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) 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
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. เชื้อจุลินทรีย์ *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 betain

2. ขั้นตอนการวิจัย

2.1 การสกัดสมุนไพรเหงือกปลาหมอ

นำใบและลำต้นเหงือกปลาหมอขาวจาก จ. สมุทรปราการ ด้วยทำละลายเอทานอลและเฮกเซน (ดัดแปลงจากวิธี ของ Dilokkunanant et al., 2000) ล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้งน้ำโดยห้ามโดนแดดประมาณ 5 ชั่วโมงหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำมาสกัดด้วยวิธีหมัก (maceration) โดยนำใบและลำต้นเหงือกปลาหมอ ที่หั่นแล้วประมาณ 2 กิโลกรัมแช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 1,000 มิลลิลิตรนาน 3 วัน เทตัวทำละลายที่มีสารสกัดออกเก็บไว้เติม เอทานอลใหม่ปริมาณเท่าเดิมลงไปในกากแช่นานอีก 3 วัน แยกตัวทำละลายที่มีสารสกัดครั้งที่สองออกนำมารวมกับสารสกัดที่ได้ในครั้งแรกทำอย่างนี้ครบ 3 ครั้ง และกรองเอากากออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารสกัดที่ละลายด้วยเอทานอลทั้งหมดที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator (Rotavapor II, BUCHI) จนตัวทำละลายระเหย

ออกไปหมด จากนั้นนำใบและลำต้นเหงือกปลาหมอ อีกประมาณ 2 กิโลกรัมแช่ตัวทำละลายเฮกเซนทำวิธีเดียวกันแต่หลังจากระเหยเอาตัวทำละลายออกแล้วนำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้ง Freeze dry (Christ/Gamma 2-16) ชั่งน้ำหนัก เก็บสารสกัดใบและลำต้นเหงือกปลาหมอรูปผงแห้ง จากนั้นเตรียมสารสกัดใบและลำต้นเหงือกปลาหมอ โดยนำไปละลายด้วย Absolute Ethanol ให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดเหงือกปลาหมอ

นำสารสกัดใบและลำต้นเหงือกปลาหมอไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *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

2.2.1 การทดสอบหาบริเวณการยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) ด้วยวิธี Disc diffusion techniques

นำสารสกัดใบและลำต้นเหงือกปลาหมอละลายในเอทานอลและเฮกเซน ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aurues P. aeruginosa, C. albicans, B.aureus* และ *E.coli* ด้วยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น (Disc diffusion technique) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Ahmed & Beg (2001) นำแบคทีเรีย *S. aurues, B. aureus, P. aeruginosa* และ *E. coli* มาเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นของแบคทีเรียให้มีค่าเท่ากับค่ามาตรฐาน 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 6 มิลลิลิตร เจาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 8 หลุม นำสารสกัดใบและลำต้นเหงือกปลาหมอปรับความเข้มข้นเป็น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 3.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในหลุม 6 หลุม ส่วนอีก 2 หลุม คือ สารละลายเอทานอลปริมาตร 40 ไมโครลิตรซึ่งเป็นชุดควบคุมผลลบ (Negative control) และใช้ยาปฏิชีวนะ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เป็นตัวควบคุมผลบวก (Positive control) หลังจากบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมงจึงวัดบริเวณการยับยั้ง (Inhibition zone) แต่ละการทดลองทำ 3 ครั้งนำค่าที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.2.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

ทดสอบสารสกัดใบและลำต้นเหงือกปลาหมอกับเชื้อแบคทีเรีย*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 จากนั้นแล้วดูดสารสกัดใบและลำต้นเหงือกปลาหมอที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 2 หลอดละ 1 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นดูดสารในหลอดที่ 2 จำนวน 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดที่ 3 ทำซ้ำทำนองเดียวกันนี้ไปจนถึงหลอดที่ 9 สำหรับหลอดที่ 9 เมื่อผสมสารสกัดและอาหารอาหารเหลว TSB เข้ากันได้ดีแล้วดูดสารละลายทิ้งไป 1

มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่ 10 จะมีแต่อาหารเหลว TSB ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย และไม่มีสารสกัดจึงใช้เป็นหลอดชุดควบคุมผลบวก (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 MIC ให้ดูจากความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละหลอดเปรียบเทียบกับหลอดชุดควบคุมผลบวกและนำหลอดนั้นมาทำ pour plate เพื่อนับจำนวนโคโลนี ถ้าพบว่าไม่มีโคโลนีขึ้นเลยแสดงว่านั้นคือค่า MBC ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

2.3 การตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศทั้งหมด (Total aerobic plate count)

นำสารสกัดใบและลำต้นเหงือกปลาหมอที่สกัดด้วยเอทานอลและเฮกเซนทำ Serial dilution จนได้ dilution 10^{-6} นำสารสกัดใบและลำต้นเหงือกปลาหมอ ผลิตภัณฑ์ที่ใส่สารสกัดใบและลำต้นเหงือกปลาหมอและผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผสมสารสกัดใบและลำต้นเหงือกปลาหมอซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมแต่ละ Dilution มา 1 มิลลิลิตร Spread ใส่ลงจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ SDB ปริมาณ 25 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันโดยทำ dilution ละ 3 ซ้ำ นำอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บ่มที่ 35 °C 3-5 วันและนำอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB บ่มเพาะที่ 35 °C 5-7 วันนับจำนวนโคโลนีตั้งแต่ 30-300 โคโลนี นำค่าที่ได้ไปคำนวณตามสูตร

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

2.4 การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

2.4.1 การทดสอบด้วยวิธี DPPH assay (ดัดแปลงจาก Kriengsak, Unaroj, & Kevin , 2006)

นำสารสกัดใบและลำต้นเหงือกปลาหมอปรับความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 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-2401 PC, Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Trolox (Sigma®, St. Louis, MO, USA) และรายงานผลเป็นปริมาณ trolox equivalent

2.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Compound) ใช้วิธี Folin-Ciocalteu (ดัดแปลงจาก Skereget et al., 2005)

นำสารสกัดใบและลำต้นเหงือกปลาหมอปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำบริสุทธิ์ (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 วัดค่าการดูดกลืนแสงใช้ Spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Gallic acid และรายงานผลเป็นปริมาณ Gallic acid equivalent $Y = 0.006x$ $R^2 = 0.9998$ ซึ่ง x แทนค่าการดูดกลืนแสงและ Y แทนปริมาณสารฟีโนลิก มีหน่วยเป็น mg GAE/g dry extract

2.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (Total Flavonoid content) ใช้วิธี colorimetric method (ดัดแปลงจาก Bao, Cai, Sun, Wang and Corke, 2005)

นำสารสกัดใบและลำต้นเหงือกปลาหมอ 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 ผสมให้เข้ากันทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จากนั้นเติม 1 M NaOH ปริมาณ 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ quercetin evaluates (mg QE/g of extract) ดังสมการ : $Y = 0.0019x$ $R^2 = 0.9949$ ซึ่ง x แทน ค่าการดูดกลืนแสง และ Y แทน ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ มีหน่วยเป็น mg QE/g dry extract

3. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทุกตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ คิดเป็นค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ด้วยโปรแกรมดันแคน (Duncan's test) ที่ความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

4. การเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์

ครีมนวดผม แชมพูสระผม สบู่เหลวล้างมือ ครีมบำรุงผิว และสบู่เหลว

ตารางที่ 3.1 สูตรครีมนวดผม

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

ตารางที่ 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	

ตารางที่ 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	

ตารางที่ 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	

ตารางที่ 3.5 สูตรครีมบำรุงผิว

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

Propylene glycol	Humectants Active	2