บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1.อุปกรณ์และสารเคมี

1. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
2. ขวดฝาเกลียว
3. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
4. Freeze dry (Christ/Gamma 2-16)
5. Rotary evaporator (Rotavapor II, BUCHI)
6. จานเพาะเชื้อ (steriled preti disc or plate)
7. ปิเปตต์ (steriled pipet)
8. เครื่องอังน้ำ (water bath)
9. Tryptic Soy Broth (TSB)
10. Sabouraud Dextrose Broth (SDB)
11. ผงวุ้น (agar)
12. น้ำกลั่น
13. เครื่องนับโคโลนี
14. Cork borer
15. เครื่องชั่ง
16. โพรพิลีนไกลคอล
17. เอทานอล
18. เมทานอล
19. กระดาษกรองเบอร์ 4
20. FRAP (Ferric reducing antioxidant power)
21. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (sigma-aldrich)
22. ABTS (2,2’-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

23. Folin-Ciocateu reagent (Lobo)
24. Gallic acid monohydrate (sigma-aldrich)
25. 7% Na_2CO_3 (Lobo)
26. Tolox
27. เจนตาไมซิน (gentamicin)
28. spectometor (U-1500, Hitachi)
29. เชื้อจุลลินทรีย์ *S. aurues, P. aeruginosa, C. albican* และ *E. coli*
30. Sodium lauryl ether sulfate
31. Cocoamidopropyl betaine
32. Sodium chloride
33. Perfume
34. Sodium lauryl ether sulfate
35. Stearic acid
36. Cocamidopropyl betaine
37. Coconut fatty acid

2. ขั้นตอนการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดใบพลูด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (solvent extraction)(ดัดแปลงจากวิธีของ Dilokkunanant et al., 2000)

นำใบพลูสด (พันธุ์เขียว) จาก อ. เมือง จ. เพชรบูรณ์ ล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้งน้ำโดยห้ามโดนแดดประมาณ 5 ชั่วโมง หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำมาสกัดด้วยวิธีหมัก (maceration) โดยนำใบพลูที่หั่นแล้วประมาณ 2 กิโลกรัมแช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 1,000 มิลลิลิตรนาน 3 วัน เทตัวทำละลายที่มีสารสกัดออกเก็บไว้เติม เอทานอลใหม่ปริมาณเท่าเดิมลงไปในกากแช่นานอีก 3 วันแยกตัวทำละลายที่มีสารสกัดครั้งที่สองออกนำมารวมกับสารสกัดที่ได้ในครั้งแรกทำอย่างนี้ครบ 3 ครั้ง และกรองเอากากออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารสกัดที่ละลายด้วยเอทานอลทั้งหมดที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator (Rotavapor II, BUCHI)จนตัวทำละลายระเหยออกไปหมด จากนั้นนำพลูอีกประมาณ 2 กิโลกรัมแช่ตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอลทำวิธีเดียวกัน แต่

หลังจากระเหยเอาตัวทำละลายออกแล้วนำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้ง Freeze dry (Christ/Gamma 2-16) ชั่งน้ำหนัก เก็บสารสกัดใบพลูในรูปผงแห้ง จากนั้นเตรียมสารสกัดใบพลูโดยนำไปละลายด้วยเอทานอลและโพรพิลีนไกลคอลให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดใบพลู

นำสารสกัดใบพลูไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aurues* TISTR 1466 แบคทีเรียแกรมลบ *P. aeruginosa* DMST 26217, *E.coli*. TISTR780 และ เชื้อรา *C. albicans* TISTR 5779 โดยศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดใบพลู 2 เทคนิค คือ

2.1 การทดสอบหาบริเวณการยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) ด้วยวิธี Agar diffusion techniques

นำสารสกัดใบพลูที่สกัดด้วยเอทานอลและโพรพิลีนไกลคอลไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aurues,P. aeruginosa, E.coli* และเชื้อรา *C. albicans* ด้วยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น (Agar diffusion technique) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Ahmed และ Beg (2001) นำแบคทีเรีย *S. aurues P. aeruginosa* และ *E.coli* มาเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C 18 ชั่วโมง ส่วน *C. albicans* เลี้ยงในอาหารเหลว Sabouraud dextrose Broth (SDB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C 3 - 5 วัน ปรับค่าความขุ่นของแบคทีเรียให้มีค่าเท่ากับค่ามาตรฐาน Mc Farland 0.5 เจือจางแบคทีเรียให้ได้ 10 เท่า (มีจำนวนเซลล์ 1.5x10^{7} CFU/ml) จากนั้นใช้ไม้พันสำลีป้ายสารแขวนลอยแบคทีเรีย *S. aurues*, *P. aeruginosa, E.coli* และ *C. albicans* บนอาหารวุ้น Mannitol Salt Agar (MSA) ปริมาตร 20 มิลลิลิตรใช้ Cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิลิตร เจาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 9 หลุม นำสารสกัดใบพลูด้วยเอทานอลปรับความเข้มข้นเป็น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 12.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 3.13 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและ 1.56 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในหลุม 7 หลุม ส่วนอีก 2 หลุม คือ สารละลายเอทานอล ปริมาตร 30 ไมโครลิตรซึ่งเป็นชุดควบคุมผลลบ (negative control) และใช้ยาปฏิชีวนะเจนตาไมซิน (gentamicin) 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) หลังจากบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมงจึงวัดบริเวณการยับยั้ง (Inhibition zone) แต่ละการทดลองทำ 3 ครั้งนำค่าที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นทำวิธีเดียวกัน โดยนำสารสกัดใบพลูด้วย

โพรพิลินไกลคอลมาละลายในโพรพิลินไกลคอล แต่จะใช้สารสะลายโพรพิลีนไกลคอลเป็นชุดควบคุมผลลบ (negative control)

2.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

ทดสอบสารสกัดใบพลูกับเชื้อแบคทีเรีย *S. aurues, P. aeruginosa* และ *E. coli* ดัดแปลงจากวิธีของ (Pojananukit & Kajomcheappunngam, 2010) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว TSB โดยเริ่มต้นนำหลอดทดลองซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 10 หลอดทำการดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ (broth) ใส่ลงในหลอดที่ 1 – 10 หลอดละ 1 มิลลิลิตรแล้วดูดสารสกัดใบพลูลงในหลอดที่ 2 หลอดละ 1 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นดูดสารในหลอดที่ 2 จำนวน 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดที่ 3 ทำซ้ำทำนองเดียวกันนี้ไปจนถึงหลอดที่ 9 สำหรับหลอดที่ 9 เมื่อผสมสารสกัดและอาหารเลี้ยงเชื้อเข้ากันได้ดีแล้วดูดสารละลายทิ้งไป 1 มิลลิลิตรส่วนหลอดที่ 10 จะมีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่มีสารสกัดจึงใช้เป็นหลอดชุดควบคุมผลบวก (positive control) จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงไปในหลอดที่ 1 - 9 หลอดละ 1 มิลลิลิตร (*C. albicans* เลี้ยงในอาหารเหลว SDB และทำวิธีเดียวกันกับแบคทีเรียข้างต้น) ซึ่งหลอดที่ 1 ที่มีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อแบคทีเรียใช้เป็นหลอดควบคุมผลลบ (negative control) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง (หลอดที่ใส่ *C. albicans* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 - 5 วัน) การอ่านผลการหา MIC ให้ดูจากความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละหลอดเปรียบเทียบกับหลอดชุดควบคุมผลบวกและนำหลอดนั้นมาทำ pour plate เพื่อนับจำนวนโคโลนี ถ้าพบว่าไม่มีโคโลนีขึ้นเลย แสดงว่านั้นคือค่า MBC ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

3. การตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศทั้งหมด (Total aerobic plate count)

นำสารสกัดใบพลูที่สกัดด้วยเอทานอลและโพรพิลีนไกลคอลทำ serial dilution จนได้ dilution 10^{-6} นำสารสกัดใบพลู ผลิตภัณฑ์ที่ใส่สารสกัดใบพลู และผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผสมสารสกัดใบพลูซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม แต่ละ dilution มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อแล้วเททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ SDB ปริมาณ 20 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันโดยทำ dilution ละ 3 ซ้ำ นำอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บ่มที่ 35 °C 3 – 5 วันและนำอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB บ่มเพาะที่ 35 °C 5 – 7 วัน นับจำนวนโคโลนีตั้งแต่ 30–300 โคโลนี นำค่าที่ได้ไปคำนวณตามสูตร

จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml) = จำนวนโคโลนีบนจานอาหาร X ระดับความเจือจาง

ปริมาณตัวอย่างที่ใส่ลงใน Petri dish

4. การเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์

ปรับความเข้มข้นของปริมาณสารสกัดใบพลูให้ได้ 2 % w/w

ตารางที่ 3.1 แสดงสูตรแชมพูจากสารสกัดใบพลู

ชื่อสารเคมี	% w/w	หน้าที่
Sodium lauryl ether sulfate	50.0	ทำความสะอาด และทำให้เกิดฟอง
Cocoamidopropyl betaine	4.5	เส้นผมนุ่ม ไม่พันกันและไม่ระคายเคืองต่อผมและผิว
Sodium chloride	1.5	เพิ่มความหนืด
Perfume	0.5	แต่งกลิ่น
Piper betel Linn. extract	2.0	ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์
Distilled water	58.5	ทำละลาย

(ดัดแปลงจาก Lelapornpichit, 2001)

วิธีทำ

1. นำSodium lauryl ether sulfateและ Cocoamidopropyl betaineและ Distilled water ใสในภาชนะต้มที่อุณหภูมิ 50 $^{\circ}$C คนให้เข้ากัน

2. ค่อยใส่ Sodium chloride ลงไปคนให้เข้ากันจากนั้นนำ *Piper betel* Linn. extract และ Perfumeลงไป คนให้เข้ากัน

3. ตั้งทิ้งไว้จนฟองยุบและนำใส่ภาชนะ

หมายเหตุ แชมพูที่ไม่ผสมสารสกัดพลู โดยในสูตร เพิ่มปริมาณ Distilled water เป็น 60.5 % w/w โดยไม่ใส่ *Piper betel* Linn. extract

ตารางที่ 2. แสดงสูตรสบู่เหลวจากสารสกัดใบพลู

ชื่อสารเคมี	% w/w	หน้าที่
Sodium lauryl ether sulfate	47.00	ทำความสะอาด และทำให้เกิดฟอง
Stearic acid	2.00	ให้ความชุ่มชื่น
Cocamidopropyl betaine	7.50	ลดแรงตึงผิวและทำความสะอาด
Coconut fatty acid	5.00	เพิ่มฟอง และความหนืด
Perfume	0.50	แต่งกลิ่น
Piper betel Linn. extract	2.00	ฆ่าเชื้อจุลลินทรีย์
Distilled water	36.50	ทำละลาย

(ดัดแปลงจาก Lelapornpichit, 2001)

วิธีทำ

1. นำ Sodium lauryl ether sulfate, Stearic acid,Cocamidopropyl betaine และ Distilled water ใสในภาชนะต้มที่อุณหภูมิ 50°C คนให้เข้ากัน

2. ค่อยๆใส่ Coconut fatty acid ลงไปคนให้เข้ากันจากนั้น นำ *Piper betel* Linn. extract และ Perfume ลงไป คนให้เข้ากัน

3. ตั้งทิ้งไว้จนฟองยุบและนำใส่ภาชนะ

หมายเหตุ สบู่เหลวไม่ผสมสารสกัดพลู โดยในสูตร เพิ่มปริมาณ Distilled water เป็น 38.5 % w/w โดยไม่ใส่ *Piper betel* Linn. extract

5. การตรวจวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ตามมาตรฐานโดยดูจากการพบแบคทีเรีย *S. aureus*, *P. aeruginosa, E. coli* และ *C. albicans* ว่ามีในตัวอย่างหรือไม่ด้วยวิธี Microbial limit test ซึ่งเป็นการทดสอบคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาสำหรับเภสัชภัณฑ์ทุกชนิดรวมทั้งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ตัวอย่างผลิตภัณฑ์บางชนิดอาจอนุญาตให้มีจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายและให้ตรวจพบในผลิตภัณฑ์ได้ ภายใต้เงื่อนที่กำหนด (Jinagun, 2012)

6. การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total antioxidant capacity)

6.1 การทดสอบด้วยวิธี DPPH assay (ดัดแปลงจาก Kriengsak et al., 2006)

นำตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) 190 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดนาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ microplate reader ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ trolox และรายงานผลเป็นปริมาณ trolox equivalent

6.2 การทดสอบด้วยวิธี ABTS assay (ดัดแปลงจาก Roberta et al., 1999)

นำตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย ABTS (2,2'-Azino-bis (3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดนาน 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ microplate reader ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ trolox เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ trolox และรายงานผลเป็นปริมาณ trolox equivalent antioxidant capacity

6.3 การทดสอบด้วยวิธี FRAP assay (ดัดแปลงจาก Ronald et al., 2005)

นำตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย FRAP (Ferric reducing antioxidant power) reagent ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดนาน 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ microplate reader ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตรทำการทดลอง 3 ซ้ำโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ trolox และรายงานผลเป็นปริมาณ trolox equivalent

6.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic compound) ใช้วิธี Folin-Ciocalteu (ดัดแปลงจาก Skereget et al., 2005)

นำตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ผสมกับ Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเติม 7.5% (w/v) Na_2CO_3ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ microplate reader ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรทำการทดลอง 3 ซ้ำเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Gallic acid และรายงานผลเป็นปริมาณ Gallic acid equivalent

7. การวิเคราะห์สารสำคัญในพลู

สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเครื่อง โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ยี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น 1260 Infinity โดยวิเคราะห์แบบ gradient ใช้ injuction value loop ที่ 20 µl และจับสัญญาณด้วยระบบ DAD SPD-20A สภาวะในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ในอัตราส่วนของ เมทานอล : น้ำ ที่เวลา 0-14 นาที ใช้ 50% ที่เวลา 15-30 นาที ใช้ 63% และที่เวลา 31- 35 ใช้ 30% อัตราการไหล (flow rate) ที่ 1 ml/min ปริมาณสารที่ใช้ฉีดตัวอย่างที่ 20 µl เวลาในการวิเคราะห์ที่ 30 นาทีต่อ 1 ตัวอย่าง และใช้คอลัมน์รุ่น column : Innertsil ODS-3 C18 (4.6 x 250 mm; 5um) สารมาตรฐานที่ใช้ คือ ยูกีนอล