บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

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) ขนาด 1-10 มิลลิลิตร, 20-200 ไมโครลิตร และ1-20 ไมโครลิตร
8. เครื่องอังน้ำ (water bath)
9. Tryptic Soy Broth (TSB)
10. Sabouraud Dextrose Broth (SDB)
11. ผงวุ้น (agar)
12. น้ำกลั่น (Demonize)
13. เครื่องนับโคโลนี
14. Cork borer ขนาด 6 มิลลิเมตร
15. เครื่องชั่ง (3 และ 4 ตำแหน่ง)
16. เอทานอล
17. เฮกเซน
18. กระดาษกรองเบอร์ 4
19. เครื่องปั่นหยาบ
20. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (sigma-aldrich)
21. Folin-Ciocateu reagent (Lobo)
22. Gallic acid monohydrate (sigma-aldrich)
23. Na_2CO_3 (Lobo)
24. 10% $AlCl_3.6H_2O$
25. 5% $NaNO_2$
26. Quercetin

27. Trolox (Sigma®, St. Louis, MO, USA)
28. Erytromyscin
29. PolymyxinB
30. Amphoterin B
31. spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu)
32. เชื้อจุลลินทรีย์ *S. aurues, P. aeruginosa, B. cecreus, C. albican* และ *E. coli*
33. Sodium chloride
34. Perfume
35. EMAL 28 CT(N)
36. Sodium Chloride
37. HH SLS Power
38. Lanolin
39. BMLAD25
40. Citric acid monohyd
41. HH Hairdhigh
42. TEXAPOn N70 T
43. LAS HH 2H
44. TRICLSAN
45. Amphitol 55 AB B
46. Sodium lauryl ether sulfate
47. Stearic acid
48. Cocamidopropyl betaine

ขั้นตอนการวิจัย

1. การสกัดหญ้าคา (ดัดแปลงจากวิธีของ Jinagun และคณะ 2012)

นำใบและรากหญ้าคาจาก อ. เมือง จ. เพชรบูรณ์ ล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้งน้ำโดยห้ามโดนแดดประมาณ 5 ชั่วโมง ปั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำมาสกัดด้วยวิธีหมัก (Maceration) โดยนำใบและรากหญ้าคา ที่หั่นแล้วประมาณ 2 กิโลกรัมแช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 1,000 มิลลิลิตรนาน 3 วันจากนั้นนำสารละลายออกมา และนำตัวทำละลายเอทานอล แช่ไปอีก 3 วันทำอย่างนี้ครบ 3 ครั้ง และกรองเอากากออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารสกัดที่ละลายด้วยเอทานอลทั้งหมดที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหย (Rotavapor II, BUCHI) จนกว่าตัวทำละลายระเหยออกไปทั้งหมด จากนั้นนำใบและรากหญ้าคา อีกประมาณ 2 กิโลกรัมแช่ตัวทำละลายเฮกเซนทำวิธีเดียวกัน แต่หลังจากระเหยเอาตัวทำละลายออกแล้วนำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้ง Freeze dry (Christ/Gamma 2-16) ชั่งน้ำหนัก เก็บสารสกัดนำใบและรากหญ้าคา รูปผงแห้ง จากนั้นเตรียมสารสกัดนำใบและรากหญ้าคา โดยนำไปละลายด้วย Absolute Ethanol ปรับให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัด

นำสารสกัดนำใบและรากหญ้าคา ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aurues* TISTR 1466, *P. aeruginosa* DMST 26217, *E.coli*. TISTR 780, *B.aureus* TISTR, *C. albican* TISTR 5779 และ *E.coli*. TISTR 780 ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัด คือ

2.1 การทดสอบหาบริเวณการยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) ด้วยวิธี Disc diffusion techniques

นำสารสกัดนำใบและรากหญ้าคา ละลายในเอทานอลและเฮกเซน ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aurues, P. aeruginosa, C. albicans, B. aureus* และ *E. coli* ด้วยวิธีการแพร่สาร ละลายในวุ้น (Disc diffusion technique) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Ahmed และ Beg (2001) นำแบคทีเรีย *S. aurues, B. aureus, P. aeruginosa* และ *E. coli* มาเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นของแบคทีเรียให้มีค่าเท่า กับค่ามาตรฐาน Mc Farland 0.5 เจือจางแบคทีเรียให้ได้ 10 เท่า (มีจำนวนเซลล์ $1.5x10^7$ CFU/ml) จากนั้นใช้ไม้พันสำลีป้ายสารแขวนลอยแบคทีเรีย *S. aurues*, *B. aureus*, *P. aeruginosa, C. albicans* และ *E.coli* บนอาหารวุ้น Tryptic Soy Agar (TSA) ปริมาตร 25 มิลลิลิตรใช้ Cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 8 หลุม นำสารสกัดนำใบและรากหญ้าคา ปรับความเข้มข้นเป็น 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 40 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในหลุม 6 หลุม ส่วนอีก 2 หลุม คือ สารละลายเอทานอล ปริมาตร 40 ไมโครลิตรซึ่งเป็นชุดควบคุมผลลบ (Negative control) และใช้ยาปฏิชีวนะ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

เป็นตัวควบคุมผลบวก (Positive control) หลังจากบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง จึงวัดบริเวณการยับยั้ง (Inhibition zone) แต่ละการทดลองทำ 3 ครั้งนำค่าที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration)

ทดสอบสารสกัดใบและรากหญ้าคากับเชื้อแบคทีเรีย *S. aurues P. aeruginosa, C. albicans, B.aureus* และ *E.coli* ดัดแปลงจากวิธีของ (Pojananukit & Kajomcheappunngam, 2010) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว TSB ปริมาณ 1 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด โดยเริ่มต้นนำหลอดทดลองที่ใส่ อาหารเหลวผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นแล้วดูดสารสกัดใบและรากหญ้าคา ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 2 หลอดละ 1 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นดูดสารในหลอดที่ 2 จำนวน 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดที่ 3 ทำซ้ำทำนองเดียวกันนี้ไปจนถึงหลอดที่ 9 สำหรับหลอดที่ 9 เมื่อผสมสารสกัดและอาหารอาหารเหลว TSB เข้ากันได้ดีแล้วดูดสารละลายทิ้งไป1มิลลิลิตรส่วนหลอดที่ 10 จะมีแต่อาหารเหลวTSBไม่มีเชื้อแบคทีเรียและไม่มีสารสกัดจึงใช้เป็นหลอดชุดควบคุมผลบวก (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) ซึ่งการอ่านผลการหา MICให้ดูจากความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละหลอดเปรียบเทียบกับหลอดชุดควบคุมผลบวกและนำหลอดนั้นมาทำ pour plate เพื่อนับจำนวนโคโลนี ถ้าพบว่าไม่มีโคโลนีขึ้นเลย แสดงว่านั้นคือค่า MBC ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

2.3 การตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศทั้งหมด (Total aerobic plate count)

นำสารสกัดหยาบใบและรากหญ้าคาที่สกัดด้วยเอทานอลและเฮกเซนทำ Serial dilution จนได้ dilution 10^{-6} นำสารสกัดใบและรากหญ้าคา ผลิตภัณฑ์ที่ใส่สารสกัดใบและรากหญ้าคาและผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผสมสารสกัดใบและรากหญ้าคา ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม แต่ละ dilution มา 1 มิลลิลิตร spread ใส่ลงจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ SDB ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ทำ Dilution ละ 3 ซ้ำ นำอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บ่มที่ 35 °C 3 – 5 วันและนำอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB บ่มเพาะที่ 35 °C 5 – 7 วัน นับจำนวนโคโลนีตั้งแต่ 30 – 300 โคโลนี นำค่าที่ได้ไปคำนวณตามสูตร

$$\text{จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบนจานอาหาร X ระดับความเจือจาง}}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่ใส่ลงใน Petri dish}}$$

3. การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

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

นำสารสกัดใบและรากหญ้าคา ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 1000 ppm ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดนาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงโดย Spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเขมขนของ Trolox (Sigma®, St. Louis, MO, USA) และรายงานผลเป็นปริมาณ trolox equivalent

4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic compound) ใช้วิธีFolin-Ciocalteu (ดัดแปลงจาก Skereget et al., 2005)

นำสารสกัดใบและรากหญ้าคา ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ น้ำบริสุทธิ์ (Deionized water) ปริมาณ 4 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 7.5% (w/v) Na_2CO_3 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช Spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเขมขนของ Gallic acid และรายงานผลเปนปริมาณ Gallic acid equivalent $Y = 0.0066x$; $R^2 = 0.9985$ ซึ่ง x แทน ค่าการดูดกลืนแสง และ Y แทน ปริมาณสารฟีโนลิก มีหน่วยเป็น mg GAE/g dry extract

5. การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอย์ด (Flavonoid content) ใช้วิธี Colorimetric method (ดัดแปลงจาก Bao et al., 2005)

นำสารสกัดใบและรากหญ้าคา ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่น้ำบริสุทธิ์ (deionized water) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร และ 5% $NaNO_2$ ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม10% $AlCl_3.6H_2O$ ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นเติม 1 M NaOH ปริมาณ 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเขมขนของ quercetin evaluates (mg QE/g of extract) ดังสมการ : $Y = 0.0019x$; $R^2 = 0.9949$ ซึ่ง x แทน ค่าการดูดกลืนแสง และ Y แทน ปริมาณสาร ฟลาโวนอย์ด มีหน่วยเป็น mg QE/g dry extract

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทุกตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ คิดเป็นค่าเฉลี่ย ด้วยโปรแกรม อโนวา ดันแคน (Duncan's test) ที่ความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ด้วยโปรแกรม SPSS

7. การเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์

ตาราง 3.1 สูตรครีมนวดผม

Inci name	Function	%w/w
Cetearyl alcohol	Coditioner base	5
&Dipalmitoylethylhydroxyethylmoniummethosulfate		
& Ceteareth 20		
Deionized water	Diluent	94
DMDM hydratoin	Preservative	0.5
	Active	

ตาราง 3.2 สูตรแชมพูสระผม

Inci name	Function	%w/w
Deionized water	Diluent	73.8
Sodium lauryl sulfate	Form booster	0.25
Linear alkyl benzene	Detergency	24.6
Sodium chloride	Viscosity	0.74
PEG-75 lanolin	Thickener	0.62
	Active	

ตาราง 3.3 สูตรสบู่เหลวล้างมือ

Inci name	Function	%w/w
Texapon N70	Detergency	32.80
Linear alkyl benzene	Detergency	16.04
Sodium lauryl sulfate	Detergency	0.32
Sodium chloride	viscosity	16.04
Tricosan	Antimicrobial	0.38
Cocamidopropylbetain	Form booster	0.64
Deionized water	Diluent	33.68
	Active	

ตาราง 3.4 สูตรสบู่เหลว

Inci name	Function	%w/w
Texapon N70	Detergency	32.80
Linear alkyl benzene	Detergency	16.04
Sodium lauryl sulfate	Detergency	0.32
Sodium chloride	viscosity	16.04
Deionized water	Diluent	33.68
	Active	

ตาราง 3.5 สูตรครีมบำรุงผิว

Inci name	Function	%w/w
Deionized water	Diluent	75
Novemer EC-1	Thickening agent	20
Glycerin	Humectants	3
Propylene glycol	Humectants	2
	Active	