อบเชย

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Cinnamomum cassia*
ชื่อวงศ์	Lauraceae
ชื่ออื่นๆ	เชียกใหญ่, จวงดง, เฉียด, ฝนเสน่หา, สมุลแว้ง, มหาปราบ

ภาพที่ 4 สมุนไพรเปลือกอบเชย

ที่มา: sanook.2017: ออนไลน์

ลักษณะทางพฤกศาสตร์ จัดเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางสูงได้ประมาณ 10 ถึง 15 เมตร เปลือกลำต้นหนาและเป็นสีเทาเข้มมีรอยแตกตามยาว เปลือกลำต้นมีรูปรูปกลมรีเนื้อในเปลือกเป็นสีแดงเข้มมีกลิ่นหอมและมีรสหวานตามกิ่งอ่อนเป็นเหลี่ยม ใบอบเชยจีนออกเรียงสลับ ลักษณะของใบเป็นรูปรีหลายแหลม ออกดอกเป็นช่อที่ปลายกิ่งหรือง่ามใบ ผลมีลักษณะเป็นรูปกลมรีขนาดเท่าเมล็ดถั่วลันเตา ผลเมื่อสุกจะเป็นสีม่วงเข้ม

Zhang, et al. (2015) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่พบในอาหารและแบคทีเรียก่อโรคโดยใช้เชื้อในการศึกษาคือ *Escherichia coli* และ *Staphy lococcus aureus* ค่าความเข้มข้นการยับยั้งแบคทีเรียต่ำที่สุด (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยอบเชยสำหรับแบคทีเรียทั้งสองชนิดเท่ากับ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ

แบคทีเรีย (MBC) เท่ากับ 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรตามลำดับ และในการวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่าสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยอบเชยมี cinnamaldehyde เป็นส่วนประกอบสำคัญ (92.40%) โดยพบว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *E.coli* และ *S.aureus* โดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของเซลล์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดตรวจวัดความสามารถในการซึมผ่านของเซลล์ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และศักยภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ ภายหลังจากเพิ่มปริมาณน้ำมันหอมระเหยอบเชยในระดับความเข้มข้น MIC พบว่า สัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน โดยพบว่า *S.aureus* จะเกิดการเปลี่ยนแปลงมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ *E.coli*

Lu fai, et al. (2011) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยอบเชยร่วมกับน้ำมันหอมระเหยโหระพาและน้ำมันหอมระเหยกานพลูโดยใช้วิธี agar dilution เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยอบเชย โหระพา และกานพลูโดยทดสอบกับแบคทีเรีย แกรมบวก *Bacillus subtilis, Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า อบเชยมีแนวโน้มที่ดีต่อการต้านแบคทีเรียมีค่า MIC ในช่วง 0.1 ถึง 0.4 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรสำหรับแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด นอกจากนี้ยังใช้เครื่องตรวจวัดแก๊สโครมาโตกราฟี (GC-MS) เพื่อวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยและส่วนประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยอบเชยประกอบด้วย cinnamaldehyde, thymol, carvacrol

2.1.5 ชะเอมเทศ

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Glycyrrhiza glabra L.*
ชื่อวงศ์	Fabaceae
ชื่ออื่นๆ	Licorice, กำเช่า กำเช้า (จีน-แต้จิ๋ว), กันเฉ่า (จีนกลาง) เป็นต้น

ภาพที่ 5 สมุนไพรรากชะเอมเทศ

ที่มา: heath.kapook. 2015: ออนไลน์

ลักษณะทางพฤษศาสตร์ มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีนจัดเป็นไม้พุ่มที่มีอายุนาน มีลำต้นสูงประมาณ 1-2 เมตร ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก ออกเรียงสลับกัน มีใบย่อยประมาณ 9 ถึง 17 ใบ มีสีเขียวอมเหลือง ส่วนก้านใบย่อยจะสั้น ผลมีลักษณะเป็นฝักแบนผิวภายนอกมีลักษณะเรียบ

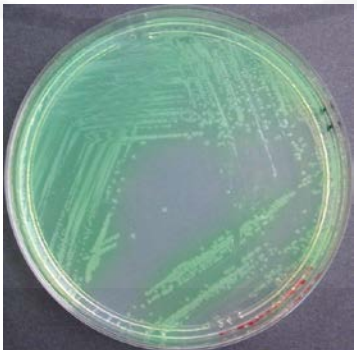
Zadeh J, et al. (2013) รายงานพบว่าสมุนไพรชะเอมเทศเป็นสมุนไพรที่มีคุณสมบัติทางยาในการรักษาโรคมากมาย มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการอักเสบและสามารถลดน้ำตาลในเลือดได้ การวิเคราะห์สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในชะเอมเทศ พบว่าประกอบด้วย glabridin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มสารฟวาโวนอยด์

Abbas A, et al. (2016) ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P.multocida, E.coli, B.subtilis* และ *S.aureus* และเชื้อรา *A.flavus, A.niger* และ *R.solani* โดยวิธีการสกัดด้วยเมทานอล แอทิลอะซีเตด คลอโรฟอร์ม และเฮกเซนทดสอบด้วยวิธี disc diffusion method และ minimum inhibitory concentration สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ทุกชนิด

2.2 แบคทีเรียก่อโรคทางผิวหนัง

กระทรวงสาธารณสุขได้ออกกฎหมายการควบคุมเครื่องสำอาง โดยการห้ามให้เครื่องสำอางปนเปื้อนที่ตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขเรื่องกำหนดการผลิต นำเข้า หรือขาย พ.ศ. 2558 ตามความในมาตรา 5 และ 6(1) ข้อ 1 ให้เครื่องสำอางที่มีคุณสมบัติทาง จุลชีววิทยาตามที่กำหนดไว้ดังต่อไปนี้เป็นเครื่องสำอางห้ามผลิต นำเข้า หรือขาย เครื่องสำอางที่ตรวจพบจุลินทรีย์ที่ทำให้ก่อโรค *Pseudomonas aeruginosa Staphylococcus aureus Candida albicans Clostridium spp.* (เฉพาะเครื่องสำอางผสมสมุนไพร)

ภาพที่ 6 เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*



ที่มา: Researchgate (2014): ออนไลน์

2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแท่ง เจริญโดยใช้ออกซิเจน เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Pseudomonadaceae สามารถเคลื่อนที่ได้โดย flagellum 1 เส้นที่ติดอยู่ตรงหัว ปกติจะพบกระจายในดิน น้ำ ขยะ หรือในพืช และเป็น normal flora ในลำไส้คน *P.aeruginosa* สามารถทำให้เกิดโรคในคนได้รวมทั้งสัตว์ แมลงและต้นไม้ได้ ลักษณะโคโลนี *P.aeruginosa* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Cetrimide agar (CMA) รูปร่างโคโลนีมีสีเขียว

P.aeruginosa เป็นเชื้อโรคฉวยโอกาสจะทำให้เกิดการติดเชื้อกับผู้ที่ภูมิคุ้มกันต่ำหรือป่วยมากๆ หรือผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในโรงพยาบาล บางทีจึงเรียกโรคติดเชื้อที่เกิดจาก *P.aeruginosa* ว่าโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล *P.aeruginosa* เป็นสาเหตุอันดับสองในการทำให้เกิดโรคปอดบวมในโรงพยาบาล และเป็นสาเหตุส่วนใหญ่ในการก่อให้เกิดโรคปอดบวมในห้อง ICU โรคติดเชื้อจาก *P.aeruginosa* สามารถแพร่กระจายภายในโรงพยาบาลโดยบุคลากร อุปกรณ์การแพทย์ ผิวหนัง น้ำยาฆ่าเชื้อ และอาหารโรคติดเชื้อนี้เป็นปัญหาที่รุนแรงมากในโรงพยาบาลเนื่องจากผู้ป่วยซึ่งมีอาการหนักอาจจะเสียชีวิตเนื่องจากโรคติดเชื้อจาก *P.aeruginosa* และดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากทำให้ยากต่อการรักษาสามารถติดเชื้อได้หลายระบบในร่างกายเนื่องจากมีหลายปัจจัยในการก่อให้เกิด เช่น ความสามารถในการเกาะยึดติดกับเยื่อบุผิว ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ หรือสร้างโปรตีนที่มาทำลายเนื้อเยื่อ *P.aeruginosa* สามารถทำให้คนสุขภาพที่ดีติดเชื้อได้มาจากการอาบน้ำ หรือเล่นน้ำในสระว่ายน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ ซึ่งโรคติดเชื้อ *P.aeruginosa* ที่ผิวหนังนี้มักเกิดการสับสนกับโรคอีสุกอีใส และจะเกิดอาการรุนแรงได้กับผู้ที่เชื้อในกระแสเลือดร่วมด้วย *P.aeruginosa* เป็นสาเหตุอันดับสองในการก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในบาดแผลไฟไหม้ในผู้ป่วยที่พักรักษาตัวที่โรงพยาบาล

ภาพที่ 7 เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

ที่มา: Anders Noren. (2019): ออนไลน์

2.2.2. *Staphylococcus aureus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่นหรือ เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ไม่เคลื่อนที่ *S.aureus* อยู่ในตระกูล Micrococcaceae เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก สร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase) เจริญเติบโตได้ดีในสภาพมีออกซิเจนมากกว่าในสภาพไม่มีออกซิเจน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตคือ 35 ถึง 40 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเติบโตอยู่ที 7 ถึง 7.5 ส่วนค่า Aw (ความชื้นที่มีผลต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์) ต่ำสุดสำหรับการเติบโตในสภาพมีออกซิเจนประมาณ 0.86 สภาพไม่มีออกซิเจนประมาณ 0.90 ลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol salt agar (MSA) มีสีเหลืองเข้มหรือสีเหลืองทอง เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจะมีลักษณะเป็นสีขุ่นค่อนข้างใส ตกตะกอนและเกิดวงสีเหลืองที่ด้านบนของอาหารเหลว

S.aureus เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคที่สำคัญทางผิวหนัง เช่น การติดเชื้อของแผลผ่าตัด แผลอักเสบ เป็นต้น คนที่เป็นพาหะของเชื้อนี้ไม่ได้พบเฉพาะกับคนที่กำลังเป็นโรคจากการติดเชื้อนี้เท่านั้น แต่พบในคนที่มีสุขภาพดีด้วย นอกจากนี้เชื้อ *S.aureus* ยังพบตามส่วนอื่นๆ ของร่างกายได้อีก เช่น ผิวหนัง ในจมูก คอ และผมบางครั้งอาจพบได้ในอุจจาระหรือจมูกเป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนในอาหารโดยพบในรูจมูกร้อยละ 10 ถึง 40 และพบในโพรงจมูก

เชื้อ *S.aureus* ก่อให้เกิดการอักเสบแบบเป็นหนอง ผุพอง (pyogenic inflammation) ร่วมกับมีการทำลายเนื้อเยื่อเฉพาะที่ โรคติดเชื้อ *S.aureus* ที่พบบ่อยนั้นมักเกิดที่บริเวณผิวหนังโดยมักพบว่าเป็นการอักเสบบริเวณรอบรูขุมขน (hair follicles) หากการอักเสบเป็นหนองของรูขุมขนก็จะเรียกว่า folliculitis แต่ถ้าการอักเสบนั้นลุกลามมากขึ้นจะกลายเป็นหนองที่ผิวหนังและเนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนังก็จะเรียกว่า furuncle หรือ boil มักพบบ่อยตรงบริเวณผิวหนังที่อับชื้น เช่น ใบหน้า รักแร้ขาหนีบ ใต้ราวนม เป็นต้น บริเวณที่เป็นหนองอาจจะเกิดการรวมกันใหญ่ขึ้นและแตกออกมาที่ผิวหนังด้านนอกได้หากการอักเสบมีการลุกลามไปยังชั้นผังผืดใต้ผิวหนัง และกลายเป็นโพรงหนองซึ่งทำให้ปะทุออกที่ผิวหนังด้านนอก จะเรียกว่า ฝีฝักบัว (carbuncles) ซึ่งตำแหน่งที่พบบ่อยได้แก่ หลังส่วนบน และคอด้านหลัง นอกจากนี้เชื้อยังทำให้เกิดการอักเสบเรื้อรังของต่อมไขมันโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่บริเวณรักแร้ที่ เรียกว่า hidradenitis suppurativa

ภาพที่ 8 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

ที่มา: Microbeonline. (2013): ออนไลน์

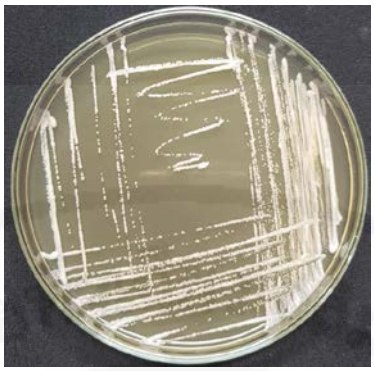
2.2.3 *Escherichia coli*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เป็นจีนัสที่อยู่ในตระกูลเอนเทอโรแบคทีริเอซี (Family Enterobacteriaceae) ลักษณะเป็นเซลล์รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ อาจเคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลา หรือไม่เคลื่อนที่เป็นพวก facultativelyanaerobic ในการเพาะเลี้ยงในอาหาร Eosin methyleneblueagar (EMB) โคโลนีมีสีมันวาวเขียวปีกแมลงทับ (metallic sheen) เชื้อนี้เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้างตั้งแต่ 15 ถึง 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ทนความร้อนได้ถึง 60 องศาเซลเซียส 15 นาที หรือ 55 องศาเซลเซียส 60 นาที

E.coli เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่นโดยปกติจะไม่ทำอันตรายหรือก่อโรคร้ายแรงเมื่ออยู่ในลำไส้จะมีหน้าที่ช่วยย่อยอาหารที่รับประทานเข้าไปแต่ถ้าเชื้อ *E.coli* ได้เข้าสู่ระบบต่างๆ ของภายในร่างกายอาจทำให้เกิดโรคติดเชื้อรุนแรง เช่น โรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด เชื้อ *E.coli* บางสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงได้โดยการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารหรือน้ำดื่ม เชื้อ *E.coli* ทำให้เกิดอาการท้องร่วงแบบเฉียบพลันถ่ายเหลวเป็นน้ำโดยปกติแล้วเชื้อ *E.coli* จะอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและยังอาศัยอยู่ในสัตว์ เช่น สุกร โค กระบือ เชื้อจะถูกขับผ่านออกมากับอุจจาระสัตว์ ถ้าสัตว์ถ่ายอุจจาระลงดินหรือแหล่งน้ำซึ่งใช้เป็นแหล่งเพาะปลูกหรืออุปโภค บริโภค เชื้อถูกปนเปื้อนไปกับผลผลิต และน้ำดื่มเข้าสู่ร่างกายคนโดยการรับประทาน นอกจากนี้เชื้อยังสามารถติดต่อจากผู้ป่วยสู่คนอื่นได้โดยตรง (person to person contact)

ในการติดเชื้อทางผิวหนังส่วนใหญ่ของเชื้อ *E.coli* เชื้อจะทำการปล่อยสารพิษทำลายเนื้อเยื่อผิวหนัง และกล้ามเนื้อจนส่งผลให้เซลล์เนื้อเยื่อตายโดยเชื้อแบคทีเรียสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ทั้งทางผิวหนังหรือกระแสเลือดผ่านทางบาดแผล แผลถลอก รอยข่วน แมลงกัดต่อย การใช้เข็มฉีดยา หรือแผลผ่าตัด

ภาพที่ 9 เชื้อรา *candida albicans*

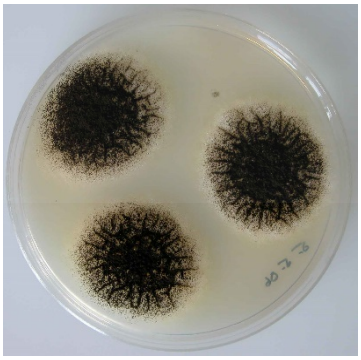


2.2.4 *Candida albicans*

ลักษณะมีรูปร่างเป็นเซลล์กลมๆ หรือเรียกว่า ยีสต์ (Yeast) จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota วงศ์ Saccharomycetacea ในการเพาะเลี้ยงในอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) โคโลนีมีสีขาว เจริญได้ในอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

โรคติดเชื้อแคนดิดา เป็นผื่นที่ผิวหนังและเยื่อบุต่างๆที่เกิดจากเชื้อยีสต์กลุ่มแคนดิดา ส่วนใหญ่มักเกิดจากเชื้อ *C.albicans* ก่อให้เกิดโรคในผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยง ได้แก่ ผู้ป่วยที่มีแผลถลอกอับชื้น การได้รับยาปฏิชีวนะหลายๆชนิด หรือออกฤทธิ์กว้างการขาดธาตุเหล็ก โรคเบาหวาน Cushing syndrome ภาวะตั้งครรภ์ การได้รับยาคุมกำเนิดหรือในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันผิดปกติ เช่น เอดส์ ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน หรือเป็นโรคเรื้อรังอื่นๆ โรคติดเชื้อแคนดิดาที่บริเวณผิวหนังใกล้อวัยวะเพศ บริเวณที่พบบ่อยในการเกิดโรค ได้แก่ บริเวณขาหนีบ ร่องก้น โดยเฉพาะในคนอ้วนเนื่องจากผิวหนังในบริเวณนี้มีความอบอุ่นและอับชื้นมากกว่า ทำให้มีโอกาสติดเชื้อได้ง่ายมากขึ้น ลักษณะเป็นผื่นแดง คัน แฉะ เปื่อยลอก มีตุ่มแดงขนาดเล็กหรือตุ่มหนองกระจายอยู่ที่บริเวณขอบของผื่นซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะ

ภาพที่ 10 เชื้อรา *Aspergillus brasiliensis*



ที่มา: Paul C. (2013): ออนไลน์

2.2.5 *Aspergillus brasiliensis*

ลักษณะรูปร่างเป็นเซลล์กลม จัดเป็นราในกลุ่ม Ascomycete's โคโลนีเป็นวงซ้อนกันสีดำ เส้นใยมีลักษณะเป็นสีขาวมีผนังกั้นตามขวาง เป็นเชื้อราที่พบได้ทั้งในรูปของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและแบบอาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ เรียกว่า condinia brasiliensis จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อโรคฉวยโอกาสมักจะพบในระบบภูมิคุ้มกันต่ำจากการปลูกถ่ายอวัยวะ รับยากดภูมิคุ้มกัน รับยากลุ่มในสเตียรอยด์ชนิดกินเป็นเวลานาน ผู้ป่วยเบาหวาน และผู้ติดเชื้อเอชไอวี เป็นต้น ซึ่งทำให้เกิดอาการรุนแรงมากเพิ่มขึ้น และมีภาวะแทรกซ้อน

2.3 สารกันเสีย (preservative)

สารกันเสีย เป็นสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อราที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิตจนขั้นตอนใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์มักพบได้ทั่วไปไม่ว่าจะเป็น บริเวณผิวหนัง อากาศรอบๆตัวและในน้ำดื่มจึงเป็นเรื่องง่ายที่จุลินทรีย์จะปนเปื้อนเข้าไปในเครื่องสำอางเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการเน่าเสียหรือทำให้สารเคมีในเครื่องสำอางเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะเครื่องสำอางที่มีส่วนประกอบของน้ำในปริมาณมากและเมื่ออยู่ในอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีอาหารเพียงพอกับการเจริญของจุลินทรีย์จะทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว การใส่สารกันเสียลงในผลิตภัณฑ์นั้นจึงเป็นการทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ไม่ให้เกิดการเจริญขึ้นในผลิตภัณฑ์และยังช่วยยืดอายุของผลิตภัณฑ์ให้ยาวนานขึ้นเหตุผลสำคัญสำหรับการใช้สารกันเสียคือการป้องกันด้านสุขภาพและความปลอดภัยของผู้บริโภคโดยลดความเสี่ยงจากผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์

สารกันเสียที่นิยมใช้ในเครื่องสำอางแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) สารกันเสียสังเคราะห์ ได้แก่ พาราเบน ฟีน็อกซี่เอทานอล เบนซิลแอลกอฮอล์ และไอโซไทอะโซลิโนน สารกันเสียกลุ่มนี้ในปัจจุบันพบว่าอาจก่อให้เกิดอาการแพ้ได้ในผู้ใช้ผลิตภัณฑ์บางราย 2) สารกันเสียจากธรรมชาติ ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชบางชนิด โดยทั่วไปสารกันเสียสังเคราะห์จะมีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์สูงกว่าสารกันเสียจากธรรมชาติ และสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด ทั้งแกรมบวก แกรมลบ รวมถึงเชื้อราและยีสต์ทำให้เครื่องสำอางที่ใส่สารกันเสียสังเคราะห์มีอายุการเก็บได้นาน แต่สารกันเสียสังเคราะห์อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงกับผิวที่แพ้ง่าย เช่น คัน แสบ ร้อน บวมแดงเป็นผื่น เป็นต้น จึงต้องมีการกำหนดค่าความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางได้ และปัจจุบันพบว่ามีจุลินทรีย์ดื้อต่อสารกันเสียสังเคราะห์ จึงทำให้มีการศึกษาค้นคว้าหาสารกันเสียทางเลือกใหม่หนึ่งในทางเลือกนั้น คือการใช้สารกันเสียจากธรรมชาติที่มีความเหมาะสมสำหรับใช้ในเครื่องสำอาง

สารกันเสียที่เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางต้องมีฤทธิ์ควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ได้ตลอดระยะเวลาที่ใช้ผลิตภัณฑ์ต้องสามารถทำลายหรือควบคุมปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนในระหว่างการใช้เครื่องสำอางได้ในระหว่างใช้เครื่องสำอางมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายทาง ได้แก่ การแบ่งเครื่องสำอางออกมาใช้ การใช้นิ้วมือที่ไม่สะอาดสัมผัสครีม และการใช้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีบางส่วนของภาชนะบรรจุสัมผัสกับผิวหนังทุกครั้งระหว่างการใช้ เช่น แปรงมาสคาร่าปัดขนตาหรือลูกกลิ้งของผลิตภัณฑ์ทาใต้วงแขน เนื่องจากผิวหนังและขนตามีจุลินทรีย์อาศัยอยู่ตามธรรมชาติ หรือการเติมน้ำประปาผสมลงในเครื่องสำอาง น้ำประปาไม่ได้ปราศจากจุลินทรีย์มากนัก และยังเป็นการเจือจางความเข้มข้นของสารกันเสียให้ต่ำลงทำให้ประสิทธิภาพการต้านจุลินทรีย์ลดลงเช่นกัน ผู้ผลิตเครื่องสำอางระดับอุตสาหกรรมจึงต้องทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารกันเสียในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนในระหว่างการใช้เครื่องสำอาง เพื่อให้ผู้ใช้ผลิตภัณฑ์ปลอดภัยจากการใช้เครื่องสำอาง

ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารกันเสียสามารถทดสอบโดยวิธี challenge test เป็นการประเมินประสิทธิภาพของสารที่นำมาเป็นสารกันเสียในเครื่องสำอางเพื่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ ตามมาตรฐานที่กำหนด ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถพบในเครื่องสำอางที่มีสารกันเสียที่เราทดสอบต้องอยู่ในเกณฑ์ที่มาตรฐานกำหนด

2.4 เจล (gel)

เจล เป็นรูปแบบผลิตภัณฑ์กึ่งแข็งที่ประกอบด้วยการกระจายตัวของสารอนินทรีย์ขนาดเล็ก (small inorganic particle) หรือสารประกอบอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ (organic particle) โดยมีน้ำแทรกอยู่ในโครงสร้าง

การแบ่งชนิดของเจล แบ่งตามชนิดของตัวทำละลายได้ 2 ชนิด 1) เจลน้ำ (aqueous gel) เป็นเจลที่มีตัวทำละลายเป็นน้ำ เจลชนิดนี้มีการปลดปล่อยตัวยาที่ดี ท่าง่าย ไม่เหนียว 2) อินทรีย์เจล (organic gel) เป็นเจลที่มีตัวทำละลายเป็น non aqueous solvent เช่น plastibase เกิดจาก polyethylene ที่มี molecular weight ต่ำๆ ละลายใน mineral oil (น้ำมัน)

1.1 การประเมินลักษณะของเจล

1. การประเมินลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ความหนืด ลักษณะของเนื้อเจล สี กลิ่น การกระจายตัวบนผิวหนัง ความใส และ ความเป็นกรด-ด่าง

2. ความคงตัว (stability) เจลที่ดีต้องมีความคงตัว ประกอบด้วย ความคงตัวทางเคมีและความคงตัวทางกายภาพ ซึ่งสามารถทดสอบความคงตัวของเจลได้โดย วิธี freeze-thaw cycling ในการเสื่อมสภาพของเจลจะมีผลต่อประสิทธิภาพของสารสำคัญที่เป็นส่วนผสมโดยลักษณะการเสื่อมสภาพของเจลแสดงถึงความไม่คงตัวของตำรับในลักษณะต่อไปนี้

2.1) การตกตะกอน (sedimentation) เกิดจากการไม่เข้ากันของตัวสารสำคัญ เช่น ตัวยา สารกันเสีย สารลดแรงตึงผิว อาจเกิดขึ้นทันทีหรือหลังจากที่เก็บไว้ระยะหนึ่งแล้ว

2.2) การหดตัว (syneresis) เจลบางชนิดจะหดตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ ทำให้ของเหลวที่แทรกตัวอยู่ระหว่างอนุภาคโมเลกุลของสารก่อเจลแยกตัวออกมาอยู่บนผิวหน้าของเนื้อเจล

2.3) คุณสมบัติการไหล (rheology) ปกติเจลจะมีการไหลแบบ pseudoplastic เมื่อมีแรงกวนหรือเขย่าความหนืดจะถูกลดลงเทได้สะดวกขึ้น ถ้าเจลเสื่อมสภาพคุณสมบัติการไหลจะเสียไป

1.2 ส่วนประกอบพื้นฐานของตำรับเจล

1. ตัวยาสำคัญ (active ingredients) เป็นตัวยาสำคัญในตำรับที่ออกฤทธิ์ในการรักษาหรือบำรุงในการพัฒนา ตำรับเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความคงตัวที่ดีทั้งทางกายภาพและทางเคมีต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของตัวยาสำคัญเพื่อให้ตัวยามีประสิทธิภาพที่ดี การละลาย ความเป็นกรด-ด่างและการเข้ากัน

2. สารก่อเจล (gelling agent) สารเหล่านี้ในความเข้มข้นที่เหมาะสมจะทำหน้าที่เป็นสาร ก่อเจล แบ่งเป็นประเภทต่างๆ ได้แก่ สารก่อเจลจากธรรมชาติ (natural gelling agent) เป็นสารก่อเจลที่พบได้ตามธรรมชาติ สารก่อเจลกึ่งสังเคราะห์ (semisynthetic gelling agent) เป็นอนุพันธ์ของ cellulose สารก่อเจลสังเคราะห์ (synthetic gelling agent) สารก่อเจลกลุ่มนี้เป็นที่นิยมใช้มากที่สุด เช่น polyacrylamide, polyvinyl alcohol, polyxamer, carbopol

3. น้ำบริสุทธิ์ (purified water) กระบวนการผลิตเจลนิยมใช้น้ำกรองบริสุทธิ์ (reverse osmosis) น้ำกลั่นหรือ deionized water ในการเตรียมเจลเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความคงตัวที่ดี เป็นน้ำที่ลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และประจุในน้ำน้อย

4. สารกันเสีย (preservative) สารกันเสียจะทำหน้าที่ป้องกันการเสื่อมสภาพของเจลจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์และปนเปื้อนระหว่างการใช้งานเช่น methyl paraben, propyl paraben และ phenoxyethanol

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

การดำเนินงานวิจัยครั้งนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลองภายใต้วัตถุประสงค์ในการศึกษาเพื่อคัดเลือกสารสกัดสมุนไพรที่มีสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา รวมถึงการตั้งตำรับในรูปแบบเจลที่มีส่วนประกอบของสมุนไพรที่ผ่านขั้นตอนการคัดเลือก ในการเป็นสารกันเสียธรรมชาติแทนสารกันเสียสังเคราะห์ดังนี้

3.1 สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.2 เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ

3.3 วิธีวิจัย

3.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดสมุนไพรในตำรับเจล

3.5 การทดสอบความคงตัว

3.1 สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.1 สารเคมี

1) บัตเตอฟิวส์ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (Butterfield’s phosphate buffer)

2) คาร์โบเมอร์ 940 (Carbomer 940)

3) ไดเมททิล ซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide,DMSO)

4) น้ำปราศจากอิออน (Deionized water)

5) เอทานอล (Ethanol)

6) กลีเซอรีน (Glycerin)

7) เฮกเซน (Hexane)

8) ยาปฏิชีวนะไอทราโคนาโซล (Itraconazole)

9) ยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน (Streptomycin)

10) เรซาซูริน (Resazurin)

11) ไตรเอทาโนลามีน (Triethanolamine)

12) อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Tryptic soy agar (TSA) สำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย

2. Sabouraud Dextrose Agar (SDA) สำหรับเลี้ยงเชื้อรา

3. Mueller Hinton Agar (MHA) สำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย และเชื้อรา

13) พืชสมุนไพรเปลือกอบเชย ใบพลู เหง้าขิง เหง้าข่า และรากชะเอมเทศ

3.1.2 อุปกรณ์

1) เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator)
2) เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drier)
3) บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 250, 500 และ1000 มิลลิลิตร
4) จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (plate)
5) แท่งแก้วรูปตัวแอล
6) กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman filter paper)
7) ขวดรูปชมพู่ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร
8) ปิเปต, ไมโครปิเปต
9) หลอดทดลอง
10) Syringe filter membrane 0.45 ไมโครเมตร
11) Cork borer No.2
12) จานเพลท 96 หลุม (96-well plate)
13) ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อ (Incubator)
14) เครื่องฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave)
15) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet)
16) เครื่องวัดความหนืด (Brookfield ViscometerDVII)
17) เครื่องสเปคโทรโฟโทมิเตอร์ (Spectrophotometer)
18) ฮีมาไซโตมิเตอร์

ตารางที่ 1 รายละเอียดของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษา

สมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์	ส่วนที่ใช้	แหล่งที่มา
ข่า Galangal	*Alpinia galangal*	Zingiberacae	เหง้า (สด)	ชลบุรี
ขิง Ginger	*Zingiberofficinale*	Zingiberacae	เหง้า (สด)	ชลบุรี
พลู Betel	*Piper betle Linn.*	Piperaceae	ใบ (สด)	ลพบุรี
อบเชย Cinnamon	*Cinnamomum bejolghota*	Lauraceae	เปลือก (อบแห้ง)	นนทบุรี
ชะเอมเทศ Licorice	*Glycyrrhiza glabra L.*	Fabaceae	ราก (อบแห้ง)	นนทบุรี

3.2 เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียยีสต์และเชื้อราได้รับความอนุเคราะห์จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466(ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027), *Escherichia coli* ATCC 7839, *Candida albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201) และ *Aspergillus brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404)

3.3 วิธีวิจัย

3.3.1 การสกัดสมุนไพร

การสกัดสมุนไพรทำโดยการหมักด้วยตัวทำละลาย นำสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มาชนิดละ 2 กิโลกรัม นำมาหั่นให้เป็นชิ้นส่วนเล็กๆ (ส่วนที่ใช้ของสมุนไพรตามตารางที่ 3.1) และนำไปหมักด้วยเฮกเซน เป็นเวลา 3 วัน และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ทำการหมักซ้ำ 3 รอบและนำสารสกัดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจากนั้นนำพืชสมุนไพรที่ผ่านการหมักด้วยเฮกเซนตากให้แห้งและทำการหมักด้วย 95% เอทานอล เป็นเวลา 3 วันและกรองกากสมุนไพรออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ทำซ้ำ 3 รอบ นำสารสกัดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ชั่งน้ำหนักสารสกัดแห้งที่ได้และคำนวณหาปริมาณเนื้อสารที่สกัดได้ (% yield) และนำสารสกัดที่ได้เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อศึกษาการทดลองต่อไป

3.3.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อราของสารสกัดสมุนไพร

1) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเพาะจุลินทรีย์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA สำหรับแบคทีเรีย อาหารเลี้ยงเชื้อ SDA สำหรับยีสต์ และเชื้อรา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อที่เจริญแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อลงใน Butterfield's phosphate buffer วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ปรับความเข้มข้นของเชื้อเพื่อให้ได้ค่าดูดกลืนแสงที่ 10^8 cfu/mL สำหรับเชื้อรานับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์นับจำนวนปรับปริมาณเชื้อราประมาน 10^6 cfu/mL

2) การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

นำสารสกัดหยาบสมุนไพรที่สกัดด้วยเฮกเซนมาละลายด้วย DMSO และกรองผ่าน syringe filter membrane 0.45 ไมโครเมตร ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร (เฮกเซน) 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบสมุนไพรสกัดด้วยเอทานอลทำเช่นเดียวกันกับสารสกัดเฮกเซน

3) ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อด้วยวิธี Agar well diffusion

นำไม้พันสำสีที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุ่มลงในหลอดที่มีเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^8 cfu/mL ส่วนยีสต์ และเชื้อราประมาณ 10^6 cfu/mL จากนั้นทำการป้ายเชื้อลงบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ให้ทั่ว ทิ้งไว้ให้แห้งและเจาะหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย cork borer ปิเปตสารละลายของสารสกัดสมุนไพรลงไปหลุมละ 80 ไมโครลิตร โดยให้ DMSO เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการทดลองดูการเกิดของโซนยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อราโดยวัดโซนในการยับยั้งที่เกิดขึ้นแนวตั้ง แนวนอน แนวเอียง แล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย (Mean) (หน่วยมิลลิเมตร) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและนำสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งไปทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ต่อไป

3.3.3 วิธีการทดสอบการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการใช้ทดสอบให้ได้ความเข้มข้น 10^8 cfu/mL และเชื้อรา ยีสต์ที่ต้องการใช้ทดสอบให้ได้ความเข้มข้น 10^6 cfu/mL และเตรียมสารสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วยเฮกเซนให้ได้ความเข้มข้น 10 mg/mL ส่วนสารสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/mL จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB สำหรับแบคทีเรียและ SDB สำหรับยีสต์และเชื้อราลงใน 96-well plate ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร ปิเปตสารละลายของสารสกัดสมุนไพรที่ผ่านการคัดเลือกลงใน 96-well plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำการเจือจางความเข้มข้นตามลำดับโดยการดูดสารละลายจากหลุมที่ 1 มาปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมลงในหลุมที่ 2 จากนั้นปิเปตสารละลายปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำต่อมาจนถึงหลุมที่ 10 และในหลุมที่ 10 ดูดทิ้งไปปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อราที่เตรียมไว้ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยทดสอบเปรียบเทียบกับตัวควบคุม positive control คือ Streptomycin สำหรับเชื้อแบคทีเรีย, Itraconozole สำหรับเชื้อรา และ negative control คือ DMSO อัตราส่วนปริมาณและความเข้มข้นตามตารางที่ 3.2-3.4 บ่ม 96-well plate ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมเรซูริน ปริมาตร 10 ไมโครลิตรทุกหลุม บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และดูการเปลี่ยนแปลงของสีอ่านผลการทดลองสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นสีชมพู แสดงว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ ถ้าพบว่าสีน้ำเงินแสดงว่าเชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยสารสกัดสมุนไพร)

ตารางที่ 2 การเตรียมสารละลายของสารสกัดสมุนไพรในเฮกเซนในการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์* (MIC) ในสารละลายเฮกเซน โดยวิธี broth dilution method

หลุมที่	ปริมาณอาหารเพาะเชื้อ MHB/SDB (µL)	ปริมาณสารสกัดหยาบสมุนไพร (µL) (10 mg/mL)	ปริมาณเชื้อทดสอบ (µL)*	ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/mL)
1	-	50	50	5
2	50	50	50	2.50
3	50		50	1.25
4	50		50	0.625
5	50		50	0.313
6	50		50	0.156
7	50		50	0.078
8	50		50	0.039
9	50		50	0.020
10	50		50	0.010
11	50	ปิเปตทิ้งไป 50 µl	50	0.005
12	50		50	-

(*) เชื้อที่ใช้ทดสอบ 5 ชนิด *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* TISTR 5779และ *Aspergillus brasiliensis* DMST 15538

ตารางที่ 3 การเตรียมสารละลายของสารสกัดสมุนไพรในเฮกเซนในการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์* (MIC) ในสารละลายเอทานอล โดยวิธี broth dilution method

หลุมที่	ปริมาณอาหารเพาะเชื้อ MHB/SDB (µL)	ปริมาณสารสกัดหยาบสมุนไพร (µL) (100mg/mL)	ปริมาณเชื้อทดสอบ (µL)*	ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/mL)
1	-	50	50	50
2	50	50	50	25
3	50		50	12.5
4	50		50	6.25
5	50		50	3.15
6	50		50	0.156
7	50		50	0.780
8	50		50	0.390
9	50		50	0.20
10	50		50	0.10
11	50	ปิเปตทิ้งไป 50 µl	50	0.05
12	50		50	-

(*) เชื้อที่ใช้ทดสอบ 5 ชนิด *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* TISTR 5779และ *Aspergillus brasiliensis* DMST 15538

ตารางที่ 4 การเตรียมสารละลายของสารสกัดสมุนไพรในเฮกเซนในการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์* (MIC) ในยาปฏิชีวนะ โดยวิธี broth dilution method

หลุมที่	ปริมาณอาหารเพาะเชื้อ MHB/SDB (µL)	ปริมาณยาปฏิชีวนะ (µL) (10mg/mL)	ปริมาณเชื้อทดสอบ (µL)*	ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/mL)
1	-	50	50	5
2	50	50	50	2.50
3	50		50	1.25
4	50		50	0.625
5	50		50	0.313
6	50		50	0.156
7	50		50	0.078
8	50		50	0.039
9	50		50	0.020
10	50		50	0.010
11	50	ปิเปตทิ้งไป 50 µl	50	0.005
12	50		50	-

(*) เชื้อที่ใช้ทดสอบ 5 ชนิด *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* TISTR 5779 และ *Aspergillus brasiliensis* DMST 15538

3.3.4 วิธีการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อรา (Minimum Fungicidal Concentration)

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์นำมาศึกษาหาค่า MBC และ MFC โดยการนำความเข้มข้นจากค่า MIC ที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำเงินจากการทดลองก่อนหน้านี้ มา streak plate บนอาหาร TSA สำหรับแบคทีเรีย SDA สำหรับยีสต์และเชื้อรา อ่านผลการทดลองถ้าความเข้มข้นของสารสกัดนั้นสามารถฆ่าเชื้อได้จะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าในความเข้มข้นดังกล่าวไม่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้จะพบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดสมุนไพรในตำรับเจล

ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรในการป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อในตำรับเจล โดยการเตรียมตำรับเจลที่ผสมกับสารสกัดสมุนไพรค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในสูตรตำรับมาจากค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ โดยศึกษาที่ค่าความเข้มข้นเท่ากับ MIC4MIC และ 8MIC พิจารณาจากค่าความเข้นข้นต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด ทำการเปรียบเทียบ MIC ของจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด เลือกค่า MIC มากที่สุดใน 5 เชื้อจุลินทรีย์มากำหนดเป็นค่าความเข้มข้นสารสกัดเปลือกอบเชย (base gel + herbal extract) โดยศึกษาเปรียบเทียบกับตำรับเจลเปล่า (base gel) เป็นตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (negative control) ส่วนตำรับเจลเปล่าผสมกับเมทิล-พาราเบนและฟีน็อกซี่เอทานอล เป็นตัวอย่างควบคุมเชิงบวก (positive control)

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของตำรับเจลที่ผสมสารสกัดสมุนไพรที่ทำการศึกษา

	Ingredients	**Concentration (g)**
Phase A	Carbomer 940	0.06
	Glycerin	0.80
	Herbal Extract	MIC, 4MIC และ 8MIC
	Deionized water	qs
Phase B	Triethanolamine	1.00
	Deionized water	4.00
	Total	20

3.4.1 การเตรียมตำรับเจล

ตำรับเจลที่เตรียมได้จะแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ส่วนที่หนึ่งทำการทดสอบด้วยวิธี challenge test ส่วนที่สองทำการทดสอบความคงตัวด้วยสภาวะสลับอุณหภูมิ และส่วนที่สามทดสอบความคงตัวสภาวะอุณหภูมิห้อง

1) การเตรียมตำรับเจล (base gel) มีขั้นตอนดังนี้

Phase A: นำคาร์โบเมอร์ 940 ทำให้เปียกทั่วด้วยกลีเซอรีนแล้วเติมน้ำกระจายให้คาร์โบพอลกระจายตัวตั้งทิ้งไว้ให้คาร์โบพอลพองตัวเต็มที่

Phase B: ละลายไตรเอททานอลามีนในน้ำส่วนที่เหลือคนให้เข้ากัน จากนั้นทำการเติม Phase B ลงใน Phase A และคนให้เจลเป็นเนื้อเดียวกัน

2) เตรียมตำรับเจลที่ผสมสารสกัดสมุนไพร (base gel + herbal extract) มีขั้นตอนดังนี้

Phase A: นำสารสกัดสมุนไพรผสมกับกลีเซอรีนคนให้เข้ากันโปรยผงคาร์โบพอล 940คนให้ผงคาร์โบพอลเปียกให้ทั่วแล้วจึงเติมน้ำลงคนผสมกันตั้งทิ้งไว้ให้คาร์โบพอลพองตัวเต็มที่

Phase B: ละลายไตรเอททานอลามีนในน้ำส่วนที่เหลือคนให้เข้ากัน จากนั้นทำการเติม Phase B ลงใน Phase A และคนให้เจลเป็นเนื้อเดียวกัน

3.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกันเสีย challenge test ดัดแปลงจากมาตรฐาน ISO11930

เตรียมเชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลองให้มีปริมาณเชื้อ 10^6cfu/mL ยีสต์และเชื้อรามีปริมาณเชื้อ 10^5 cfu/mL ปิเปตเชื้อจำนวน 0.2 มิลลิลิตร ผสมลงในตำรับเจล 20 กรัม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 0, 7, 14 และ 28 วัน ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อในตำรับเจล โดยใช้วิธี spread plate โดยทำการดูดตำรับเจล 1 มิลลิลิตร และเจือจางลงในหลอดทดลองที่มี Butterfield's phosphate buffer จำนวน 9 มิลลิลิตรทำการเจือจางแบบ 10 fold dilution และตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบในแต่ละวันที่เก็บตัวอย่าง โดยมีสารควบคุมหรือ positive control คือ สารกันเสียผสมระหว่าง 0.4% เมทิลพาราเบน และ 0.5% ฟีน็อกซี่เอทานอล ส่วน negative control เป็นเจลเปล่าไม่มีสารกันเสียและสารสกัด

3.5 การทดสอบความคงตัว

ทดสอบความคงตัวด้วยวิธี Temperature cycling test โดยนำเจลที่ได้เตรียมไว้แช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำออกมาเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำต่อเนื่องจนครบ 6 รอบ และบันทึกผลที่เกิดขึ้นจากการประเมินความคงตัวทางเคมีกายภาพ การประเมินความคงตัวทางเคมีกายภาพพิจารณาลักษณะภายนอกของเจลเมื่อเตรียมเสร็จเปรียบเทียบกับการทดสอบที่สภาวะสลับอุณหภูมิครบ 6 รอบ ในหัวข้อการทดสอบต่อไปนี้

1. ลักษณะเนื้อเจล สังเกตลักษณะเนื้อเจลที่มองเห็น มีเนื้อใส มันวาว เนื้อละเอียด หรือหยาบ

2. สี สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของเจล

3. กลิ่น ให้ดมกลิ่นของเจล มีกลิ่นของเจล ไม่มีกลิ่น หรือกลิ่นของสมุนไพร

4. การไหล (rheology) วัดความหนืดของเจลโดยใช้เครื่องวัดความหนืด

5. การตกตะกอน (sedimentation) สังเกตการตกตะกอนการไม่เข้ากันของสมุนไพรกับเจล (- = ไม่ตกตะกอน; + = ตกตะกอน)

6. การหดตัว (syneresis) เจลอาจมีการหดตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้สังเกตได้จากของเหลวที่แยกตัวออกมาอยู่บนผิวหน้าของเนื้อเจล (- = ไม่แยกชั้น; + = แยกชั้น)

7. ความเป็นกรด ด่าง ตรวจวัดค่าความเป็น กรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดด่างต้องอยู่ในช่วงประมาณ 5.5 – 6 ที่ดีต่อผิวสัมผัส

8. ทดสอบทางด้านจุลินทรีย์ โดยใช้วิธีspread plate โดยทำการดูดตำรับเจล 1 มิลลิลิตร และเจือจางลงในหลอดทดลองที่มี Butterfield’s phosphate buffer จำนวน 9 มิลลิลิตรทำการเจือจางแบบ 10 fold dilution และตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการสกัดสมุนไพร

การศึกษาผลของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด คือ เหง้าขิง เหง้าข่า ใบพลู รากชะเอมเทศ และเปลือกอบเชย ด้วยวิธีการหมักด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ เฮกเซน และ 95% เอทานอล ปริมาณของสารสกัดหยาบคำนวณในรูปแบบร้อยละของผลผลิต (%yield) ดังแสดงในตารางที่ 6 โดยสารสกัดหยาบใน 95% เอทานอล มีปริมาณร้อยละของผลผลิตมากกว่าสารสกัดหยาบในเฮกเซน

ตารางที่ 6 ปริมาณร้อยละของผลผลิต (%yield) ของสารสกัดสมุนไพรทั้งหมด 5 ชนิด ที่เตรียมโดยวิธีการหมัก ด้วยเฮกเซนเปรียบเทียบกับ 95% เอทานอล

สมุนไพร	ส่วนที่ใช้	ร้อยละของผลผลิต (%yield)	
		เฮกเซน	95% เอทานอล
ขิง	เหง้าสด	0.154	2.961
ข่า	เหง้าสด	0.117	0.941
ใบพลู	ใบสด	0.573	3.823
ชะเอมเทศ	รากแห้ง	0.315	2.991
อบเชย	เปลือกต้น	0.993	3.388

4.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar well diffusion ของสารสกัดสมุนไพร

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิดที่เตรียมได้จากการหมักด้วยเฮกเซน และ 95% เอทานอล โดยวิธี Agarwell diffusion พบว่าสารสกัดของใบพลู และเปลือกอบเชยที่หมักด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด และเชื้อรา 2 ชนิด คือ *S.aureus* TISTR 1466 (ATCC 6538) *P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) *E.coli* ATCC 7839 *C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201)และ *A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404) โดยมี inhibition zone ของสารสกัดใบพลู เท่ากับ 21.98, 10.64, 18.60, 30.20 และ 56.78 มิลลิเมตร ส่วนสารสกัดเปลือกอบเชย เท่ากับ 39.24, 19.44, 28.85, 73.33 และ 62.24 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดเหง้าขิง เหง้าข่า และรากชะเอมเทศที่หมักด้วยเฮกเซนพบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) *E.coli* ATCC 7839 และ *A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404)

ดังแสดงในตารางที่ 7 ส่วนการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิดของสารสกัดสมุนไพรที่หมักใน 95% เอทานอล พบว่าสารสกัดใบพลูมีฤทธิ์ยับยั้ง *S.aureus* TISTR 1466 (ATCC 6538) *P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) *E.coli* ATCC 7839 และ *C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201) มีขอบเขตการยับยั้งอยู่ในช่วง 10.12 ถึง 20.18 มิลลิเมตร โดยไม่พบฤทธิ์ยับยั้ง *A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404) สารสกัดเปลือกอบเชยและเหง้าข่ามีฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้ง *S.aureus* TISTR 1466 (ATCC 6538) *E.coli* ATCC 7839 *C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201) และ *A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404) แต่พบว่าสารสกัดเปลือกอบเชยและเหง้าข่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) ได้ในส่วนของสารสกัดเหง้าขิงไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) และ *E.coli* ATCC 7839สารสกัดรากชะเอมเทศมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S.aureus* TISTR 1466 (ATCC 6538) และ *C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201) เท่านั้นดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 7 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี Agar well diffusion ของสารสกัดในเฮกเซนของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด

สารสกัดสมุนไพร	**ค่าเฉลี่ยของขอบเขตการยับยั้ง (มิลลิเมตร)**				
	S.aureus TISTR 1466 (ATCC 6538)	*P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027)	*E.coli* ATCC 7839	*C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201)	*A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404)
เปลือกอบเชย	39.42±0.63	19.44±3.73	28.85±0.68	73.33±2.74	62.24±4.29
ใบพลู	21.98±1.25	10.64±0.58	18.60±0.71	30.20±0.86	56.78±2.95
เหง้าขิง	11.81±0.37	-	-	11.02±0.32	-
เหง้าข่า	11.65±0.34	-	-	28.78±3.37	-
รากชะเอมเทศ	16.13±0.58	-	-	13.97±0.30	-

ตารางที่ 8 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี Agar well diffusion ของสารสกัดใน 95% เอทานอลของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด

สารสกัดสมุนไพร	ค่าเฉลี่ยของขอบเขตการยับยั้ง(มิลลิเมตร)				
	S.aureus TISTR 1466 (ATCC 6538)	*P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027)	*E.coli* ATCC 7839	*C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201)	*A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404)
เปลือกอบเชย	22.85±3.66	-	11.65±0.68	49.93±4.68	42.01±1.20
ใบพลู	20.18±0.95	10.12±0.61	10.84±0.59	11.31±0.77	-
เหง้าขิง	12.85±0.4	-	-	13.63±1.06	13.65±2.61
เหง้าข่า	31.74±2.45	-	9.85±0.92	17.92±4.52	27.66±4.83
รากชะเอมเทศ	20.10±0.30	-	-	13.50±0.50	-

4.3 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี broth micro dilution method ของสารสกัดสมุนไพร

จากผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี Agar well diffusion ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด พบว่าสารสกัดสมุนไพรในเฮกเซนของเปลือกอบเชยและใบพลูมีฤทธิ์ดีที่สุด จึงนำสมุนไพรดังกล่าวมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง *S.aureus* TISTR 1466 (ATCC 6538) *P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) *E.coli* ATCC 7839 *C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201) และ *A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404) พบว่าสารสกัดเปลือกอบเชย มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S.aureus* TISTR 1466 (ATCC 6538) *P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) *E.coli* ATCC 7839 *C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201) และ *A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404) อยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.039 ถึง 0.312 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในส่วนของสารสกัดใบพลูมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษาอยู่ในช่วงค่าความเข้มข้นระหว่าง 0.039 ถึง 1.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี Agar well diffusion ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดพบว่าสารสกัดสมุนไพรใน 95% เอทานอล ของเปลือกอบเชย และใบพลูมีฤทธิ์ดีที่สุดจึงนำสมุนไพรมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง *S.aureus* TISTR 1466 (ATCC 6538) *P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) *E.coli* ATCC 7839 *C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201) และ *A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404) พบว่าสารสกัดใบพลูมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง *S.aureus* TISTR 1466 (ATCC 6538) *P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) *E.coli* ATCC 7839 และ *C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201) อยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง

3.150 ถึง 12.50มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง A.brasiliensis DMST 15538 (ATCC 16404) ส่วนสารสกัดเปลือกอบเชยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง S.aureus TISTR 1466 (ATCC 6538) E.coli ATCC7839 C.albicans TISTR 5779 (ATCC 10201) และ A.brasiliensis DMST 15538 (ATCC 16404) อยู่ในช่วงระหว่าง 0.390 ถึง 0.780 มิลลิกรัมต่อมิลลิลตร โดยไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง P.aeruginosa TISTR 781 (ATCC 9027) ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งจุลินทรีย์ (MIC) ศึกษาด้วยวิธี broth micro dilution method

สารสกัดสมุนไพร	**ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ (mg/mL)**				
	S.aureus TISTR 1466 (ATCC 6538)	*P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027)	*E.coli* ATCC 7839	*C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201)	*A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404)
เฮกเซน					
เปลือกอบเชย	0.156	0.312	0.078	0.039	0.156
ใบพลู	0.156	1.250	0.625	0.156	0.039
เอทานอล					
เปลือกอบเชย	0.390	-	0.390	0.780	0.390
ใบพลู	6.250	6.250	12.50	3.150	-
ยาปฏิชีวนะ					
Streptomycin	0.020	0.156	0.078		
Itraconazole				0.156	0.078

Streptomycin = ยาปฏิชีวนะต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ; Itraconazole = ยาปฏิชีวนะต้านเชื้อรา

4.4 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อรา ยีสต์ (MFC) ทดสอบโดยวิธี spread plate

จากผลการศึกษาการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรทดสอบโดยวิธี broth micro dilution method พบว่าสารสกัดสมุนไพรในเฮกเซนของเปลือกอบเชยและใบพลูมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S.aureus* TISTR 1466 (ATCC 6538) *P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) *E.coli* ATCC 7839 *C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201) และ *A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404) ดีที่สุด จึงนำสมุนไพรดังกล่าวที่ช่วงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิดมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ *S.aureus* TISTR 1466 (ATCC 6538) *P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) *E.coli* ATCC 7839 *C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201) และ *A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404) พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อได้ของสารสกัดเปลือกอบเชยมีค่าเท่ากับ 0.156, 1.250, 0.156, 0.078 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดใบพลูมีค่าเท่ากับ 0.156, 2.500, 1.250, 0.625 และ 0.039 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ผลการศึกษาการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรทดสอบโดยวิธี broth micro dilution method พบว่าสารสกัดสมุนไพรใน 95% เอทานอลของเปลือกอบเชยและใบพลูมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S.aureus* TISTR 1466 (ATCC 6538) *P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) *E.coli* ATCC 7839 *C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201) และ *A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404) ดีที่สุด จึงนำสมุนไพรดังกล่าวที่ช่วงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา พบว่าสารสกัดเปลือกอบเชยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ *S.aureus* TISTR 1466 (ATCC 6538) *E.coli* ATCC 7839 *C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201) และ *A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404) มีค่าเท่ากับ 0.390 1.560 0.780 และ 1.560 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ สารสกัดใบพลูค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ *S.aureus* TISTR 1466 (ATCC 6538) *P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) *E.coli* ATCC 7839 และ *C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201) มีค่าเท่ากับ 12.50 6.250 12.50 และ 3.150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) และเชื้อรา ยีสต์ (MFC) ของสารสกัดสมุนไพร

สารสกัดสมุนไพร	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดฆ่าเชื้อ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)				
	S.aureus TISTR 1466 (ATCC6538)	*P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027)	*E.coli* ATCC 7839	*C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201)	*A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404)
เฮกเซน					
เปลือกอบเชย	0.156	1.250	0.156	0.078	0.625
ใบพลู	0.156	2.500	1.250	0.625	0.039
เอทานอล					
เปลือกอบเชย	0.390	-	1.560	0.780	1.560
ใบพลู	12.50	6.250	12.50	3.150	-
ยาปฏิชีวนะ					
Streptomycin	0.018	0.750	0.156		
Itraconazole				0.312	0.312

Streptomycin = ยาปฏิชีวนะต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ; Itraconazole = ยาปฏิชีวนะต้านเชื้อรา

จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดสมุนไพรเปลือกอบเชย และใบพลูที่ผ่านการหมักด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของ *S.aureus* TISTR 1466 (ATCC 6538) *P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) *E.coli* ATCC 7839 *C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201) และ *A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404) ได้ใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซินใช้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ ยาปฏิชีวนะไอทราโคนาโซลใช้ในการฆ่าเชื้อรา ยีสต์ ในขณะที่สารสกัดสมุนไพรเปลือกอบเชย และใบพลูที่ผ่านการหมักด้วย 95% เอทานอลมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิดน้อยกว่ายาปฏิชีวนะและสมุนไพรที่ผ่านการหมักด้วยเฮกเซน

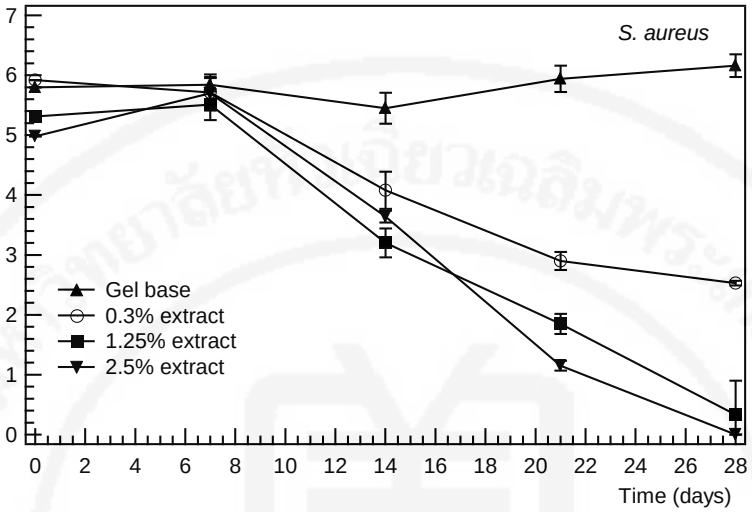
4.5 การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรในผลิตภัณฑ์เจล โดยวิธี challenge test

จากผลการศึกษาสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดเปลือกอบเชยที่สกัดด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ดีที่สุด คือสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทุกประเภทที่ทำการศึกษาด้วยความเข้มข้นต่ำได้ดี จึงนำสารสกัดเปลือกอบเชยในเฮกเซนมาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการ

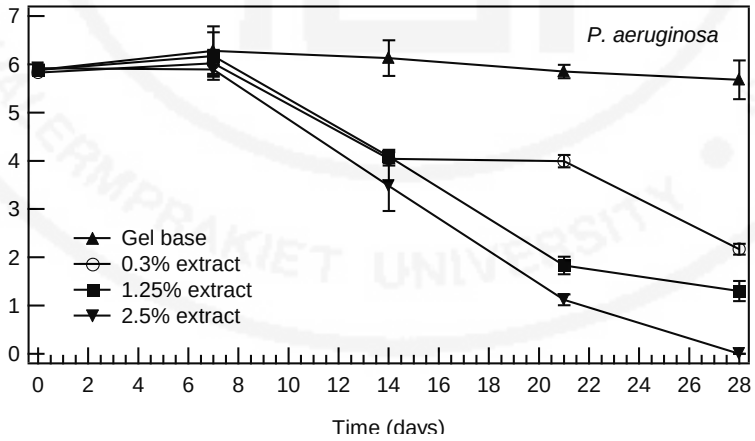
ยับยั้งการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่ผสมลงในผลิตภัณฑ์เจลในช่วงระยะเวลา 28 วัน ตามข้อกำหนด ISO 11930 โดยผสมสารสกัดเปลือกอบเชยลงในผลิตภัณฑ์เจลให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1, 4 และ 8 เท่าของค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) คิดเป็นร้อยละ 0.3% 1.25% และ 2.5% โดยน้ำหนักในตำรับ ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดเปลือกอบเชยที่ผสมลงในผลิตภัณฑ์เจลสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์และลดปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างต่อเนื่องตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 โดยทดสอบกับเชื้อทั้งหมด 5 ชนิด

สารสกัดเปลือกอบเชยความเข้มข้น 2.5% สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้ทุกชนิดเมื่อเก็บตัวอย่างไว้เป็นเวลา 28 วัน และยังสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ในช่วงระยะเวลาที่ 14 วันของการทดสอบ ทั้งนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการลดปริมาณจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดเปลือกอบเชยที่ความเข้มข้น 1.25% และ 2.5% มีค่าสูงกว่าสารกันเสียผสมระหว่าง 0.4% เมทิลพาราเบน และ 0.5% ฟีน็อกซี่เอทานอล ดังแสดงในแผนภูมิที่ 1-5 และสารสกัดเปลือกอบเชยความเข้มข้น 0.3%, 1.25% และ 2.5% มีปริมาณจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ลดลงจากวันแรกที่เริ่มทำการทดสอบ (0 วัน) จนระยะเวลา 28 วันที่การลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ ตามตารางที่ 4.6 พบว่าสารสกัดเปลือกอบเชยความเข้มข้นที่ 2.5% มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าความเข้ม 0.3% 1.5% และสารกันเสียผสมระหว่าง 0.4% เมทิลพาราเบน และ 0.5% ฟีน็อกซี่เอทานอล ตามมาตรฐาน ISO11930 สารสกัดเปลือกอบเชยความเข้มข้น 0.3% 1.25% และ 2.5% ได้ค่าการทดสอบตามมาตรฐานกำหนด

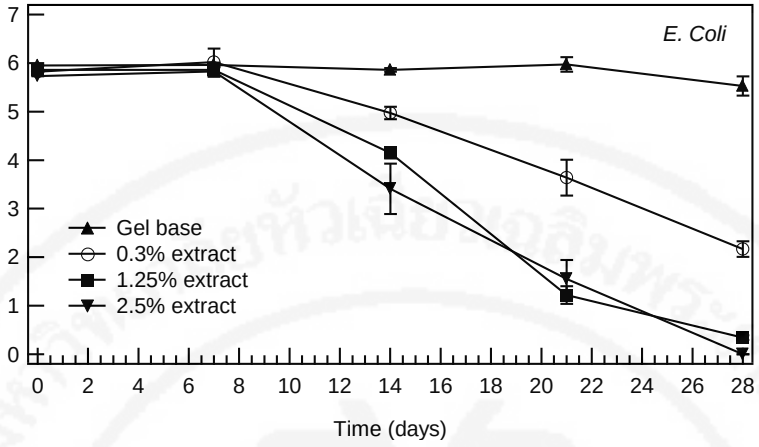
แผนภูมิที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.aureus* TISTR 1466 (ATCC 6538) และความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกอบเชยในผลิตภัณฑ์เจลทดสอบโดยวิธี challenge test



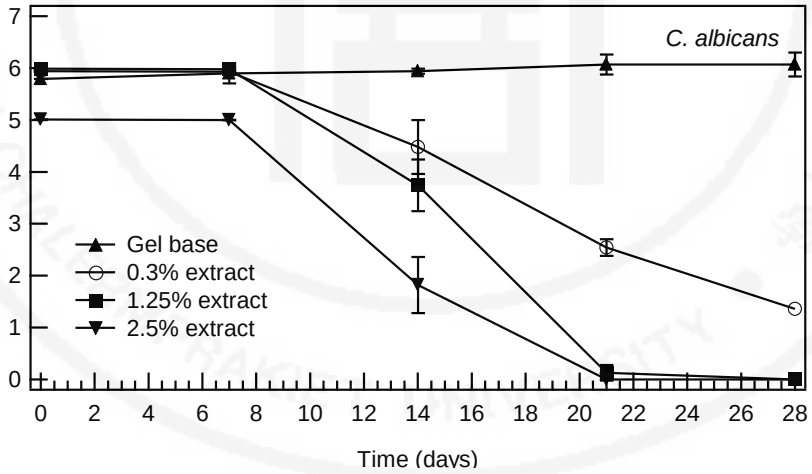
แผนภูมิที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) และความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกอบเชยในผลิตภัณฑ์เจลทดสอบโดยวิธี challenge test



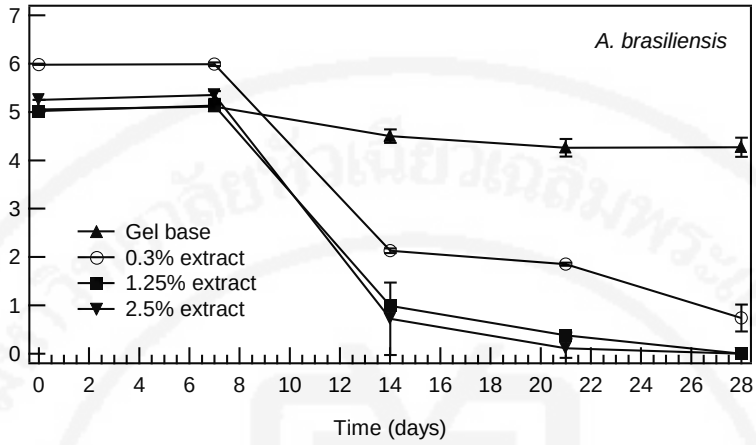
แผนภูมิที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E.coli* ATCC 7839 และความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกอบเชยในผลิตภัณฑ์เจลทดสอบโดยวิธี challenge test



แผนภูมิที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C.albicans* TISTR 5779 (ATCC 10201) และความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกอบเชยในผลิตภัณฑ์เจลทดสอบโดยวิธี challenge test



แผนภูมิที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404) และความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกอบเชยในผลิตภัณฑ์เจลทดสอบโดยวิธี challenge test



ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพการเป็นสารกันเสียของสารสกัดเปลือกอบเชยในระยะเวลา 28 วันในผลิตภัณฑ์เจล ($logN_0$-$logN_x$) ตามมาตรฐาน ISO11930

เชื้อจุลินทรีย์	ISO 11930	ความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกอบเชย			Positive control
		0.30%	1.25%	2.50%	
S.aureus	≥3	3.18	5.18	5.79	4.67
E.coli	≥3	3.85	5.52	5.83	4.13
P.aeruginosa	≥3	3.85	4.87	5.89	4.25
C.albican	≥1 + no increase	4.57	5.98	5.00	4.25
A.brasiliensis	≥1	5.25	5.13	5.35	3.61

4.6 การทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์เจลที่มีส่วนผสมของสารสกัดสมุนไพรอบเชยในสภาวะสลับอุณหภูมิ (temperature cycling)

การทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์เจลที่มีส่วนผสมของสารสกัดสมุนไพรเปลือกอบเชยทั้งหมด 3 ความเข้มข้น คือ 0.30%, 1.25% และ 2.50% ทำการทดสอบในสภาวะอุณหภูมิห้อง และในสภาวะสลับอุณหภูมิโดยเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เจลในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สลับกับการเก็บในตู้อบอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จำนวน 6 รอบ ทำการประเมินผลิตภัณฑ์เจลทั้งก่อนและหลังการเก็บสลับอุณหภูมิ พบว่าเกิดการแยกชั้นของของเหลวใสบนด้านบนเฉพาะผลิตภัณฑ์เจลที่มีส่วนผสมของสารสกัดเปลือกอบเชย 2.5% ภายหลังการเก็บสลับอุณหภูมิไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ สี กลิ่น ลักษณะเนื้อเจล การตกตะกอน ตามตารางที่ 12 ค่าความเป็นกรด-ด่างค่าความหนืดตามตารางที่ 13 ภายหลังการเก็บสลับอุณหภูมิและในสภาวะอุณหภูมิห้องไม่พบการเจริญของเชื้อในผลิตภัณฑ์ ส่วนการเก็บในสภาวะอุณหภูมิห้องไม่พบการเปลี่ยนแปลงทุกความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกอบเชย ตามตารางที่ 14

ตารางที่ 12 การประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์เจลทางกายภาพก่อนและหลังการเก็บไว้ในสภาวะสลับอุณหภูมิ (temperature cycling)

	ประเมินทางกายภาพ									
ความเข้มข้นสารสกัด	สี		กลิ่น		ลักษณะเนื้อเจล		การตกตะกอน		การหดตัว	
	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง
0.30%	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	กลิ่นของอบเชย	กลิ่นของอบเชย	ใส สีเหลือง	ใส สีเหลือง	-	-	-	-
1.25%	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	กลิ่นของอบเชย	กลิ่นของอบเชย	ใส สีเหลือง	ใส สีเหลือง	-	-	-	-
2.50%	เหลืองเข้ม	เหลืองเข้ม	กลิ่นของอบเชย	กลิ่นของอบเชย	ใส สีเหลือง	ใส สีเหลือง	-	-	-	+

(+)= เกิดการเปลี่ยนแปลง ;(–) = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 13 การประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์เจลทางกายภาพที่เก็บไว้ในสภาวะอุณหภูมิห้อง (room temperature)

ประเมินทางกายภาพ										
ความเข้มข้นสารสกัด	สี		กลิ่น		ลักษณะเนื้อเจล		การตกตะกอน		การหดตัว	
	0 วัน	35 วัน	0 วัน	35 วัน	0 วัน	35 วัน	0 วัน	35 วัน	0 วัน	35 วัน
0.30%	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	กลิ่นของอบเชย	กลิ่นของอบเชย	ใส สีเหลือง	ใส สีเหลือง	-	-	-	-
1.25%	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	กลิ่นของอบเชย	กลิ่นของอบเชย	ใส สีเหลือง	ใส สีเหลือง	-	-	-	-
2.50%	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	กลิ่นของอบเชย	กลิ่นของอบเชย	ใส สีเหลือง	ใส สีเหลือง	-	-	-	-

ตารางที่ 14 การประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์เจลทางเคมีกายภาพก่อนและหลังการเก็บไว้สภาวะสลับอุณหภูมิ (temperature cycling)

	ประเมินทางเคมีกายภาพ					
ความเข้มข้นสารสกัด	กรด-ด่าง		ความหนืด (Centipoises)		จุลินทรีย์ (colony)	
	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง
0.30%	6.67	6.54	4,375±35	4,300±70	ไม่พบ	ไม่พบ
1.25%	6.53	6.42	3,578±45	3,200±70	ไม่พบ	ไม่พบ
2.50%	6.47	6.27	1,818±95	1,795±63	ไม่พบ	ไม่พบ

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย การอภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย การอภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาสมุนไพรไทยเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ ตั้งแต่ขั้นตอนการเลือกสมุนไพร การสกัด การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัด จนถึงการนำสารสกัดไปใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อใช้เป็นสารสำคัญออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ทั้งที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการผลิตและระหว่างการใช้งานผลิตภัณฑ์ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของความไม่คงตัวของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง จนถึงอาจก่อให้เกิดการติดเชื้อบนผิวหนังของผู้ใช้ผลิตภัณฑ์นั้นได้

พืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ถูกเลือกจากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้ทั้งทางเครื่องสำอาง อาหารและยา โดยสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ที่เลือกมาทำการศึกษามีรายงานวิจัยฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ คือ เปลือกอบเชย (Cinnamomum zeylanicum) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Lauraceae, ใบพลู (Piper betle L.) จัดอยู่ในวงศ์ Piperacae, รากชะเอมเทศ (Glycyrrhiza glabra L.) จัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae และเหง้าขิง (Zingiber officinale Roscoe) และเหง้าข่า (Alpinia galangal) จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae สมุนไพรทั้ง 5 ชนิดเป็นสมุนไพรที่พบได้ในประเทศไทย

ข้อมูลจากการทบทวนวรรณกรรม พบว่าสารสำคัญในสมุนไพรส่วนใหญ่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เป็นส่วนของน้ำมันหอมระเหยที่ประกอบด้วยสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กสามารถระเหยได้ที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส ไม่ละลายน้ำ ละลายได้ดีในน้ำมัน สามารถสกัดได้โดยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) ข้อดีของการสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำคือการหลีกเลี่ยงการใช้ตัวทำละลาย ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษเมื่อมีปริมาณตัวทำละลายหลงเหลืออยู่ในสารสกัดจำนวนมาก ส่วนข้อจำกัดที่สำคัญของการสกัดโดยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำ คือการควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้โมเลกุลของสารสำคัญระเหยออกมาพร้อมๆ กับน้ำ การสกัดด้วยอุณหภูมิสูงหรือใช้ระยะเวลาในการสกัดนานเกินไป อาจก่อให้เกิดการสลายตัวของสารสำคัญ (Mohammad Azmin, S. N. H. 2016)การสกัดสมุนไพรสำหรับการศึกษานี้จึงเลือกใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ต้องใช้เครื่องมือเป็นพิเศษและสามารถเลือกประเภทตัวทำละลายให้เหมาะสมกับประเภทของสารที่ต้องการทำการสกัดได้ รายงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสมุนไพรเปลือกอบเชย ใบพลู เหง้าขิง เหง้าข่าและรากชะเอมเทศ ส่วนใหญ่ทำการศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันที่สกัดจากสมุนไพรด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ ดังนั้นสารสำคัญจึงจัดอยู่ในกลุ่มน้ำมันที่ระเหยได้ (volatile oil) ซึ่งไม่สามารถสกัดได้ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูง เช่น น้ำ

วิธีการเตรียมสารสกัดสมุนไพรทำโดยการหมัก (maceration) สมุนไพรสดในตัวทำละลายที่มีขั้ว (polarity) แตกต่างกัน 2 ชนิด คือเฮกเซน ซึ่งเป็นตัวทำละลายไม่มีขั้ว (non-polar) มีค่า polarity index เท่ากับ 0.1 และค่า dielectric constant เท่ากับ 1.88 และ 95% เอทานอล ซึ่งเอทานอลเป็นตัวทำละลายกึ่งมีขั้ว (semi-polar) ที่มีค่า polarity index เท่ากับ 5.2 และ dielectric constant เท่ากับ 25 ดังนั้นตัวทำละลาย 95% เอทานอล จึงมีค่า polarity index เท่ากับ 35.75 ขั้นตอนการสกัดสมุนไพรเริ่มโดยการหมักสมุนไพรในตัวทำละลายเฮกเซน เพื่อแยกสกัดสารสำคัญในกลุ่มไม่มีขั้ว จากนั้นจึงสกัดกากสมุนไพรต่อด้วย 95% เอทานอล เพื่อสกัดสารสำคัญที่เหลือซึ่งเป็นสารในกลุ่มที่มีขั้วสูงขึ้น และไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายเฮกเซน จากผลการศึกษาพบว่าปริมาณสารสกัดสมุนไพรทุกชนิด ซึ่งได้จากการสกัดด้วย 95% เอทานอล มีปริมาณมากกว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดสมุนไพรด้วยเฮกเซน แสดงว่าปริมาณสารสำคัญในกลุ่มที่มีขั้วต่ำและละลายได้ดีในเฮกเซนมีปริมาณน้อยกว่าปริมาณสารสำคัญในกลุ่มที่มีขั้ว ซึ่งถูกสกัดได้ด้วย 95% เอทานอล ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dhia E. Elhag และคณะ (2015) ซึ่งทำการสกัดเปลือกอบเชยด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ 96% เอทานอล ปิโตรเลียมอีเธอร์ คลอโรฟอร์ม และเมธานอล พบว่าสารสกัดเปลือกอบเชยด้วย 96% เอทานอลมีปริมาณมากกว่าสารสกัดจากตัวทำละลายอื่นเนื่องจากเอทานอลมีค่า polarity index และ dielectric constant อยู่ระหว่างตัวทำละลายไม่มีขั้ว เช่นเฮกเซน และตัวทำละลายที่มีขั้วสูงเช่น น้ำ และเอทานอลยังสามารถผสมเข้ากันได้ดี (miscible) กับทั้งตัวทำละลายมีขั้วและไม่มีขั้ว ดังนั้นเอทานอลจึงเป็นตัวทำละลายที่ดีต่อทั้งสารที่มีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ส่งผลให้ปริมาณสารที่ถูกสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณมากที่สุด

Tiwari P. และคณะ (2011) รายงานผลของชนิดตัวทำละลายต่อกลุ่มของสารสำคัญที่สกัดได้จากพืช พบว่าตัวทำละลายมีขั้ว เช่นเอทานอลและเมทานอล สามารถสกัดสารในกลุ่มมีขั้ว ได้แก่ polyphenols, flavonols, flavones, tannins, alkaloids, sterols เป็นต้น ส่วนตัวทำละลายไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซนและอีเทอร์ สามารถสกัดสารในกลุ่มไม่มีขั้ว ได้แก่ alkaloids, terpenoids, coumarins, fatty acids เป็นต้น

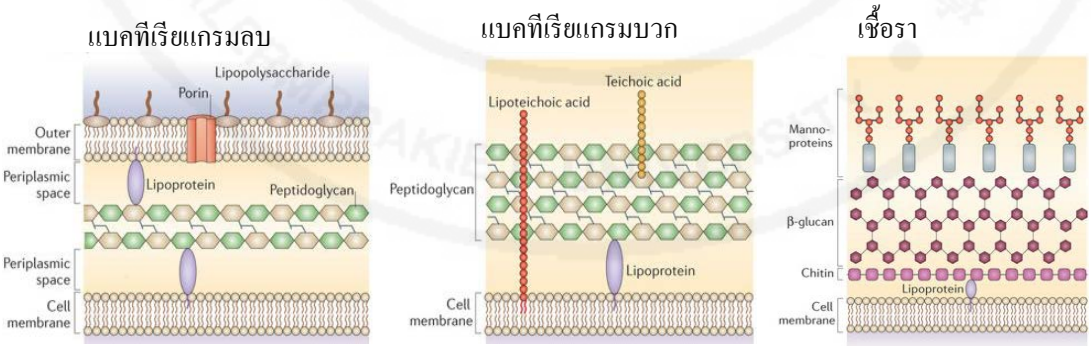
การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ศึกษาโดยวิธี agar well diffusion โดยทำการทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ระบุไว้ในข้อกำหนด ISO 11930 เรื่องการทดสอบประสิทธิภาพของสารกันเสีย (preservatives) ในเครื่องสำอางที่ละลายหรือเข้ากับน้ำได้ ตามข้อกำหนดใน ISO 11930 เชื้อจุลินทรีย์ประกอบด้วย เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S.aureus* และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *E.coli* และ *P.aeruginosa* เชื้อรา *A.brasiliensis* และยีสต์ *C.albican* ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดสมุนไพรทุกชนิดทั้งที่สกัดด้วยเฮกเซนและ 95% เอทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S.aureus* (ATCC 6538) และยีสต์ *C.albican* (ATCC10201) ได้

พบว่าสารสกัดเปลือกอบเชยและใบพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีกว่าสารสกัดเหง้าขิง เหง้าข่าและรากชะเอมเทศ เนื่องจากให้ค่าเฉลี่ยของขอบเขตการยับยั้งเชื้อที่กว้างกว่า

เนื่องจากโครงสร้างผนังเซลล์ (cell wall) ของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นชั้นล้อมรอบเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ช่วยห่อหุ้มเซลล์ให้แข็งแรงของแบคทีเรียแกรมบวกมีส่วนประกอบหลักคือเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) เพียงชั้นเดียว ซึ่งมีความหนาแตกต่างจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบที่มีความซับซ้อนทางโครงสร้างมากกว่า ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบนอกจากประกอบด้วยชั้นของเพปทิโดไกลแคนที่บางกว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกแล้ว ยังประกอบด้วยชั้นของฟอสโฟลิปิด ที่เรียกว่า phospholipid bilayer และส่วนของ outer envelop ทำให้มีส่วนประกอบของไขมันในผนังเซลล์มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก สารสำคัญในสารสกัดสมุนไพรจึงออกฤทธิ์ยับยั้งแบคที่เรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Pimpen P. 2012) เนื่องจากโมเลกุลของสารสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่า

ส่วนของผนังเซลล์ของยีสต์และเชื้อราประกอบด้วยสารในกลุ่มเซลลูโลสและไคตินเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง โดยมีส่วนประกอบของโปรตีนและไขมันในปริมาณน้อยสารที่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของเชื้อราและยีสต์ได้จะเข้าไปจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นไขมัน หรือเข้าไประงับการแบ่งตัวของยีสต์ (Mader S. Sylvia. 2007)

ภาพที่ 11 โครงสร้างผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และเชื้อรา



ที่มา: Brown L., (2015) ออนไลน์

นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดเปลือกอบเชยและใบพลูที่สกัดด้วยเฮกเซนสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษาได้ทุกตัว ในขณะที่สารสกัดเหง้าขิง เหง้าข่าและรากชะเอมเทศที่สกัดด้วยเฮกเซนสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้เพียงบางชนิด ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดด้วยเฮกเซนของเปลือกอบเชยและใบพลูมีประสิทธิภาพในการยังยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยเฮกเซนของ

สมุนไพรเหง้าขิง เหง้าข่าและรากชะเอมเทศ ส่วนสารสกัดด้วย 95% เอทานอลของเปลือกอบเชย สามารถยับยั้งเชื้อ *E.coli* ยีสต์และรา และสารสกัดด้วย 95% เอทานอลของใบพลูสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั้ง *P.aeruginosa* และ *E.coli* และยีสต์ได้ เช่นเดียวกับสารสกัดด้วย 95% เอทานอลของเหง้าขิง เหง้าข่าและรากชะเอมเทศที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษาได้เพียงบางชนิด ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายเฮกเซนทำให้ได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ครอบคลุมกว่าการสกัดสมุนไพรด้วย 95% เอทานอล

จากผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ด้วยวิธี agar well diffusionที่ได้ข้อสรุปว่าสารสกัดที่ได้จากการหมักสมุนไพรในตัวทำละลายเฮกเซนและ 95% เอทานอลของเปลือกอบเชยและใบพลูมีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดเหง้าขิง เหง้าข่าและรากชะเอมเทศ ดังนั้น จึงนำสารสกัดเปลือกอบเชยและใบพลูมาทำการศึกษาต่อ เมื่อนำสารสกัดเปลือกอบเชยและใบพลูทั้งที่สกัดด้วยเฮกเซนและ 95% เอทานอลมาศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MBC) ด้วยวิธี broth microdilution ทำให้ได้ข้อสรุปยืนยันว่าสารสกัดด้วยเฮกเซนมีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดด้วย 95% เอทานอลอย่างชัดเจน เนื่องจากสารสกัดเฮกเซนให้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ต่ำกว่าและมีค่าความเข้มข้นทั้ง MIC และ MBC ใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะ Streptomycin และ Itraconazole มากกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าค่า MIC และ MBC ของสารสกัดเปลือกอบเชยทั้งที่สกัดด้วยเฮกเซนและ 95% เอทานอล มีค่าน้อยกว่าสารสกัด ใบพลู ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดจากเปลือกอบเชยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและ ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าสารสกัดใบพลู

ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดเฮกเซนของเปลือกอบเชยที่ได้จากการศึกษากับเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด มีค่าอยู่ ในช่วง 0.039 – 0.156 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และช่วง 0.078-1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่า MIC และ MBC ที่ได้จากงานวิจัยกับค่า MIC และ MBC จากผลงานวิจัย Silveira และคณะ (2012) ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ *S.aureus, E.Coli* และ *P.aeruginosa* มีค่าการทดสอบ MIC และ MBC อยู่ในช่วง 5.0 ถึง 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า MIC และ MBC ที่ได้จากการศึกษานี้มีค่าต่ำกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากการสกัดสารด้วยวิธีการหมักในตัวทำละลายเป็นวิธีการสกัดด้วยหลักการละลาย (dissolution) ที่อาศัยหลักการ like dissolves like ดังนั้นสารสำคัญที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วต่ำทุกชนิดซึ่งสามารถละลายได้ในตัวทำละลายเฮกเซน ทั้งที่สามารถระเหยได้และไม่สามารถระเหยได้ จะถูกสกัดออกมาในตัวทำละลายได้ทั้งหมด จึงทำให้การหมักสมุนไพรด้วยตัวทำละลายสามารถสกัดสารสำคัญได้หลายกลุ่มมากกว่า ส่งผลให้สารสกัดที่ได้จากการหมักสมุนไพรด้วยเฮกเซนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี

ผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gurdip Singh (2007) ที่รายงานว่าสารสำคัญที่มีปริมาณมากที่สุดที่ได้จากการหมักเปลือกอบเชยด้วยอะซิโตน คือ cinnamaldehyde (50%) รองลงมาคือ coumarin (16.6%) และสารอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น δ-cadinene, α-copaene เป็นต้น ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นเปลือกอบเชยด้วยไอน้ำ ประกอบด้วย cinnamaldehyde เป็นหลักในปริมาณสูงถึง 97.7% โดยไม่พบสาร coumarin ในน้ำมันหอมระเหย ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เปรียบเทียบระหว่างน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดเปลือกอบเชยจากการหมักในอะซิโตนในรูปแบบที่เรียกว่า oleoresin พบว่าน้ำมันหอมระเหยมีประสิทธิภาพดีกว่า oleoresin ในการยับยั้งเชื้อรา ในขณะที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียไม่แตกต่างกันระหว่างน้ำมันหอมระเหยและ oleoresin จากเปลือกอบเชย แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของสารสกัดเกิดจากการเสริมฤทธิ์กันของสารสำคัญ

ทั้งนี้จากการศึกษาพบว่าสารสกัดเฮกเซนของเปลือกอบเชยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดีที่สุด เมื่อพิจารณาจากค่าการละลายของสารสำคัญ พบว่า cinnamaldehyde และ coumarin ละลายได้ดีมาก (very soluble) ในตัวทำละลายไม่มีขั้ว เช่น อีเทอร์และคลอโรฟอร์ม และละลายได้ดี (soluble) ในเอทานอล (Dhia E et.al.2015) ดังนั้นสารสำคัญทั้งสองน่าจะถูกสกัดด้วยเฮกเซนในขั้นตอนแรก สาระสำคัญส่วนน้อยที่ยังคงเหลืออยู่จึงถูกสกัดออกในตัวทำละลายเอทานอล พร้อมๆ กับสารมีขั้วอื่นๆ

ผลการศึกษาเพื่อหาค่า MIC และ MBC ทำให้ได้ข้อสรุปว่าสารสกัดเฮกเซนของเปลือกอบเชยมีประสิทธิภาพดี จึงเลือกสารสกัดดังกล่าวมาทำการศึกษาผลการทดสอบ MIC ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อของ *P.aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027) มีค่า MIC ที่สูงที่สุดเท่ากับ 0.312 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 4 MIC มีค่าเท่า MBC ที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ และ 8 MIC ซึ่งเป็นสองเท่าของการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จึงเลือกความเข้มข้นของสารสกัดที่ MIC, 4 MIC และ 8 MIC ไปทำการทดสอบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง การทำ challenge test ซึ่งเป็นการศึกษาเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของสารสกัดเปลือกอบเชยในการใช้เป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เจล เพื่อทดแทนสารกันเสียทางเคมี เช่น เมทิลพาราเบนและฟีน็อกซี่เอทานอล ทำการศึกษาโดยการเติมสารสกัดในความเข้มข้นต่างๆ ลงในผลิตภัณฑ์เจลที่เตรียมจากคาร์โบพอล 940 ร่วมกับการเติมเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในปริมาณแน่นอน ตำรับเจลที่เตรียมจากคาร์โบพอล 940 ถูกเลือกเพื่อใช้ในการศึกษา เนื่องจากเป็นตำรับที่ใช้เป็นเครื่องสำอางที่ให้เนื้อสัมผัสที่ดี สามารถเตรียมให้มีความหนืดได้ตามต้องการโดยใช้วัตถุดิบในการเตรียมตำรับน้อยทั้งชนิดและปริมาณ ทำให้เกิดการรบกวนการแปลผลประสิทธิภาพของสมุนไพรลดลง

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดเปลือกอบเชยในผลิตภัณฑ์เจลที่ทำการทดสอบของเชื้อทั้งหมด 5 ชนิด คือ เชื้อ *S.aureus* TISTR 1466 (ATCC 6538) เชื้อ *E.coli* ATCC 7839 เชื้อ *C.albicans*

TISTR 5779 (ATCC 10201) และเชื้อ *A.brasiliensis* DMST 15538 (ATCC 16404) สารสกัดเปลือกอบเชยความเข้มข้น 2.5% หรือ 8 เท่าของค่า MIC สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษาได้มากกว่า 3 เท่า เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ และสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งหมดทุกชนิด ภายใน 4 สัปดาห์ สารสกัดเปลือกอบเชยความเข้มข้น 0.3%, 1.25% และ 2.5% สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษาได้มากกว่า 3 เท่า เมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ ดังนั้น ผลิตภัณฑ์เจลที่ผสมสารสกัดเปลือกอบเชยปริมาณ 1, 4 และ 8 เท่าของค่า MIC จึงผ่านการทดสอบ challenge test ตามมาตรฐาน ISO 11930 ที่กำหนดเกณฑ์การผ่านการทดสอบประสิทธิภาพของสารกันเสียเมื่อมีการลดลงของเชื้อแบคทีเรียมากกว่า 3 เท่า และการลดลงของเชื้อรามากกว่า 1 เท่าในระยะเวลา 28 วัน ทั้งนี้พบว่าการยับยั้งและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดอบเชยมีประสิทธิภาพดีกว่าสารกันเสียเมทิลพาราเบนและฟีน็อกซี่เอทานอลที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน เนื่องจากตรวจพบปริมาณเชื้อในผลิตภัณฑ์เจลที่ผสมสารสกัดเปลือกอบเชยน้อยกว่าผลิตภัณฑ์เจลที่ผสมเมทิลพาราเบนและฟีน็อกซี่เอทานอล ในช่วงเวลาที่ทำการศึกษา 28 วัน การประเมินความคงตัวทางกายภาพและทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์เจลที่ผสมสารสกัดเปลือกอบเชยความเข้มข้นต่างๆ พบว่าผลิตภัณฑ์เจลมีความคงตัวทางกายภาพ ทั้งสี กลิ่น ลักษณะเนื้อเจล ความเป็นกรด-ด่าง และความหนืด ไม่เปลี่ยนแปลงภายหลังการเก็บตัวอย่างในสภาวะสลับอุณหภูมิระหว่าง 4 องศาเซลเซียสและ 45 องศาเซลเซียส จำนวน 6 รอบ สังเกตพบชั้นของเหลวสีเหลืองบนผลิตภัณฑ์เจลที่ผสมสารสกัดความเข้มข้น 2.5% ของตัวอย่างที่ผ่านสภาวะสลับอุณหภูมิ 6 รอบ โดยตัวอย่างผลิตภัณฑ์เจลที่เก็บไว้ณ อุณหภูมิห้อง ไม่พบการแยกชั้นดังกล่าว และไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เจลทุกตัวอย่าง ทั้งที่เก็บในสภาวะสลับอุณหภูมิ จำนวน 6 รอบและที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 35 วัน

การศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์เจลผสมสารสกัดเปลือกอบเชยที่สกัดด้วยเฮกเซน สรุปได้ว่าสารสกัดเปลือกอบเชยที่เตรียมได้จากการสกัดสารสำคัญด้วยการหมักในตัวทำละลายเฮกเซน เมื่อผสมลงในผลิตภัณฑ์เจลที่เตรียมจากคาร์โบพอลในความเข้มข้น 0.3-2.5% โดยน้ำหนัก ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวทางชีวภาพคือไม่เกิดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ การผสมสารสกัดเปลือกอบเชยมากกว่า 2.5% โดยน้ำหนักลงในผลิตภัณฑ์เจลที่เตรียมจากคาร์โบพอล 940 อาจส่งผลให้เกิดความไม่คงตัวทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ในสภาวะอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิห้องได้ดังนั้นสารสกัดเฮกเซนของเปลือกอบเชยจึงสามารถใช้เป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เจลเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาความคงตัวระยะยาวของผลิตภัณฑ์เมื่อเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องมีความจำเป็นเพื่อยืนยันผลการศึกษา

บรรณานุกรม

ทิฐิมา ภาคภูมิ. (ม.ค.-เม.ย. 2016) **ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์และสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบพลูเพื่อพัฒนาเป็นเครื่องสำอาง** SDU Res J. 9(1) หน้า 1-11. (25 กรกฎาคม 2560)

วารีรัตน์หนูหีต. (2557) **การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยปนเปื้อนบนพื้นผิวสัมผัสโดยใช้สารสกัดพืชตระกูลขิง วิทยานิพนธ์** (วิทยาศาสตร์สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ [ออนไลน์] แหล่งที่ที่มา: https://core.ac.uk/download/pdf/32430461.pdf (25 กรกฎาคม 2560)

ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. **ชื่อสมุนไพร** [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: www.phargarden.com.

ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. **สมุนไพร** [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: www.thaicrudedrug.com

Jirawan Oonemetta-aree. (2006) **Antimicrobial properties and action of galangal (Alpiniagalanga Linn.) on *Staphylococcus aureus*** LWT. 39 หน้า 1214-1220.

Prakatthagomol W., Sirithunyalug J. and Okonogi S. (2012) **Comparison of Antibacterial Activity Against Food-Born Bacteria of Alpiniagalanga, Curcuma longa, and Zingibercassumunar**CMU. J. Nat. Sci. 11(2) หน้า 177-186[ออนไลน์]แหล่งที่มา: https://www.researchgate.net/publication/287640203_Comparison_of_antibacterial_activiac_against_foodborne_bacteria_of_Alpinia_galanga_Curcuma_longa_and_Zingiber_cassucassu

Singh G., Kapoor IP. and Singh P. 2008 **Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of Zingiberofficinale** Food and Chemical Toxicology. 46หน้า3295-3302.

M.Flores. (2007) **Deterioration of raw materials and cosmetic product by preservative resistant microorganisms**" Elsevier science limited. 40(2) 157-160.

Anna Herman. (2012) **Essential oils and herbal extract as antimicrobial agent in cosmetic emulsion** Indian J microbiol. 53(2) 232-237.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Rao K., Ch B., Narasu L M., Giri A., (2010) **Antibacterial Activity of Alpiniagalanga (L) Willd Crude Extracts** Appl BiochemBiotechnol. 162 หน้า 871–884, [ออนไลน์] แหล่งที่มา :https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20387130 (1พฤษภาคม 2560)

Dhia E. Elhag, Zuheir Osman, Hind Omer, Saad M. H. Ayoub, Mona. S. Mohammed, Wadah. J. Ahmed Chemical composition, **antimicrobial activities and TLC profile of different bark extracts of Cinnamomumzeylanicum**. The Pharma Innovation Journal 2015; 4(1): 33-36.

Brown L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R., and Casadevall, A., **Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi**. Nature Reviews Microbiology. September 2015; doi:10.1038/nrmicro3480.

Mohammad Azmin, S. N. H., Abdul Manan, Z., Wan Alwi, S. R., Chua, L. S., Mustaffa, A. A., &Yunus, N. A. (2016). **Herbal Processing and Extraction Technologies. Separation & Purification Reviews**, 45(4), 305–320. doi:10.1080/15422119.2016.1145395.

Gurdip Singh, Sumitra Maurya, M.P. deLampasona, Cesar A.N. Catalan. **Comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents.** Food and Chemical Toxicology. 45 (2007) 1650–1661.

Lertsatitthanakorn, P., Montree, K., Bunjong, J., Samrual, B., and Kotchan, S. **Antimicrobial Activities of Cinnamomumzeylanicum Blume Bark Essential Oil**. Thai Pharm Health Sci J Vol. 7 No. 1, Jan. – Mar. 2012.

Prashant Tiwari, Bimlesh Kumar, Mandeep Kaur, Gurpreet Kaur, Harleen Kaur. **Phytochemical screening and Extraction** A Review. International Pharmaceutica Sciencia 1(1), 98-106, 2011.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Mader S. Sylvia. (2007). Biology. **The ninth edition. The McGraw-Hill Companies**, Inc.McGraw-Hill International edition. USA. 1016 p.

DwivediV. and Tripathi S. 2014 **Review study on potential activity of Piper betle** J. Pharmacognosy and Phytochemistry 3(4) 93-98

AhittayaWongtrakulkeao. **Utilization of Betel Pepper Extract to Inhibit Microorganisms inSome Herbal Cosmetic Products**The National graduate research. 34 648-653

Zhang Y., Liu X., Wang Y., Jiang P. and Quek S. (2016) **Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against Escherichia coli and Staphylococcus aureus** J. Food Control. 59 282-289

LU Fei., DING Yi-cheng., YE Xing-qian. and DING Yu-ting. 2011 **Antibacterial Effect of Cinnamon Oil Combined with Thyme or Clove Oil** Agricultural Sciences in China. 10(9) 1482-1487

Zadeh J B., Kor M Z. and Gonftar K M. **2013 Licorice (*Glycyrrhizaglabralinn*) As a Valuable Medicinal Plant**J.Advanced biological and biomedical. 1(10) 1281-1288

Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J.Pharmaceuiticalanalysis (2016) **ISO 11930-A comparison to other methods to evaluate the efficacy of antimicrobial preservation**. J.SOFW (2012)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล	นางสาวปุณณ์นิษฐา บุปผาธนรัชต์
วัน เดือน ปีเกิด	31 มกราคม 2535
ที่อยู่ปัจจุบัน	55/100 หมู่บ้านดีไลท์ อ่อนนุช มอเตอร์เวย์ ตำบลศรีษะจรเข้น้อย อำเภอบางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ 10570

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2556	คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาศาสตรบัณฑิต

ประวัติการทำงาน

พ.ศ. 2557	ตำแหน่ง Sale บริษัท ยูนิไทกรุ๊ป จำกัด
พ.ศ. 2562 – ปัจจุบัน	ตำแหน่ง Sale บริษัท เอสพีซี อาร์ที จำกัด