

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบพลู เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องสำอาง

Antimicrobial and Antioxidant Capacity of Leaf Extract of *Piper betle* Linn.
for Development to Cosmetics

ธิติมา ภาควิชา* กัลยาภรณ์ จันตรี และอรพิน โกมุติบาล
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

Thitima Parkpoom* Kanlayaporn Chuntree and Orapin Komutiban
Faculty of Science and Technology, Suan Dusit University

บทคัดย่อ

ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดใบพลูที่สกัดด้วยเอทานอลและโพรพิลีนไกลคอล โดยใช้จุลินทรีย์ 4 ชนิด ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง มอก. 152 - 2555 คือ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* และ *Candida albicans* พบว่าสารสกัดใบพลูสามารถต้านเชื้อได้ทุกตัว สารสกัดใบพลูด้วยเอทานอลต้านเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยมีบริเวณยับยั้งเชื้อ 2.93 ± 0.28 เซนติเมตร ที่ความเข้มข้น 12.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) เพียง 3.125 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ใส่สารสกัดใบพลู ซึ่งได้แก่ แชมพู และสบู่เหลวนั้น ไม่พบแบคทีเรีย ยีสต์ และราที่เจริญเติบโตโดยใช้อากาศเกินกว่ามาตรฐานผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (ไม่เกิน 1,000 CFU/มิลลิลิตร) นอกจากนี้ในการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระรวมพบว่า สารสกัดใบพลูด้วยเอทานอล มีค่าสารต้านอนุมูลอิสระจากวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAD assay เท่ากับ $3,653.01 \pm 57.72$, $17,261 \pm 697.00$ และ $3,616.99 \pm 41.49$ mg TAEC/gdw ตามลำดับ และมีปริมาณฟีนอลิกจากวิธี Folin - Ciocalteu ที่สูงถึง 538.33 ± 13.48 mg GAE/gdw ในขณะที่สารสกัดใบพลูด้วยโพรพิลีนไกลคอลก็ให้ผลการทดสอบเป็นที่น่าพอใจเช่นกัน ดังนั้นสารสกัดใบพลูจึงมีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่นอกจากจะสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญได้แล้ว ยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระซึ่งเป็นตัวการของริ้วรอยได้อีกด้วย

คำสำคัญ: สารสกัดใบพลู ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ สารต้านอนุมูลอิสระ

* ผู้ประสานงานหลัก (Corresponding Author)
e-mail: thi29th@hotmail.com

Abstract

From the test of antimicrobial capacity of the leaf extract of *Piper betle* Linn., extracted from ethanol and propylene glycol, using four pathogens according to the Thai Industrial Standards 152-2555: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*, it was found that the extract could inhibit all bacterial growth. The extract from ethanol inhibited *S. aureus* with the best result having an inhibition zone of 2.93 ± 0.28 cm at the concentration of 12.50 mg/ml. It had minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of 3.125 and 6.25 mg/ml, respectively. From the test of microbiological contamination of shampoo and liquid soap with the extract, there were no excess of aerobic bacteria, yeasts, or molds according to the cosmetic standard (not more than 1,000 CFU/ml). Moreover, from DPPH assay, ABTS assay, and FRAD assay, the extract had free radical scavenging activities of $3,653.01 \pm 57.72$, $17,261 \pm 697.00$, and $3,616.99 \pm 41.49$ mg TAEC/gdw, respectively. The total phenolic compound with Folin-Ciocalteu reagent was as high as 538.33 ± 13.48 mg GAE/gdw. Meanwhile, the extract from propylene glycol also provided satisfactory results. So, the leaf extract of *Piper betle* Linn. is very promising for cosmetic product development to not only inhibit relevant bacteria, but also scavenge free radicals which cause wrinkles.

Keyword: Leaf Extract of *Piper betle* Linn., Antimicrobial, Antioxidant Capacity

บทนำ

พลู (*Piper betle* Linn.) เป็นพืชไม้เลื้อยอยู่ในวงศ์ Piperaceae ปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทย นิยมปลูกตามบ้านเพื่อใช้ประโยชน์ด้านสมุนไพรมาตั้งแต่สมัยโบราณ เนื่องจากพลูมีสรรพคุณในการบำบัดโรคได้หลายอย่าง เช่น แก้อาการท้องอืด แน่นท้อง ขับลม ขับพยาธิ และแก้ปวดศีรษะ (Rugthaworn et al., 2010) ทุกส่วนของพลูสามารถใช้ได้ทั้งหมดไม่ว่าจะเป็นใบ ราก ลำต้นและผล เพราะพลูประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) สารต้านมะเร็ง (Anticancer) และสารต้านการแพ้ (Anti allergic) (Ghosh et al., 2014) เนื่องจากพลูมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ Eugenol, Chavibetol acetate, Hydroxychavicol, Fatty acids (Stearic and palmitic) และ Hydroxyl fatty acid esters (Stearic, Palmitic and myristic) โดยองค์ประกอบเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ โดยจะทำลาย Plasma cell membrane ของแบคทีเรีย (Rugthaworn et al., 2010) จากรายงานวิจัยของ Ambasta (1986) พบว่าสารสกัดใบพลูมี

คุณสมบัติในการต้านเชื้อรา (Antifungal) ด้านการอักเสบ (Anti inflammatory) และการต้านแบคทีเรีย (Antibacterial) ซึ่งการสกัดใบพลูในตัวทำละลายที่ต่างชนิดกันสามารถต้านแบคทีเรียได้แตกต่างกันมีรายงานพบสารสกัดใบพลูด้วยเอทานอลมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์และมีปริมาณฟีนอลิกสูง นอกจากนี้ในพลูยังมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญคือ Hydroxychavicol, Eugenol, Ascorbic acid and β -carotene ที่สามารถจะทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้ (Scavenging antioxidant) โดยจะป้องกันการเกิด Lipid peroxidation และ Peroxidation ได้ (Pelczar et al., 1993) และในปี 2013 Akter และคณะศึกษาพบส่วนประกอบของพลูโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติเหมาะสมในการที่ศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นยาได้นอกจากนี้ยังมีรายงานพบสารสกัดจากพลูยังสามารถนำไปพัฒนาเป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียและยาขับพยาธิ (Varunkumar et al., 2014) และพัฒนาเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Chanudom et al., 2014)

พืชมากกว่า 3,000 ชนิด รวมทั้งพืชสมุนไพรในประเทศไทยจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบเป็นจำนวนมาก (Dasgupta & De, 2004) โดยถือว่ากลุ่มสารประกอบฟีนอลิกเป็นเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ของพืช พบได้ในพืชแทบทุกชนิด ซึ่งมีการนำสารประกอบฟีนอลิกไปพัฒนาเป็นสารกันเสียที่ทำมาจากธรรมชาติได้ เพราะในสารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วยสารยับยั้งแบคทีเรีย มีกลไกในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียทำลายเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic membrane) และเยื่อหุ้มเซลล์ของโปรตีน (Membrane protein) (Hayriye & Melissa, 2015) และคุณสมบัติที่สำคัญคือสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Chanudom et al., 2014) โดยมีกลไกในการยับยั้งทำให้ลูกโซ่ของการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง (Chain-breaking antioxidant activity) (Dasgupta & De, 2004) ซึ่งในพืชต่างชนิดกันจะมีสารประกอบทางเคมีในพืช (Phytochemical) เช่น กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) และรงควัตถุ (Pigment) อัลคาลอยด์ (Alkaloids) ฟีนอลิก (Phenolics) อะซีโทเจนิน (Acetogenins) และเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) แตกต่างกันทำให้มีผลต่อค่าต้านอนุมูลอิสระได้ (Spigno et al., 2007) นอกจากนั้น Sundang et al. (2012) พบว่าสารสกัดใบพลูด้วยเมทานอลให้ทั้งสารประกอบฟีนอลและกรดฟีนอลิก เช่น กรดแกลลิก แคทีชิน และอีพิแคทีชิน แต่ในปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน (Girish & Satish, 2008)

จากฤทธิ์และคุณสมบัติของสารสกัดพลูที่กล่าวมาข้างต้น งานวิจัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดใบพลูที่สกัดด้วยเอทานอลและโพรพิลีนไกลคอล ซึ่งจะเป็ข้อมูลทางวิชาการในการยืนยันถึงสรรพคุณของใบพลู และการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดใบพลู เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการไปประยุกต์ใช้สารสกัดจากพลูสำหรับพัฒนาไปเป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียหรือพัฒนาเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติในเครื่องสำอางเพื่อลดริ้วรอยได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจากสารสกัดใบพลูและผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบพลู
2. เพื่อศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระรวมและหาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดใบพลู

วิธีการวิจัย

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 เทตัวทำละลายที่มีสารสกัดออกเก็บไว้ เติมเอทานอลใหม่ปริมาณเท่าเดิมลงไปในภาชนะนานอีก 3 วัน แยกตัวทำละลายที่มีสารสกัดครั้งที่สองออก นำมารวมกับสารสกัดที่ได้ในครั้งแรก ทำอย่างนี้ครบ 3 ครั้งและกรองเอากากออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารสกัดที่ละลายด้วยเอทานอลทั้งหมดที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator (Rotavapor II, BUCHI) จนตัวทำละลายระเหยออกไปหมด จากนั้นนำพลูอีกประมาณ 2 กิโลกรัมแช่ด้วยตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอลทำวิธีเดียวกัน แต่หลังจากระเหยเอาตัวทำละลายออกแล้ว นำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้ง Freeze dry (Christ/Gamma 2-16) ซึ่งน้ำหนัก เก็บสารสกัดใบพลูในรูปผงแห้ง จากนั้นเตรียมสารสกัดใบพลูโดยนำไปละลายด้วยเอทานอลและโพรพิลีนไกลคอลให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดใบพลู

นำสารสกัดใบพลูไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* 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. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* และเชื้อรา *C. albicans* ด้วยวิธีการแพร่สารละลายในวุ้น (Agar diffusion technique) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Ahmed & Beg (2001) นำแบคทีเรีย *S. aureus* *P. aeruginosa* และ *E. coli* มาเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 18 ชั่วโมง ส่วน *C. albicans* เลี้ยงในอาหารเหลว Sabouraud Dextrose Broth (SDB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 3 - 5 วัน ปรับค่าความขุ่นของแบคทีเรียให้มีค่าเท่ากับค่ามาตรฐาน Mc Farland 0.5 เจือจางแบคทีเรียให้ได้ 10 เท่า (มีจำนวนเซลล์ 1.5×10^7 CFU/ml) จากนั้นใช้ไม้พ่นสำลีป้ายสารแขวนลอยแบคทีเรีย

S. aureus, *P. aeruginosa*, *E. coli* และ *C. albicans* บนอาหารวุ้น Mannitol Salt Agar (MSA) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใช้ 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/มิลลิลิตร และ 1.56 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในหลุม 7 หลุม ส่วนอีก 2 หลุม คือ สารละลายเอทานอล ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นชุดควบคุมผลลบ (Negative control) และใช้ยาปฏิชีวนะ เจนตาไมซิน (Gentamicin) 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เป็นตัวควบคุมผลบวก (Positive control) หลังจากบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จึงวัดบริเวณการยับยั้ง (Inhibition zone) แต่ละการทดลองทำ 3 ครั้ง นำค่าที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นทำวิธีเดียวกันโดยนำสารสกัดใบพลูด้วยโพรพิลีนไกลคอลมาละลายในโพรพิลีนไกลคอล แต่จะใช้สารละลายโพรพิลีนไกลคอลเป็นชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

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

ทดสอบสารสกัดใบพลูกับเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*, *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 มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่ 10 จะมีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่มีสารสกัดจึงใช้เป็นหลอดชุดควบคุมผลบวก (Positive control) จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงไป ในหลอดที่ 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 ให้ดูจากความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละหลอดเปรียบเทียบกับหลอดชุดควบคุมผลบวก และนำหลอดนั้นมาทำ Pour plate เพื่อนับจำนวนโคโลนี ถ้าพบว่าไม่มีโคโลนีขึ้นเลย แสดงว่านั่นคือค่า MBC ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

3. การตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศทั้งหมด (Total aerobic plate count)

นำสารสกัดใบพลูที่สกัดด้วยเอทานอลและโพรพิลีนไกลคอลทำ Serial dilution จนได้ Dilution 10^{-6} นำสารสกัดใบพลู ผลิตภัณฑ์ที่ใส่สารสกัดใบพลู และผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผสมสารสกัดใบพลู ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม 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

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

4. การเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์

ปรับความเข้มข้นของปริมาณสารสกัดใบพลูให้ได้ 2 % w/w

ตารางที่ 1 สูตรแชมพูจากสารสกัดใบพลู

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
<i>Piper betel</i> Linn. extract	2.0	ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์
Distilled water	58.5	ทำละลาย

(ดัดแปลงจาก Lelapompichit, 2001)

4.1 วิธีทำแชมพูจากสารสกัดใบพลู

4.1.1 นำ Sodium lauryl ether sulfate และ Cocoamidopropyl betaine และ Distilled water ใส่ในภาชนะตมที่อุณหภูมิ 50 °C คนให้เข้ากัน

4.1.2 ค่อยใส่ Sodium chloride ลงไป คนให้เข้ากันจากนั้นนำ *Piper betel* Linn. extract และ Perfume ลงไป คนให้เข้ากัน

4.1.3 ตั้งทิ้งไว้จนฟองยุบและนำใส่ภาชนะ

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

ตารางที่ 2 สูตรสบู่เหลวจากสารสกัดใบพลู

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

(ดัดแปลงจาก Lelapornpichit, 2001)

4.2 วิธีทำสบู่เหลวจากสารสกัดใบพลู

4.2.1 นำ Sodium lauryl ether sulfate, Stearic acid, Cocamidopropyl betaine และ Distilled water ใส่ในภาชนะต้มที่อุณหภูมิ 50°C คนให้เข้ากัน

4.2.2 ค่อยๆ ใส่ Coconut fatty acid ลงไปคนให้เข้ากัน จากนั้น นำ *Piper betel* Linn. extract และ Perfume ลงไป คนให้เข้ากัน

4.2.3 ตั้งทิ้งไว้จนฟองยุบและนำใส่ภาชนะ

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

5. การตรวจวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ตามมาตรฐาน

โดยดูจากการพบแบคทีเรีย *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* และ *C. albicans* ว่ามีในตัวอย่างหรือไม่ด้วยวิธี Microbial limit test ซึ่งเป็นการทดสอบคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาสำหรับเภสัชภัณฑ์ทุกชนิดรวมทั้งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตตัวอย่างผลิตภัณฑ์บางชนิดอาจอนุญาตให้มีจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายและให้ตรวจพบในผลิตภัณฑ์ได้ ภายใต้เงื่อนไขที่กำหนด (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 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ 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_3 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Gallic acid และรายงานผลเป็นปริมาณ Gallic acid equivalent

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การสกัดใบพลู

จากการนำใบพลูสดผึ่งแห้งน้ำหนัก 2 กิโลกรัม มาแช่ด้วยสารละลายเอทานอลและโพรพิลีนไกลคอลได้ผลดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ลักษณะทางกายภาพและเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดใบพลูที่แช่ด้วยตัวทำละลาย

ชนิดของตัวทำละลาย	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	เปอร์เซ็นต์ผลผลิต (%กรัมต่อน้ำหนัก)	ลักษณะทางกายภาพ
เอทานอล	270.00	13.50	เหนียว สีน้ำตาลเข้ม
โพรพิลีนไกลคอล	186.50	9.33	เหลวหนืด สีน้ำตาล

จากตารางจะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตสารสกัดใบพลูสกัดด้วยเอทานอลได้มากกว่าโพรพิลีนไกลคอล เนื่องจากพลูมีสารที่สำคัญ เช่น Chavibetol, Egenol, Allyl pyrocatechol, Hydroxylchavicol ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิก (Dwivedi & Tripathi, 2014) จะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล เอทานอล อะซิโตน อีเทอร์ และเอซิลอะซิเตรต (Stalikas, 2007) โดยปกติสารสำคัญในพืชแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความมีขีดความสามารถในการสร้างพันธะไฮโดรเจน และการสร้างแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลเป็นต้น ซึ่งพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจะสกัดสารสำคัญออกมาได้ในปริมาณที่มากกว่าเนื่องจากโมเลกุลของเอทานอล (C_2H_5OH) มีขนาดเล็กกว่าโพรพิลีนไกลคอล ($CH_3CH(OH)CH_2OH$) จึงทำให้สามารถเข้าล้อมจับและสร้างพันธะไฮโดรเจนได้ดีกว่าโมเลกุลของโพรพิลีนไกลคอล (Johnson, 1999) ซึ่งสาเหตุที่คณะผู้วิจัยเลือกโพรพิลีนไกลคอลมาเป็นตัวทำละลายเพราะโพรพิลีนไกลคอลเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น รสชาติค่อนข้างขม ใช้เป็นตัวทำละลายทั่วไปและปลอดภัยต่อการใช้ ไม่ระคายเคืองต่อดวงตาและผิวหนัง (Guillot et al., 1982) ส่วนมากจะใช้เป็นส่วนผสมอาหาร เป็นส่วนประกอบให้ความชุ่มชื้นในเครื่องสำอางประเภทแชมพู โลชั่น และครีมโกนหนวด เป็นส่วนประกอบยาประเภทครีม ใช้เป็นตัวสารละลายพวกสารหอมระเหยได้ นอกจากนี้ยังพบว่าโพรพิลีนไกลคอลมีคุณสมบัติคือให้ความชุ่มชื้น (Humectants) ถนอมอาหาร (Preservation) และมีความคงทน (Stabilizer) พบได้ในอาหารสัตว์ เบเกอรี่ สลัด และสารปรุงแต่ง (Lawrite, 1982) จึงเป็นเหตุผลในการเลือกใช้สารดังกล่าวเพื่อจะได้นำมาพัฒนาเป็นเครื่องสำอางต่อไปได้นอกจากนั้นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตสารสกัดพลูที่แช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอลได้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตมากกว่า Rugthaworn et al. (2010) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบพลูจากการสกัดเย็นด้วยเอทานอล พบว่าสามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนในหิ้งน้ำสาธารณะได้โดยมีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตจากพลูเท่ากับ 10.53 และจากการศึกษาประสิทธิภาพสารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในพืชในวงศ์ Piperaceae ทางเหนือประเทศอินเดียได้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตการสกัดพลูด้วยเอทานอลเท่ากับ 8.1 ± 0.95 (Tamuly et al., 2015) แต่ได้ผลแตกต่างจาก Sukatta et al. (2004) ที่รายงานการศึกษาสารสกัดใบพลูแห้งด้วย 95% เอทานอลสาร สกัดหยาบที่ได้มีลักษณะเป็นสารเหนียวสีเขียวปนน้ำตาลเข้มและได้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต 1.49 ซึ่งน่าจะเกิดจากการใช้ใบพลูแห้งจึงได้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตน้อย

2. การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* และเชื้อรา *C. albicans* ของสารสกัดใบพลู

2.1 จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดใบพลู ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* และเชื้อรา *C. albicans* ด้วยวิธี Agar diffusion technique พบว่า สารสกัดใบพลูละลายด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบได้มีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 4 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสารสกัดใบพลูสามารถต้านเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 12.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ได้บริเวณยับยั้งเชื้อ 2.93 ± 0.28 เซนติเมตร และต้านเชื้อ *E. coli* ที่ความเข้มข้นที่ 50.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ได้บริเวณการยับยั้งการเจริญ 1.33 ± 0.05 เซนติเมตร ความเข้มข้นที่ 100.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ได้บริเวณการยับยั้งการเจริญ 1.63 ± 0.15 เซนติเมตร ซึ่งได้ผลการทดลองที่ดีกว่า จากรายงานการทดสอบพืชสมุนไพรไทย มะม่วงหิมพานต์ หมอยหอม มั่นปฐ มะเดื่ออุทุมพร ทำมั่ง กระเพรา โหระพา ชะพู มะกอก หว้า เสม็ดชุน พลู และใบว่านพญานาญ พบว่าสารสกัดพลูสกัดด้วยเอทานอลมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อ *S. aureus* ความเข้มข้น 12.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ได้บริเวณการยับยั้งการเจริญ เท่ากับ 2.20 เซนติเมตรและสามารถต้าน *E. coli* ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ได้บริเวณการยับยั้งการเจริญ 0.80 เซนติเมตรและ 1.10 เซนติเมตรตาม ลำดับ (Chanudom et al., 2014) สอดคล้องกับรายงานการศึกษา พบว่าสารสกัดพลูสกัดด้วยเอทานอลมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อ *S. aureus* โดยมีค่า Antimicrobial Index เท่ากับ 4.95 และมีรายงานสารสกัดพลูสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ในกลุ่ม β -hemolytic streptococcus group A, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis* และ *Aspergillus niger* (Rugthaworn et al., 2010) นอกจากนั้น Khmdang et al. (2012) พบว่า สารสกัดพลูด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. faecalis* ที่ความเข้มข้นที่ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ได้บริเวณการยับยั้งการเจริญ 1.24 ± 0.01 เซนติเมตร โดยมีค่า Antimicrobial Index เท่ากับ 1.5 ± 0.03 และมีการรายงานการทดลองพบว่า สารสกัดพลูสกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุดได้บริเวณยับยั้งเชื้อ 2.10 เซนติเมตร รองลงมาคือสารสกัดจากฝรั่งชุมเห็ดเทศ และ สับปะรด ส่วนสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุดคือ สารสกัดจากฝรั่ง มีบริเวณยับยั้งเชื้อ 2.16 เซนติเมตร รองลงมาคือ สารสกัดพลู ชุมเห็ดเทศและสับปะรด ได้บริเวณการยับยั้งการเจริญ 1.50 เซนติเมตร 1.43 เซนติเมตรและ 1.40 เซนติเมตรตามลำดับ (Swangarrum & Junlak, 2011) จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มากกว่า จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้มากกว่าสารสกัดที่ความเข้มข้นน้อยกว่า ซึ่งให้เห็นว่าการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแปรผันโดยตรงกับปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดทั้งเชื้อ *S. aureus* และ *P. aureus* (Pojananukit & Kajomcheappunngam, 2010) ส่วนสารสกัดใบพลูด้วยโพพิลีนไกลคอลไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* และ *C. albican* ได้จากวิธีนี้ (ตารางที่ 4) จึงใช้วิธีเจือจางในอาหารเหลวร่วมด้วย พบว่าสารสกัดใบพลูด้วยสารละลายโพพิลีนไกลคอลสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 4ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* และ *C. albican* ของสารสกัดใบพลู

ความเข้มข้น (mg/ml)	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณการยับยั้งการเจริญ (เซนติเมตร)									
	สารสกัดใบพลูละลายด้วยเอทานอล				สารสกัดใบพลูละลายด้วยโพธิ์สปีโนไกลคอล					
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>		
100	3.53 ± 0.10 ^a	1.80 ± 0.15 ^b	1.3 ± 0.30 ^{b,c}	1.63 ± 0.15 ^b	0	0	0	0		
50	3.51 ± 0.30 ^a	1.47 ± 0.10 ^{b,c}	1.13 ± 0.20 ^{b,c}	1.33 ± 0.05 ^{b,c}	0	0	0	0		
25	3.10 ± 0.28 ^a	0.93 ± 0.07 ^c	0.60 ± 0.14 ^c	1.03 ± 0.24 ^{b,c}	0	0	0	0		
12.50	2.93 ± 0.28 ^{b,c}	0	0	0	0	0	0	0		
6.25	0	0	0	0	0	0	0	0		
3.125	0	0	0	0	0	0	0	0		
1.56	0	0	0	0	0	0	0	0		
เจือจางไม่ขึ้น	5.02 ± 0.23 ^d	4.5 ± 0.22 ^d	3.42 ± 0.12 ^a	3.2 ± 0.34 ^a	4.42 ± 0.24 ^d	3.5 ± 0.22 ^a	4.32 ± 0.12 ^d	3.12 ± 0.34 ^a		
เอทานอล	0	0	0	0	-	-	-	-		
โพธิ์สปีโนไกลคอล	-	-	-	-	0	0	0	0		

หมายเหตุ a,b,c,d แสดงถึงผลการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P ≤ 0.05)
- ไม่ได้ทดสอบ

ตารางที่ 5ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดใบพลูโดยการเจือจางในอาหารเหลว (Broth Dilution Inhibit Bacteria)

ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	สารสกัดใบพลูละลายด้วยเอทานอล				สารสกัดใบพลูละลายด้วยโพรพิลีนไกลคอล			
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>
100	+	+	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	+	-
12.50	+	+	+	-	+	+	+	-
6.25	+	+	+	-	-	+	+	-
3.125	+	+	+	-	-	-	-	-
1.56	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-

+ ยับยั้งเชื้อได้ (หลอดใส) - ยับยั้งเชื้อไม่ได้ (หลอดขุ่น)

ตารางที่ 6 แสดงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดใบพลูในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* และ *C. albicans*

ความเข้มข้น	สารสกัดใบพลูละลายด้วยเอทานอล				สารสกัดใบพลูละลายด้วยโพรพิลีนไกลคอล			
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>
MIC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	3.125	3.125	3.125	25.00	12.50	6.25	6.25	50.00
MBC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	6.25	6.25	3.125	25.00	12.50	12.50	6.25	50.00

2.2 ผลการทดสอบการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดใบพลูด้วยวิธีการเจือจางในอาหารเหลว

จากผลการยับยั้งแบคทีเรียด้วย Agar diffusion technique แล้ว จึงยืนยันฤทธิ์ของสารสกัดใบพลูละลายด้วยโพรพิลีนไกลคอล โดยใช้วิธีเจือจางในอาหารเหลวเพื่อหา MIC ของสารสกัดใบพลู ได้ผลดังตารางที่ 5 และ 6 พบว่า สารสกัดใบพลูสกัดด้วยโพรพิลีนไกลคอลสามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุด โดยให้ค่า MIC และ MBC เท่ากันคือ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนค่า MIC และ MBC ของสารสกัดใบพลูสกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* มีค่าเท่ากัน คือ 3.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ และให้ค่า MIC และ MBC ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* มีค่าเท่ากับ 3.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งแสดงค่า MIC และ MBC ยับยั้งเชื้อได้ที่ความเข้มข้นที่น้อยกว่ารายงานวิจัยของ Chanudom et al. (2014) จากการทดสอบพืชสมุนไพรไทย 13 ชนิด (มะม่วงหิมพานต์ หนุมาน หอม มั่นปุม มะเดื่ออุทุมพร ทำมั่ง กระเพรา โหระพา สะพู มะกอก หว้า เสม็ดชุน พลู และใบवान พญานร) พบว่าสารสกัดพลูด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้มากที่สุด โดยให้ค่า MIC และ MBC ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* มีค่าเท่ากับ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Khamdang et al. (2010) พบว่า สารสกัดใบพลูด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. faecalis* โดยมีค่า MBC เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากผลการทดลองเห็นได้ว่า สารสกัดใบพลูละลายด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้สูงกว่าสารสกัดใบพลูละลายด้วยโพรพิลีนไกลคอล โดยจะยับยั้ง *S. aureus* ได้มากที่สุด สอดคล้องกับรายงานวิจัยพบว่า สารสกัดใบพลูสกัดด้วยเอทานอลสามารถฆ่า *S. aureus* ซึ่งเกิดจากการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ของแบคทีเรีย (Inoue et al., 2004) รวมทั้งยังมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) และแกรมบวก (Gram-positive) (Windell et al., 2015)

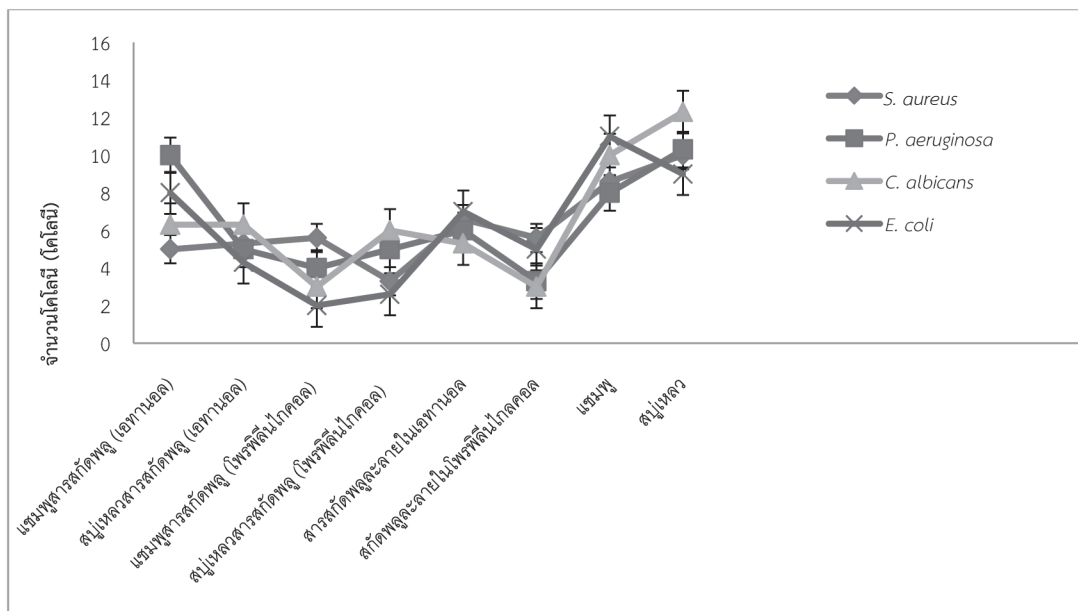
3. การตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศทั้งหมด (Total aerobic plate count)

ผลจากการตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศทั้งหมดในสารสกัดใบพลู แคมพูและสบู่เหลวที่มีส่วนผสมสารสกัดใบพลู แคมพูและสบู่เหลวที่ไม่ผสมสารสกัดใบพลูซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมพบว่า ในแต่ละตัวอย่างมีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 30 โคโลนี จึงสามารถสรุปได้ว่า ในตัวอย่างทั้งหมดไม่มีจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศปนเปื้อน

4. การตรวจวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ตามมาตรฐาน (Microbial limit test)

ผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ตามมาตรฐาน *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* และ *C. albicans* ในแคมพูและสบู่เหลวที่ผสมสารสกัดใบพลู และแคมพูและสบู่เหลวที่ไม่ผสมสารสกัดใบพลู ด้วยวิธี Microbial limit test เห็นได้ว่า ในทุกตัวอย่างมีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 30 โคโลนี (ดังภาพที่ 1) ไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนดังกล่าว จะเห็นว่าสารสกัดใบพลูเหมาะสมที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์

เครื่องสำอางต่อไปได้เพราะไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง มอก. 152 - 2555 (TIS. 152 - 2012)



ภาพที่ 1 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ตามมาตรฐาน *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* และ *E. coli*

5. การหาสารต้านอนุมูลอิสระรวม และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

จะเห็นว่าผลการต้านอนุมูลอิสระรวมและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดใบพลูด้วยเอทานอลมีปริมาณมากกว่าสารสกัดใบพลูด้วยโพธิ์ตีนไก่ (ดังตารางที่ 7) จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay, FRAP assay และ Folin-Ciocalteu เนื่องจากสารสกัดใบพลูด้วยโพธิ์ตีนไกละลอสารต้านอนุมูลอิสระในพลูออกมาได้น้อยกว่าจึงส่งผลให้สารต้านอนุมูลอิสระในพลูทำลายอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอช ฟอกสีอนุมูลอิสระเอปี้ทีเอส และรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (Tamuly et al., 2015) ได้น้อยกว่าสารสกัดใบพลูด้วยเอทานอล และจากผลการทดลองพบว่า สารสกัดใบพลูด้วยเอทานอลจะให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมเท่ากับ $17,348.28 \pm 697.00$ mg TAEC/gdw เมื่อตรวจด้วยวิธี ABTS assay และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก รวม 539.67 ± 13.48 mg TAEC/gdw ได้ผลดีกว่ารายงานวิจัยของ Maisuthisakul (2008) พบว่า การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระจากสกัดใบพลูด้วยเอทานอลโดยวิธี ABTS assay และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu มีค่าเท่ากับ $12,595 \pm 20.03$ mg TAEC/gdw และ 50.38 ± 0.08 mg TAEC/gdw ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ

Tangpong et al. (2014) พบว่าสารสกัดพลูสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 474.083 ± 0.005 mg GAE/gdw ซึ่งมีปริมาณมากที่สุดจากการทดสอบพืชสมุนไพรไทย 13 ชนิด (มะม่วงหิมพานต์ หนุมาน หอม มันทู มะเดื่ออุทุมพร ทามัง กระเพรา โหระพา สะพู มะกอก หว้า เสม็ดชุน และใบว่าน พญานา) นอกจากนั้น Akter et al. (2013) ได้ศึกษาสารสกัดพลูด้วยเมทานอลมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์และพยาธิโดยให้ค่าสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 124.42 ± 0.14 mg TAEC/gdw และให้ค่าสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นด้วย ซึ่งพลูให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด จากการรายงานของ Tamuly et al. (2015) ศึกษาประสิทธิภาพสารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในพืชในวงศ์ Pieraceae ได้แก่ *Piper betle* Linn, *Piper betle oides* C.DC. และ *Piper wallichii* (Miq.) Hand.-Mazz. จากทางเหนือของประเทศอินเดียด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่าให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 56.3 ± 0.86 mg GAE/gdw 27.1 ± 0.96 mg GAE/gdw และ 26.3 ± 1.23 mg GAE/gdw ตามลำดับ เห็นได้ว่าพลูให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด นอกจากนั้น Abraham et al. (2012) พบว่าการใช้ตัวทำละลายแตกต่างกันในการสกัดพลูจะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมแตกต่างกันคือน้ำ 47.72 ± 5.38 mg GAE/gdw เมทานอล 52.25 ± 5.49 mg GAE/gdw เอธิลอะซิเตรต 852.3 ± 4.71 mg GAE/gdw และเฮกเซน 266.92 ± 6.06 mg GAE/gdw จะส่งผลให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ต่างกันคือเมทานอลให้ค่า IC₅₀ 345.7 ± 4.04 μ g/L เอธิลอะซิเตรต 40 ± 0.03 μ g/L และเฮกเซน 144.3 ± 1.15 μ g/L เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay สอดคล้องกับการวิจัยในครั้งนี้ที่ใช้ตัวทำละลายแตกต่างกันจะส่งผลให้ค่าต้านอนุมูลอิสระรวมและปริมาณฟีนอลิกรวมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนั้นมีรายงานวิจัยพบว่า องค์ประกอบที่สำคัญในพลู เช่น Allyl pyrocatechol และ Hydroxylchavicol มีคุณสมบัติเป็นสารฟีนอลิก สารต้านอนุมูลอิสระ และต้านอักเสบ (Baliga et al., 2012) Eugenol และ Quercetin มีคุณสมบัติต้านแบคทีเรีย ต้านอนุมูลอิสระ ส่วน β -caryophyllene จะมีคุณสมบัติต้านอักเสบเช่นกัน (Dwivedi & Tripathi, 2014) ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้เป็นส่วนสำคัญที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและจากผลการทดลองพบว่า สารต้านอนุมูลอิสระรวมให้ผลทิศทางเดียวกันกับปริมาณฟีนอลิกรวม เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติประเภทฟีนอลซึ่งมีความสามารถในการให้ไฮโดรเจน (Hydrogen; H) ทำให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้จะไปแทนที่ในตำแหน่งออกซิ (Autho) ด้วยหมู่ที่สามารถให้อิเลคตรอนได้ง่าย โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสามารถในการให้อิเลคตรอนหรือความสามารถในการให้ไฮโดรเจนเพื่อต้านอนุมูลอิสระจะมีความสัมพันธ์กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group; -OH) (Saenthaweek et al., 2012) เนื่องจากพลูมีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบมากจึงสามารถมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (Windell et al., 2015) จากผลการทดลองพบว่า สารต้านอนุมูลอิสระรวมและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดพลูด้วยเอทานอลมีปริมาณมากกว่าสารสกัดใบพลูด้วยโพรพิลีนไกลคอลเนื่องจากใช้ตัวทำละลายที่ต่างกันในการสกัด

ตารางที่ 7 แสดงสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวมเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay, FRAP assay และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดใบพลู

สารที่ใช้เป็น ตัวสกัด	DPPH (mg TAEC/gdw)	ABTS (mg TAEC/gdw)	FRAP (mg TAEC/gdw)	Total phenolic (mg GAE/gdw)
เอทานอล	3,653.01 ± 57.72 ^c	17,348.28 ± 697.00 ^d	3,617.59 ± 41.49 ^c	539.67 ± 13.48 ^b
โพรพิลีนไกลคอล	126.02 ± 11.88 ^a	813.421 ± 26.69 ^b	150.982 ± 8.57 ^a	2.915 ± 0.03 ^a

หมายเหตุ a, b, c, d แสดงถึงผลการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบพลูที่สกัดด้วยเอทานอลและโพรพิลีนไกลคอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* และ *C. albicans* และตรวจการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ ที่ผสมสารสกัดใบพลูพบว่าผลิตภัณฑ์แชมพู และสบู่เหลวไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว นอกจากนั้นปริมาณแบคทีเรียยีสต์และราที่เจริญเติบโตโดยใช้อากาศพบว่า ในผลิตภัณฑ์มีค่าไม่เกิน 1,000 CFU/ml ซึ่งเป็นไปตามค่ามาตรฐานผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ห้ามปนเปื้อนในการผลิตเครื่องสำอางตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ถึงแม้ว่าฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารละลายเอทานอลจะยับยั้งจุลินทรีย์ได้มากกว่าสารละลายโพรพิลีนไกลคอล แต่สารละลายโพรพิลีนไกลคอลมีความปลอดภัยและไม่ระคายเคืองต่อผิวหนังและดวงตา นอกจากนั้นพบว่า สารต้านอนุมูลอิสระโดยรวมและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดใบพลูด้วยเอทานอลมีปริมาณมากกว่าสารสกัดใบพลูด้วยโพรพิลีนไกลคอล จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay, FRAP assay และ Folin-Ciocalteu เหมาะอย่างยิ่งที่จะนำสารสกัดใบพลูด้วยเอทานอลมีศักยภาพสามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องสำอางประเภทยับยั้งจุลินทรีย์และลดริ้วรอยได้

ข้อเสนอแนะ

ศึกษาต่อไปว่าควรเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดใบพลูเพื่อหาสารต้านอนุมูลอิสระรวมและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมให้ได้ปริมาณมากและควรนำผลการวิจัยครั้งนี้ไปต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆ เช่น ครีมแต้มสิวและครีมลดริ้วรอย ซึ่งควรใช้สารละลายโพรพิลีนไกลคอลในการสกัดซึ่งเหมาะกับผลิตภัณฑ์ประเภทเครื่องสำอาง

References

- Abraham, N. N., Kanthimathi, M. S. & Aziz, A. A. (2012). *Piper betle* linn. shows antioxidant activities, inhibits MCF-7-cell proliferation and increases activities of catalase and superoxide dismutase. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 220–231.
- Ahmad, I. & Beg, A.Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens, *Journal of Ethnopharmacology*, 74, 113–123.
- Akter, K. N., Karmakar, P., Das, A., Anonma, S. N, Shoma, S. A. & Sattar, N. M. (2013). Evaluation of antibacterial and anthelmintic activities with total phenolic contents of *Piper betle* leaves. *Avicenna Journal Phytomedicine*, 4(5), 320–329.
- Ambasta, S. P. (1986). *The Useful Plants of India*. New Delhi: Publications and Information Directorate, CSIR.
- Baliga, M. S., Fazal, F., Priya, M. R., Ratnu, V. S. & Rai, M. P. (2012). Betel leaf (*Piper betel* linn.): The wrongly maligned medicinal and recreational plant possesses potent gastrointestinal and hepatoprotective effects. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease*, 43, 653–684.
- Chanudom, L., Bhoopong, P., Khwanchuea, R. & Tangpong, J. (2014). Antioxidant and antimicrobial activities of aqueous & ethanol crude extracts of 13 Thai traditional plants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(1), 549–558. (in Thai)
- Dasgupta, N. & De, B. (2004). Antioxidant activity of *Piper betle* Linn. leaf extraction vitro. *Food Chemistry Journal*, 88, 219–224.
- Dilokkunanant, U., Kongkathip, N., Suk-atta, U., Buabarn, S., Narkkong, N. & Kladpan, S. (2000). *Inhibition effect of betle extracts on growth of some fungi*. Proceedings of 38st Kasetsart University Annual Conference: Science, Fishing and Science, Bangkok, 38, 515–522. (in Thai)
- Dwivedi, V. & Tripathi, S. (2014). Review study on potential activity of *Piper betle*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(4), 93–98.
- Ghosh, R., Darin, K., Nath, P. & Panchali, P. (2014). An overview of various piper species for their biological activities. *International Journal of Pharma Research & Review*, 3(1), 67–75.

- Girish, H.V. & Satish, S. (2008). Antibacterial activity of important medicinal plants on human pathogenic bacteria- a comparative analysis. *World Applied Science Journal*, 5, 267–271.
- Guillot, J. P., et al. (1982). *Food Chem Toxicol*, 20 (5), 573–582.
- Hayriye, C. K. & Melissa, C. N. (2015). Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia Coli*. *Food Bioscience Journal*, 2, 8–16.
- Inoue, Y., Shiraishi, A., Hada, T., Hirose, K., Hamashima, H. & Shimada, J. (2004). The antibacterial effects of terpene alcohols on *S.aureus* and their mode of actions. *FEMS Microbiology Letter*, 237, 325–331.
- Jinagun, N. (2012). *Manual microbial contamination pharmaceutical products and cosmetics*. Bangkok: Department of microbiology faculty of pharmacy mahidol university. (in Thai)
- Johnson, A. W. (1999). *Invitation to organic chemistry*: Bartlett Press.
- Khamdang, S., Kanchanapoo, J., Meungchan, N., Sittikanka, S., Lhaolaem, A. & Wilamat, W. et al., (2010). Antimicrobial activity of *Piper betle* ethanolic leaf extract on *Enterococcus faecalis* biofilm. *Northest Pharmaceutical Journal*, 6, 84–91. (in Thai)
- Kriengsak, T., Unaroj, B. & Kevin, C. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669–675. (in Thai)
- Lawrite, J.W. (1982). *Glycerol and Glycols*. New York : n.p.
- Lelapornpichit, P. (2001). *Cleaning cosmetics*. (2nded.) Bangkok: O. S. printing house. (in Thai)
- Maisuthisakul, P. (2008). Phenolic antioxidants from betel leaf (*Piper betle* linn.) extract obtained with different solvents and extraction time. *Journal of the Thai Chamber of Commerce*, 28, 52–64. (in Thai)
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S. & Kreig, N.R. (1993). *Microbiology*. New Delhi, India :Tata Mc Grow–Hill Press.
- Pojananukit, N. & Kajomcheappunngam, S. (2010). *Antimicrobial activity test of herbal plants extractant on acne-inducing a plants extractant on acne-inducing bacteria*. Proceeding of the 8st Annual Conference in Engineering. Prince of Songkla University, Songkla. (in Thai)

- Roberta, R., Nicoletta, P. & Anna, P. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237.
- Ronald, L.P., Xianli, W. & Karen, S. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290–4302.
- Rugthaworn, P., Dilokkunanant, U. & Sukatta, U. (2010). Antibacterial and antifungal activities of the essential oil and crude extract of *Piper betle* linn. against anti microorganism contaminate contaminated in public toilets. *Journal of Bureau of Althernative Medicine*, 3 (2), 22–32. (in Thai)
- Saenthaweesuk, S., Jongtamklang, J., Somchan, T. & Thobunluepop, P. (2012). Total phenolics content, antioxidant and antimicrobial activities of some herbs, *Khon Kaen Agriculture Journal*, 2 (suppl.), 480–483. (in Thai)
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simonic, M. & Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191–198.
- Spigno, G., Tramelli, L. & Faveri, D.M. (2007). Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81, 200–208.
- Stalikas, C. D., (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30, 3268–3295.
- Sukatta, U., Dilokkunanant, U., Charoenkul, N., Rugthaworn, P. & Siriwan, S. (2004). *Antimicrobial activity of betle crude extract and betel oil on some microbes causing skin disease*. Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference: Science, Natural Resources and Environmental Economics, Bangkok, 299–303. (in Thai)
- Swangarrum, V. & Junlak, P., (2011). The comparison of extracted herbs to Inhibit bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Pace science*, 12(2), 47–57. (in Thai)
- Sundang, M., Nasir, S. N. S., Slpaut, C. S. & Othman, H. (2012). Antioxidant activity, phenolic, flavonoid and tannin content of *Piper betle* and *Leukosyke capitella*. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 8, 1–16.

- Tamuly, C., Hazarika, M. & Bora, J. Bordoloi, M., Boruah, M.P. & Gajurel, P.R. (2015). In vitro study on antioxidant activity and phenolic content of three *Piper* species from North East India. *Journal Food Science Technology*, 52(1), 117–128.
- Tangpong K., Bhoopong, P., Khwanchuea, R. & Chanudom, L. (2014). Antioxidant and antimicrobial activities of aqueous & ethanol crude extracts of 13 Thai traditional plants. *International journal current microbiology and applied sciences* 3(1), 549-558.
- Thai Industrial Standard Institute. (2012). *Thai Industrial Standard for Cosmetics General Requirement*, TIS. 152. (in Thai)
- Varunkumar, V. S, Mali, G. N., Joseph, S. & Varghese, N.O. (2014). Evaluation of the anticariogenic effect of crude extract of *Piper betle* by assessing its action on salivary pH – an in vitro study. *Journal of Dental and Medical Sciences*, 13(8), 43–48.
- Windell, L. R., Demetrio, L., Valle, Jr., Jeannie, I.A., Juliana, J.M.P. & Esperanza, C.C. (2015). Antibacterial activities of ethanol extracts of Philippine medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. *Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine*, 5(7), 532–540.

คณะผู้เขียน

ทิฐิมา ภาคภูมิ

อาจารย์ประจำหลักสูตรวิชาชีพประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
e-mail: thi29th@hotmail.com

กัลยาภรณ์ จันตรี

อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรเครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
e-mail: kung9161@hotmail.com

อรพิน โคมุติบาล

อาจารย์ประจำหลักสูตรเทคโนโลยีเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
e-mail: orapinkom@gmail.com