บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

ประเทศไทย เป็นประเทศที่มีความเป็นมาเกี่ยวข้องกับสมุนไพรมาอย่างยาวนานไม่ว่าจะเป็นอาหารหรือยารักษาโรครวมไปถึงการนำสมุนไพรมาทำเป็นเครื่องประทินผิวโดยปัจจุบันได้มีการพัฒนาสมุนไพรไทยมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำเร็จรูปและเครื่องสำอาง (จันทน์ขาว, 2526) เพื่อจำหน่ายในประเทศและส่งขายนอกประเทศอย่างเป็นกระบวนการตลอดทั้งนโยบายและแผนยุทธศาสตร์ของรัฐบาลไทยก็ต้องการเสริมสร้างบทบาทให้ประเทศไทยเป็น แหล่งผลิตสมุนไพรแปรรูปทุกด้านและเป็นหนึ่งของโลกมหกรรมเครื่องสำอางสมุนไพรเอกลักษณ์แห่งความเป็นไทยต่อไป

สมุนไพรเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สำคัญมาก (ชยันต์ พิเชียรสุนทรและวิเชียร จีระวงศ์, 2543) และเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีคุณค่าในเรื่องของผิวพรรณหรือความงามอย่างมาก ฉะนั้นควรส่งเสริมให้นำใช้เป็นประโยชน์มากยิ่งขึ้น (นิจศิริ เรืองรังสีและพะยอม ตันติวัฒน์, 2534) พืชสมุนไพรในปัจจุบันในส่วนของภาครัฐและภาคเอกชนบางแห่งได้มีความพยายาม เพื่อพัฒนาและส่งเสริมที่จะให้มีการนำเอาประโยชน์จากพืชสมุนไพรมาใช้ให้มากยิ่งขึ้น โดยนำมาประยุกต์แปรรูป เพื่อสะดวกและง่ายแก่การนำมาใช้ เช่น ยารักษาโรค เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์บำรุงร่างกาย ดังนั้นถ้าได้มีการนำความรู้จากพืชสมุนไพรมาพัฒนากันอย่างจริงจังและต่อเนื่องก็จะช่วยลดการนำเข้าสารเคมีและยารักษาโรคจากต่างประเทศลงได้ (วงศ์สถิตย์ ฉั่วสกุลและคณะ, 2539) รวมทั้งยังเป็นการสานต่อมรดกทางปัญญาของคนโบราณให้คงอยู่และแพร่หลายต่อไป โดยปกติผิวหนังเมื่อแรกเกิดจะไม่มีเชื้อแบคทีเรียต่อมาจะมีเชื้อแบคทีเรียอาศัยโดยไม่ก่อให้เกิดโรคและตามส่วนต่างๆ ของร่างกายจะมีเชื้อแบคทีเรียไม่เหมือนกันหากแบคทีเรียมีมากก็ทำให้เกิดโรคหรือบริเวณนั้นมีสภาพแวดล้อมที่ผิดไป เช่น อับชื้น เสียดสี มีบาดแผล ติดเชื้อรา เชื้อไวรัส หรือร่างกายอ่อนแอ สาเหตุดังกล่าวทำให้ติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังได้หากรักษาช้าอาจจะทำให้เสียชีวิตได้ ซึ่งการวินิจฉัยทำได้โดยประวัติการเจ็บป่วยและการนำน้ำเหลืองหรือหนองจากบริเวณผื่นมาย้อมสีและเพาะเชื้อเพื่อหาสาเหตุเพราะการรักษาส่วนใหญ่จะตอบสนองดีต่อยาปฏิชีวนะชนิดรับประทาน ยาปฏิชีวนะมักจะไม่ค่อยได้ผลและยังอาจทำให้เกิดระคายเคืองต่อผื่นด้วยและอาจทิ้งปัญหาสารตกค้างจึงทำให้เกิดปัญหาในระยะยาวตามมาได้ไม่

ว่าจะเป็นการแพ้หรือทำผิวเสียสภาพเนื่องจากสารเคมีในปัจจุบันจึงมีการค้นหาวิธีธรรมชาติบำบัดเข้ามาในการรักษาผิวพรรณมากขึ้นเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาที่จะเกิดขึ้นจากสารเคมี

เนื่องจากใบพลูมี essential oil สีน้ำตาลปนเหลือง และมีกลิ่นฉุน และพบว่าสารประกอบหลักที่พบจาก essential oil เป็นสารประกอบฟีนอล ได้แก่ eugenol (Rawat et al., 1989), chavicol, caryophyllene และ β-sitosterol สามารถปลูกและเจริญเติบโตได้ดีในทุกภาคของประเทศไทยและในการผลิตก็พบแมลงศัตรูพืชที่มารบกวนไม่มากนักและพบว่าสารสกัดจากใบพลูสามารถยั้บยั้งการเติบโตของ *E. coli, S. aureus, S.Derby, S. Typhi, S. Typhimuriumo* และ *Lactobacillus sp*.ได้ (วาทินี จตุรพรชัย, 2546)

ทั้งนี้คณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นความสำคัญและประโยชน์ของพลูดังกล่าวที่จะสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้อย่างมีประสิทธิภาพ ได้ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมและเครื่องสำอางที่ไม่พบเชื้อ *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa, E.coli* และ *C. albicans* และจำนวนแบคทีเรียยีสต์ และ ราที่เจริญเติบโตโดยใช้อากาศ มีค่าไม่เกิน 1,000 CFU/ml (มอก. 152-2555)

นอกจากนั้นคณะผู้วิจัยมุ่งเน้นหาองค์ประกอบสำคัญเชิงเคมีในใบพลูเพราะเชื่อว่าใบพลูมีองค์ประกอบสำคัญที่สามารถนำมาผลิตเป็นยาต้านจุลินทรีย์และสารต้านอนุมูลอิสระทดแทนยาที่ต้องผลิตจากสารเคมีได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดพลูที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค
2. เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบสำคัญเชิงเคมีในสารสกัดจากพลู
3. เพื่อนำสารสกัดพลูที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากสารสกัดพลู

ขอบเขตของการวิจัย

1. วิเคราะห์หาองค์ประกอบสำคัญเชิงเคมีในสารสกัดจากใบพลูวิธีโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

2. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดพลูในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aurues, E. coli, P. aeruginosa* และ *C. albican* ด้วย 3 วิธีดังนี้

- วิธีทดสอบหาบริเวณการยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) ด้วยวิธี Agar diffusion techniques
- การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC)
- การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (Minimal bactericidal concentration, MBC)

3. การตรวจหา Total aerobic plate count ในสารสกัดพลูและผลิตภัณฑ์

4. การตรวจวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ตามมาตรฐานโดยดูจากการพบจุลินทรีย์ *S. aureus*, *E. coli, P. aeruginosa* และ *C. albicans* ในสารสกัดพลูและผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี microbial limit test

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น

5.1 การทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (Kriengsak et al., 2006)

5.2 การทดสอบด้วยวิธี ABTS assay (Roberta et al., 1999)

5.3 การทดสอบด้วยวิธี FRAP assay (Ronald et al., 2005)

5.4 การวิเคราะห์หาปริมาณฟีโนลิกทั้งหมด (total phenolic compound) ใช้วิธี Folin-ciocalteu (Skereget et al., 2005)

สมมติฐานการวิจัย

นอกจากใบพลูจะมีสรรพคุณในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ และยังพบอัลลิวไพรอแคทีซอล (APC1) และยูกีนอล 2 อีกด้วย จึงเหมาะที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่อง สำอางที่มีคุณภาพมาตรฐานและมีความปลอดภัยตามมาตรฐานในการผลิตเครื่องสำอาง (Good Manufacturing Practice : GMP) ฉะนั้นวัตถุประสงค์ในการทำวิจัยครั้งนี้คือเพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบสำคัญเชิงเคมีในสารสกัดจากใบพลู และจะหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดใบพลูที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญจุลินทรีย์เพื่อจะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ นอกจากนั้นไม่ควรพบจุลินทรีย์ก่อโรค *ต่อไปนี้คือ Candida albicans*, *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* และ *E.coli* ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากสารสกัดใบพลูให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพมาตรฐาน จึงต้องมีการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว ซึ่งเป็นการพัฒนาภูมิปัญญาท้องถิ่นให้กับเกษตรกรไทย ส่งเสริมการผลิตเครื่องสำอางภายในประเทศให้มีการพัฒนาก้าวหน้ายิ่งขึ้น

คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารสกัดใบพลู

พลูมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Piper betal* Linn. เป็นพืชในวงศ์ Piperaceae ชื่อสามัญ Betel Vine, Betel leaf vine, Betel pepper ชื่อท้องถิ่น ได้แก่ พลูจีน, พลูเหลือง, พลูหลวง (ภาคกลาง) , ซีเก้อ, พลูเป้ายวน, ซีเก (ใต้), พลู (ทั่วไป), ปู (พายัพ), ซีเกะ (นราธิวาส), กื่อเจี่ย (แต้จิ๋ว), จวี้เจี้ยง (จีนกลาง) พลูมีหลายพันธุ์ เช่น พลูเหลือง พลูทองหลาง เป็นต้น ซึ่งพลู (*Piper betle* L.) เป็นสมุนไพรของไทยที่มีความสำคัญทางการค้า เพื่อการส่งออก เนื่องจากพลูสามารถใช้ประโยชน์ได้มากมาย ทั้งด้านการ แพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรมพลู สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิอากาศเขตร้อนชื้นของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ลำต้นมีลักษณะเป็นไม้เถา เลื้อยพันตามต้นไม้อื่น มีใบเป็นใบเดี่ยวรูปหัวใจ ใบสีเขียวเหลืองถึงเขียวเข้ม เนื้อใบหนาเป็นมัน มีรสเผ็ดและกลิ่นหอมเฉพาะตัว มีดอกสีขาวออกเป็นช่อแน่นบนแกนยาวคล้ายพริกไทย ประชากรแถบอินเดียหรือจีนนิยมบริโภคใบพลู เพราะมีฤทธิ์ทาให้ปากสดชื่น (นิรมล สิงห์ทองรัตน์และคณะ, 2555)

2. การสกัดเย็น (Maceration)

คือ ขบวนการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือโถ เป็นต้น ทิ้งไว้ 7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อยๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยๆ รินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกากให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้นำไปกรอง การสกัดถ้าจะสกัดให้หมดจดอาจจำเป็นต้องสกัดซ้ำหลายๆ ครั้ง วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อนแต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก (วีณา จิรัจฉริยากูล, 2550)

3. *Candida albicans*

เป็นเชื้อยีสต์ที่มีอยู่ทั่วไปตาม ช่องปาก ทางเดินอาหาร ผิวหนัง โดยปกติมันก็จะอยู่กับเราได้โดยไม่เป็นอันตรายแต่หากภูมิคุ้มกันอ่อนแอหรือได้รับยาปฏิชีวนะเข้าไปเชื้ออื่นๆที่มีประโยชน์ในร่างกายอ่อนแอลงก็จะยอมให้เจ้าตัวนี้เพิ่มจำนวนมันจะกลายเป็นเชื้อฉวยโอกาส ก่อให้เกิดโรคผิวหนังได้เช่น เป็นขาวๆที่ช่องปาก เล็บ (creamy-white or bluish-white patches) หรือเป็นผื่นแดงๆ (red rush) เป็นสากๆ (scaly) เกิดการอักเสบตามผิวหนัง (inflammation) หรือแม้กระทั่ง คันและอักเสบบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์

4. *Staphylococcus aureus*

เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม แกรมบวกอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม อาศัยอยู่ตามผิวหนัง ลำคอ จมูก และลำไส้ของคนเป็นต้นเป็นแบคทีเรียที่เด่นในเรื่องผิวหนัง เนื่องจากโดยปกติมันอาศัยตามผิวหนังของคนเราหากมีบาดแผลหรือรอยถลอก เชื้อนี้จะสามารถเข้าสู่ร่างกายทางบาดแผลนี้และทำให้เกิดหนองถ้าในภาวะที่ร่างกายมีความต้านทานต่ำ เชื้อนี้ก็จะเข้าแทรกซ้อนได้และสามารถติดต่อจากคนสู่คนผ่านการสัมผัสแผล หนอง นอกจากนี้อาจทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดต่อไปได้

5. *Pseudomonas aeruginosa*

เป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่งแกรมลบ อาศัยอยู่ในน้ำ ดิน ของเน่าเสีย บางครั้ง พบในลำไส้ของคนและสัตว์เชื้อนี้มักจะแทรกซ้อน เช่น กรณีร่างกายได้รับอุบัติเหตุเกิดบาดแผล หรือรับการผ่าตัดร่างกายจะมีความต้านทานน้อยลงเมื่อได้รับเชื้อนี้เข้าไปอาจทำให้ถึงตายได้ซูโดโมนาส *(Pseudomonas)* นี้ยังดื้อต่อยาฆ่าเชื้อโรคบางชนิดได้ดังนั้นจึงเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดอาการแทรกซ้อนได้ง่าย เมื่อร่างกายอ่อน แอที่สำคัญในทางเครื่องสำอาง คือ หากเกิดการติดเชื้อที่ตาจะก่อให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อในตาซึ่งจะทำให้ตาบอดได้

7. *Escherichia coli*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative bacteria) รูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) สามารถก่อ ให้เกิดโรคที่ต่างๆ ในอวัยวะต่างๆ ของร่างกายได้ แต่ที่เด่นคือในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ *Proteus Eschericia* และ *Klebsiella*

8. MIC

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) หมายถึง วิธีหาปริมาณหรือความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารทดสอบที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญจุลินทรีย์ หน่วยที่ใช้โดยทั่วไปคือ มคก. (μg, mcg, microgram) ต่อ มล. (ml, milliliter) หรือหน่วยสากล (IU, international unit) ต่อ มล. ค่า MIC นำมาใช้เป็นค่าเปรียบเทียบเพื่อดูความไวของเชื้อหนึ่งๆ ต่อยาต้านทานจุลินทรีย์หลายๆ ชนิด

9. MBC

Minimum Bacterial Concentration (MBC) หมายถึง วิธีหาปริมาณหรือความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารทดสอบที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

10. HPLC

High performance liquid chromatographic (HPLC) เป็นวิธีที่ใช้แยกสารประกอบ ที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) หรือคอลัมน์ (column) กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณและสัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค เรียกว่า โครมาโตแกรม (chromatogram) ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์วัดได้ทั้งเชิงคุณภาพ (Qualitative Analysis) และเชิงปริมาณ (Quantitative Analysis) โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ส่วนใหญ่นิยมใช้วิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยยาก (Low Volatile Substation) หรือมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (High Molecular Weight Compounds) (Kupiecl, 2004)

11. จุลินทรีย์ก่อโรค (Pathogen)

หมายถึง จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในมนุษย์และสัตว์จุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญในอาหาร ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ได้แก่ ซาลโมเนลลา (*Salmonella*), คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ *(Clostridium perfringens)*, คลอสตริเดียม โบทูลินุม (*Clostridium botulinum*), บาซิลลัส ซีรีอุส (*Bacillus cereus*)

12. Inhibition zone

หมายถึง บริเวณแผ่นใสชุบตัวยาซึ่งแสดงถึงบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้งการเจริญ การวัดขนาด Inhibition zone จะวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใส

13. Total aerobic plate count

คือ วิธีการตรวจวิเคราะจุลินทรีย์ ที่นิยมใช้สำหรับการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ โดยดูจากจำนวนโคโลนี (colony) ที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ การนับจำนวนด้วยวิธี plate count จึงเป็นการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable count)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.ทราบหาองค์ประกอบสำคัญเชิงเคมีในสารสกัดจากใบพลู

2.ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจากสารสกัดใบพลูและผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบพลูที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้

3.สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากสารสกัดใบพลูที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้