การใช้สารสกัดพลูเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสมุนไพรบางชนิด

Utilization of Betel Pepper Extract to Inhibit Microorganisms in Some Herbal Cosmetic Products

อาทิตยา วงค์ตระกูลแก้ว (Ahittaya Wongtrakulkeao)* ดร.สมจิตร อยู่เป็นสุข (Dr.Somchit Youpensuk)**

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากใบพลูในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสมุนไพร จากการตรวจสอบจุลินทรีย์ในเครื่องสำอางสมุนไพรพบเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* spp. และเชื้อราที่พบได้แก่ *Aspergillus* sp. และ *Candida* sp. เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพลูในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสมุนไพร และทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Trichophyton* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง และ *Candida albicans* ซึ่งเป็น normal flora ที่มีโอกาสทำให้เกิดการอักเสบที่ผิวหนัง ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichophyton* sp. และ *Aspergillu*s sp. ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.3% ยับยั้งแบคทีเรีย และ *Candida* spp.ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.5% ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าอาจนำสารสกัดพลูไปใช้ผสมเป็นสารกันเสียในเครื่องสำอางสมุนไพรบางชนิดได้

ABSTRACT

The aim of this research was to study the effect of Betel pepper extract in inhibition of microorganisms contaminated in herbal cosmetic products. Bacteria found in the herbal cosmetic products were *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* spp. Fungi found in the herbal extract were *Aspergillus* sp. and *Candida* sp. The efficacy of Betel pepper extract was investigated on inhibition of the contaminated microorganisms, *Trichophyton* sp. which is dermatophytic fungus and *Candida albicans* which is normal flora. The results showed that the herbal extract could inhibit *Trichophyton* sp. and *Aspergillu*s sp. at the concentration of 0.3%, inhibited bacteria and *Candida* spp. at the concentration of 0.5%. The results of this research indicated that Betel pepper extract may be used as preservative in some herbal cosmetic products.

คำสำคัญ: พลู เครื่องสำอาง สมุนไพร

Key Words: Betel pepper, Cosmetic, Herb

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*

*** รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*

บทนำ

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้รับความสนใจ แต่ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบางชนิดมีความชื้นสูงและมีส่วนผสมที่จุลินทรีย์สามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ จึงมักจะเกิดความเสียหายจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้เกิดการเสียหายของผลิตภัณฑ์ จุลินทรีย์ที่มักพบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น *Aspergillus niger* (Roden, 2010) บางครั้งอาจมีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการอักเสบที่ผิวหนัง เช่น *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ซึ่งเป็น normal flora ในมนุษย์ที่มีโอกาสเกิดอาการอักเสบที่ผิวหนังได้ หรืออาจจะมีโอกาสปนเปื้อนเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคกลาก เช่น *Epidermophyton* sp., *Microsporum* sp. และ *Trichophyton* sp. ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะใช้สารสกัดจากใบพลู (Piper betel Linn.) ซึ่งเป็นพืชที่สามารถพบได้ทั่วไปในท้องถิ่นและมีสรรพคุณในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เป็นแนวทางในการนำมาใช้เพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของพืชสมุนไพรในท้องถิ่นได้อีกทางหนึ่งด้วย

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากใบพลูในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสมุนไพร และจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด

วิธีการวิจัย

1. แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสมุนไพร

1.1 ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสมุนไพรที่นำมาใช้ทดสอบ 2 ชนิด ได้แก่ ครีมนวดหน้า และครีมขัดผิว ชนิดละ 10 ตัวอย่าง จากผู้ประกอบการ 1 ราย นำมาแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ปรากฏให้เห็นการปนเปื้อนชัดเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสมุนไพร โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อแยกเส้นใยของเชื้อรา ไปเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) แยกเชื้อราจนได้เชื้อบริสุทธิ์ ตรวจสอบเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Compound microscope) และเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Barnett and Hunter, 1998) และเก็บเชื้อราที่แยกได้ไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

1.2 ตรวจสอบจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ไม่ปรากฏเห็นการปนเปื้อนอย่างชัดเจน โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างจากผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในภาชนะบรรจุ 3 จุด โดยเก็บตัวอย่างจุดละ 1 กรัม นำมาใส่ในสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางที่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} แล้วดูดสารแขวนลอยของแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เพื่อตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย และเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อราและยีสต์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อราบ่มเป็นเวลา 14 วัน คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน เก็บเป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ที่มีการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ตรวจสอบชนิดของแบคทีเรีย จากรูปร่างเซลล์ การเรียงตัวของเซลล์ การติดสีแบบกรัม และคุณสมบัติทางชีวเคมี (Holt *et al*, 1994) สำหรับเชื้อยีสต์นำไปตรวจสอบลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Corn meal – Tween 80 agar ที่อุณหภูมิ 25°C และตรวจสอบรูปร่างของเซลล์ และการสร้าง pseudohyphae ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Allas and Parks, 1993; Forbes *et al*, 2002)

2. การเตรียมสารสกัดพลู

ใบพลูที่ใช้ในการศึกษาได้จาก ต. เวียง อ. ฝาง จ. เชียงใหม่ เตรียมสารสกัดพลูโดยการนำใบพลูล้างน้ำให้สะอาดหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และนำไปอบด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นปั่นพลูให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น แล้วเก็บในถุงพลาสติกเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลองต่อไป การทำสารสกัดพลูโดยชั่ง

ผงพลู 100 กรัม ผสมน้ำกลั่น ปริมาตร 500 มิลลิลิตร หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นคั้นผงพลูและกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำสารสกัดที่ได้มาระเหยน้ำด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45°C และเก็บเนื้อสารสกัดไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C

3. การทดสอบสารสกัดพลูในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่แยกได้จากเครื่องสำอางสมุนไพร

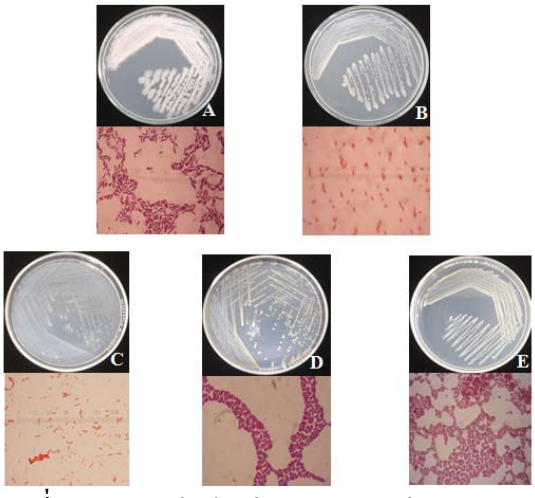
3.1 ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ที่ปนเปื้อนในเครื่องสำอางสมุนไพร และทดสอบกับ *C. albicans* ที่เป็น normal flora ซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่สามารถทำให้เกิดการอักเสบของผิวหนัง ตรวจสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion (Subashkumar *et al*, 2013)โดยใช้สารสกัดพลูที่ความเข้มข้น 0% (น้ำกลั่นที่ไม่ผสมสารสกัดพลู), 0.25%, 0.5% และ 0.75% ส่วน positive control ใช้ streptomycin 0.03% วิธีการทดสอบโดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB) ส่วน *Candida* spp. นำไปเลี้ยงใน Sabouraud dextrose broth (SDB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และ *Candida* sp. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ไม้ที่พันด้วยสาลีจุ่มลงในหลอดเพาะเลี้ยงเชื้อเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารโดยเชื้อแบคทีเรียจะเกลี่ยบน Mueller Hinton Agar (MHA) ดูดสารสกัดพลูแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงบน paper disc (Macherey-Nagel, Germany) ที่ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้ววาง paper disc บนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และ *Candida* sp. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (inhibition zone)

3.2 ทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี poisoned food technique (Thongruk and Youpensuk, 2009)โดยนำสารสกัดพลูมาผสมในอาหาร PDA สำหรับเชื้อราที่ปนเปื้อนในเครื่องสำอางสมุนไพร และทดสอบกับ *Trichophyton* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง โดยใช้อาหาร SDA โดยผสมสารสกัดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% และ 0.5%, บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน

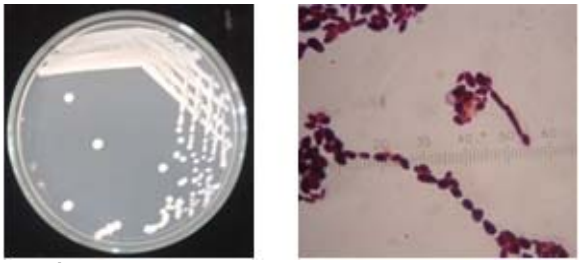
ผลการวิจัย

1. ผลการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากเครื่องสำอางสมุนไพร

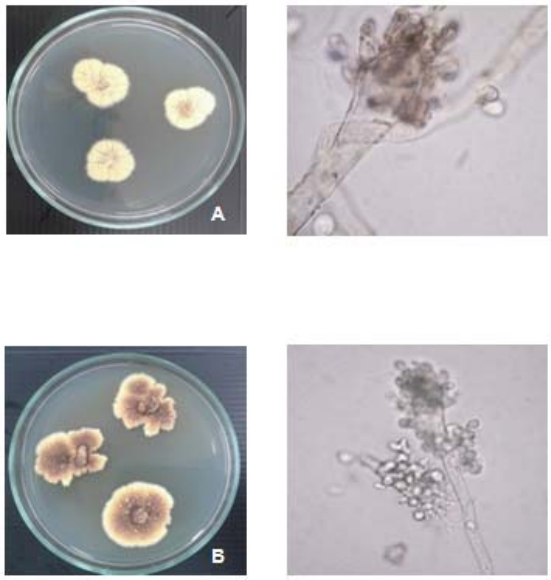
เมื่อนำมาแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเครื่องสำอางสมุนไพรทั้ง 2 ประเภท ได้แก่ ครีมนวดหน้า และครีมขัดผิว ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียได้แก่ (A) *Bacillus* spp. (4 species), (B) *Escherichia coli*, (C) *Pseudomonas* sp., (D) *Staphylococcus aureus,* และ (E) *Micrococcus luteus* (ภาพที่ 1) สำหรับเชื้อราพบ *Candida* 1 species (ภาพที่ 2) และ *Aspergillus* 2 species (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีและการติดสีแกรมของแบคทีเรียที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสมุนไพร



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีและลักษณะของ *Candida* sp. ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสมุนไพร



ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีและลักษณะของเชื้อรา *Aspergillus* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสมุนไพร

2. **ผลของสารสกัดพลูในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar disc diffusion**

จากการทดสอบผลของสารสกัดพลูในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่าสารสกัดพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*, *Pseudomonas* sp., *E. coli*, *Candida* sp., *M. luteus* และ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% ส่วนเชื้อ *Bacillus* spp. สารสกัดพลูยับยั้งได้น้อยมาก (ตารางที่ 1)

3. ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ด้วยวิธี Poisoned food technique

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพลูที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Trichophyton* sp. และ *Aspergillus* spp. พบว่าที่ค่าความเข้มข้น 0.3% ขึ้นไปสามารถยับยั้งได้สมบูรณ์ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar disc diffusion

จุลินทรีย์	**เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อ (mm) ± SD**				
	ความเข้มข้นของสารสกัดพลู				
	0%	**0.25%**	**0.5%**	**0.75%**	**Streptomycin**
E. coli	0	10.00 ± 0	15.33 ± 0	17.67 ± 0.58	12.67 ± 0.58
M. luteus	0	12.00 ± 0	18.67 ± 1.53	19.67 ± 0.58	0
S. aureus	0	13.00 ± 0.53	22.67± 1.73	23.27 ± 0	17.33 ± 0.58
Pseudomonas sp.	0	14.67 ± 0.58	22.33 ± 1.53	23.33 ±1.53	0
Bacillus sp.	0	7.33 ± 0.58	8.00 ± 0	9.33 ± 0.58	11.67 ± 1.53
Candida albicans	0	8.00 ± 0	9.33 ± 1.15	11.33 ± 1.15	0
Candida sp.	0	7.33 ± 0.58	9.00 ± 1.00	10.33 ± 0.53	0

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดพลูในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

ความเข้มข้นของสารสกัดพลู (%)	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (mm) ± SD	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
0.0	73.75 ± 1.50	
0.1	71.25 ± 1.79	3.39
0.2	57.50 ± 1.45	22.03
0.3	0	100
0.4	0	100
0.5	0	100

อภิปรายผลการวิจัย

ผลจากการวิจัยพบแบคทีเรียและเชื้อราปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสมุนไพรชนิดขัดผิวและนวดหน้า ซึ่งอาจปนเปื้อนมาจากสมุนไพรที่ใช้เป็นวัตถุดิบในส่วนผสมของเครื่องสำอาง เช่น การศึกษานี้ตรวจพบเชื้อ *Aspergillus* ปนเปื้อนอย่างเห็นได้ชัดเจน จากผลิตภัณฑ์ที่ผลิตใหม่และยังไม่ได้เปิดใช้ ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนจากสมุนไพรที่นำมาเป็นวัตถุดิบ หรืออาจปนเปื้อนมาจากกระบวนการผลิต เนื่องจากสถานที่หรืออาคารผลิตยังไม่ได้มาตรฐาน ผลิตภัณฑ์มีความชื้นสูง ทำให้ง่ายต่อการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา ระบบการขนส่งสมุนไพรไม่รัดกุมซึ่งอาจจะทำให้มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ระหว่างการขนย้ายสมุนไพร (อิศรา และคณะ, 2556) นอกจากนี้ยังมีโอกาสปนเปื้อนมาจากบุคลากรผู้ปฏิบัติงาน สุขลักษณะของทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค เช่น การใช้มือสัมผัสกับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสมุนไพรระหว่างการเปิดใช้ ซึ่งอาจมีการปนเปื้อน *E. coli* ถ้าหากมีสุขลักษณะที่ไม่เหมาะสม สำหรับ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบอยู่ตามทางเดินหายใจ ลำคอ เส้นผม และผิวหนัง *Pseudomonas* sp. เป็นจุลินทรีย์ทั่วไปอาจทำให้เกิดการอักเสบที่ผิวหนัง และ *M. luteus* เป็นจุลินทรีย์ที่พบทั่วไปตามผิวหนัง

จากการศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดพลูในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางพบว่าที่ความเข้มข้น 0.5% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด แต่สารสกัดพลูยับยั้งเชื้อ *Bacillus* spp. ได้น้อยมาก ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถสร้าง endospore ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม สามารถงอกและเจริญเป็นเซลล์แบคทีเรียใหม่ได้ จึงทำให้ฤทธิ์ของสารสกัดพลูไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ ผลจากการศึกษาวิจัยสารสกัดพลูที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางแสดงให้เห็นว่า สารสกัดพลูมีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาใช้ชนิดขัดผิวได้ ดังนั้นผู้วิจัยจะทำการศึกษาในการนำไปใช้เป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสมุนไพรต่อไป

สรุปผลการวิจัย

จากผลการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์จากผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสมุนไพรชนิด ครีมนวดหน้า และครีมขัดผิว พบการปนเปื้อนแบคทีเรีย เชื้อรา และ ยีสต์ ผลการตรวจสอบสารสกัดพลูพบว่า สารสกัดพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สมบูรณ์ ที่ความเท่ากับ 0.5% ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าอาจนำสารสกัดพลูไปใช้ผสมเป็นสารกันเสียในเครื่องสำอางสมุนไพรบางชนิดได้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจาก สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

อิศรา นานาวิชิต, พลแก้ว วัชราชัยสุรพล, อัญชญา ดุจจานุทัศน์, สุนีย์ จันทร์สกาว, ปราโมทย์ ทิพย์ดวงตา, พาณี ศิริสะอาด, กันยารัตน์ ชลสิทธิ์, พัชรินทร์ จันรา นิมิตร. 2556. คู่มือการแปรรูปวัตถุดิบสมุนไพร ภายใต้โครงการ Lanna Health Hub 2013. สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเชียงใหม่. หน้า 34-37.

Allas, R.M and Parks, L.C. 1993. Handbook of Microbiological Media. CRC Press. London.

Barnett, H.L and Hunter, B.B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi 4 th ed. APS Press. Minnesota.

Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfed, A.s. 2002. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology 11 th ed. Mosby, An Imprint of Elsevier Science. Toronto.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. The William & Wilkin's Company. Baltimore.

Roden. K. 2010. Preservatives in personal care products. Microbiology Australia, 11: 195-197.

Subashkumar, R., Subashkumar, M., Babu. S., Thayumanavan. 2013. T. Antibacterial effect of crude aqueous of *Piper betle* L. against pathogenic bacteria. International Journal of Research in pharmaceutical and Biomedical Sciences, 4: 42-46.

Thongruk, W. and Youpensuk, S. 2009. Effects of some herbal extracts on Colletotrichum gloeosporioides. The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology,24-25.