

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการย่อย: การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และการควบคุมทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์จากกระเบา
Study of antimicrobial activity and microbiological control of krabaoproducts

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ความสำเร็จในโครงการวิจัย การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และการควบคุมทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์จากกระเบา เริ่มมาจากการได้รับทุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ

2557-8 ซึ่งช่วยขยายขอบเขตฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์ของไม้เศรษฐกิจแล้ว ยังเป็นการสนับสนุนโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชของประเทศไทยอีกทางหนึ่ง คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ในการจัดทุนด้วยเล็งเห็นประโยชน์ในครั้งนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการวิจัย ตลอดจนความสะดวกต่าง ๆ จนเสร็จสิ้นการวิจัย

ขอขอบคุณนางสาวภาวินี มะณี นักศึกษาปริญญาโทเภสัชศาสตร์ชีวภาพ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ นางสาวจุฑารัตน์ โพธิ์ทองเจริญ นักวิทยาศาสตร์ในการวิจัยด้านจุลชีววิทยา นักศึกษาปริญญาโทหลายท่าน ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ไม่ได้เอ่ยนาม ที่ให้การช่วยเหลือในการทดสอบอย่างเต็มที่ อันทำให้การวิจัยสามารถสำเร็จลงด้วยดี

ที่สำคัญอย่างยิ่ง คณะผู้วิจัยรู้สึกถึงความสำคัญอย่างยิ่งจากการสนับสนุนทุกประการจากครอบครัวของเรา ซึ่งถ้าปราศจากน้ำใจเหล่านี้ ย่อมเป็นการยากยิ่งที่การวิจัยจะลุล่วงไปได้ จึงขอขอบคุณทุกท่าน ณ โอกาสนี้

รองศาสตราจารย์ แมนสรวง วุฒิอุดมเลิศ
ศาสตราจารย์ ดร. สมพร ศรีเฟื่องฟู

Acknowledgement

The success of this research project on Study of Antimicrobial Activity and Microbiological Control of Krabao Products was initiated by a grant from the Office of National Research Committee of Thailand (NRCT) through the annual budget 2014-2015. We would like to convey our gratitude to the Committee for the grant and future benefits foresight.

We are indebted to Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy and Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University for the permission and provision to access their utilities and instruments to conduct the research as well as all conveniences provided to complete the research.

We are obliged to Miss PavineeManee, student of Master of Science Program in Biopharmaceutical Sciences, Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Miss JutharatPothongcharoen, microbiological research scientist and a number of master-degree students as well as all involved staff of the Department for their willingly helpful efforts that made the research favorably successful

Our special thanks go to our families who supported us unconditionally. Without their kindness, it could be a difficult task to nicely complete the project. And to all who are helpful to this research project which might not be mentioned personally, the researchers would like to thank you very much.

Associate Professor MansuangWuthi-udomlert
Professor Dr. SompornSrifuengfung

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และการควบคุมคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์จากกระเบา (*Hydnocarpus anthelmintica* Pierre ex Laness.) สืบเนื่องมาจากประวัติการใช้ในโรคติดเชื้อที่รักษาได้ยาก จึงเป็นที่น่าสนใจในการขยายการตรวจสอบฤทธิ์ของน้ำมันกระเบาในการต้านแบคทีเรียและราชนิดอื่น เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปใช้ด้านคลินิก และผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ก่อให้เกิดมูลค่าเพิ่ม

การวิจัยจึงนำน้ำมันกระเบาชนิดบีบเย็นจากสิ่งจังหวัด คือ ลำปาง ขอนแก่น อำนาจเจริญ และอุรุษยา มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่คัดเลือก ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 1291, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33499, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 และ *P. acnes* P 6 รวมถึงรา *Candida albicans* ATCC 10231 และ ATCC 71023, *Microsporum gypseum* และ *Trichophyton mentagrophytes* DMST 19735

ผลิตภัณฑ์น้ำมันกระเบาได้แก่ สบู่ก้อนและตำรับครีมบำรุงผิว ได้นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อที่สัมพันธ์กับการก่อสิว โดยทดสอบฤทธิ์ต่อ *S. epidermidis* ATCC 14990, *P. acnes* ATCC 6919 และ *P. acnes* P 6 การทดสอบทั้งหมดใช้หลักการตาม CLSI documents ในการตรวจหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

ในการควบคุมทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์จากกระเบา ได้ทำการตรวจวัดจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์ ตามวิธีใน Microbiological Examination of Nonsterile Products ของ The United States of Pharmacopoeia 38 (2015) Chapter 61: Microbial Enumeration Tests และ Chapter 62: Tests for Specified Microorganisms

การวิจัยแสดงถึงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทุกชนิดของน้ำมันกระเบาทั้งสี่แหล่ง ไม่มีความแตกต่างต่างกันมาก โดยค่า MBC ส่วนใหญ่เป็น $\geq 36 \mu\text{L/ml}$ ยกเว้นน้ำมันกระเบาอำนาจเจริญที่มีค่า MBC ที่ $\leq 36 \mu\text{L/ml}$ ต่อ *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. acnes* ATCC 6919 และค่า MFC จากน้ำมันกระเบาอำนาจเจริญและน้ำมันกระเบาอุรุษยา อยู่ที่ ≤ 18 ต่อ *C. albicans* ทั้งสองสายพันธุ์, *M. gypseum* และ *T. mentagrophytes* เมื่อนำน้ำมันกระเบาอำนาจเจริญมาใช้ในผลิตภัณฑ์สบู่ก้อน พบว่าสบู่ก้อนสูตร 14/1 ให้ค่า MBC ระหว่าง 0.05 ถึง 0.10 mg/ml ต่อ *B. cerues*, *S. aureus* และ *P. acnes* ในขณะที่ตำรับครีมทาผิวจากน้ำมันลำปางแสดงถึงการออกฤทธิ์ต่อ *P. acnes* และ *S. epidermidis* ที่ MBC 125 ถึง 500 mg/ml สำหรับคุณภาพทางจุลชีววิทยาของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ทุกตัวอย่าง ผ่านตามเกณฑ์กำหนดทุกหัวข้อที่ระบุไว้ในเกณฑ์ข้างต้น

ผลที่ได้จากการวิจัย แสดงถึงศักยภาพของกระเบา ที่เหมาะต่อการนำมาทำผลิตภัณฑ์/เครื่องสำอางที่ต้องการฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่พบตามผิวหนังและที่ก่อให้เกิดสิว รวมถึงคุณสมบัติที่เป็นน้ำมันจะช่วยบำรุงผิวในเวลาเดียวกัน ทำให้เห็นคุณค่าของพรรณไม้เมืองไทยที่ควรค่าแก่การอนุรักษ์ไว้เพื่อประโยชน์สืบไป

ABSTRACT

The study of antimicrobial properties and microbiological control of *Hydnocarpusanthelmintica* Pierre ex Laness. (Krabao) products was originated from the history of Krabao in the treatment of incurable infectious diseases. It is of interest to investigate Krabao's on other causative infectious agents including bacteria and fungi. These further data will be useful in clinical basics and being profound as added value to several products.

The research was based on samples of cold press Krabao oil obtained from four provinces in Thailand: Khonkan, Lampang, Amnatcharoen and Ayuthaya and were tested for the antimicrobial activity against *Bacillus cereus* ATCC 1291, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33499, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Propionibacterium acnes* ATCC 6919, *P. acnes* P 6, *Candida albicans* ATCC 10231 and ATCC 71023, *Microsporum gypseum* and *Trichophyton mentagrophytes* DMST 19735.

Each of the two formulations of Krabao soap and skin cream was tested against *S. epidermidis* ATCC 14990, *P. acnes* ATCC 6919 and *P. acnes* P6 according to principles required in corresponding to CLSI documents. Therefore, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) values were obtained.

As for the microbiological control of Krabao products, raw materials and finished products were investigated using the methods suggested in Microbiological Examination of Nonsterile Products of The United States of Pharmacopoeia 38 (2015) Chapter 61: Microbial Enumeration Tests and Chapter 62: Tests for Specified Microorganisms.

The research exhibited the similar antimicrobial activity of four Krabao oil samples from the four sources. Most of the MBCs against *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* and two *P. acnes* were at ≥ 36 μ l/ml except the lot 1 of Krabao oil from Amnatcharoen and Ayuthaya which presented MBC and MFC values at ≤ 36 μ l/ml. The products, Krabao soap of 14/1 formulation demonstrated MBC values between 0.05 to 0.10 mg/ml on *B. cereus*, *S. aureus* *P. acnes*, skin cream formulated from Lampang inhibited *P. acnes* and *S. epidermidis* at MBC 125 to 500 mg/ml. All raw materials and products passed the microbiological regulations.

The results of this study indicated the potential of *H. anthelmintica* Pierre ex Laness. appropriate to be employed as natural sources for antimicrobial products and toiletries against skin and acnes microbes, including the benefit of moisturizing property of oil for skincare

products. The consequence also contributes to the conservation of plant forestry in Thailand as another advantageous consideration.

คำสำคัญ (Key words): กระจับปี่ ครีมทาผิวสมุนไพรเครื่องสำอาง น้ำมันกระจับปี่ ผลิตภัณฑ์กระจับปี่โรคเรื้อน
 สบู่ก้อนผิว

acnes, antifungal, antimicrobial, chaulmoogra oil, CLSI, *Hydnocarpus anthelminthica* Pierre.
 ex Laness., hydnocarpus oil, medicinal plant

สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ	ii
Acknowledgement	iii
บทคัดย่อ	iv
Abstract	v
คำสำคัญ	vi
สารบัญเรื่อง	vi
สารบัญตาราง	vii
สารบัญภาพ	viii
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	viii
บทนำและการทบทวนวรรณกรรม	1
ระเบียบวิธีการวิจัย	
ผลการวิจัย	
อภิปรายและวิจารณ์ผล	34
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	40
บรรณานุกรม	
ภาคผนวก	

สารบัญตาราง

- ตารางที่ 1 โครงสร้างของสารจากกระเบาที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคแสดงค่าเป็น MIC
- ตารางที่ 2 ค่า MBCs ของ DMSO ต่อการเจริญของเชื้อทดสอบ
- ตารางที่ 3 ค่า MBCs ของ Tween80 ต่อการเจริญของเชื้อทดสอบ
- ตารางที่ 4 อัตราส่วนของส่วนประกอบใน emulsion
- ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของน้ำมันกระเบาผสม DMSO
- ตารางที่ 6 ส่วนประกอบในสูตรน้ำมันกระเบาลำปางผสม DMSO ครั้งที่ 2
- ตารางที่ 7 ฤทธิ์ bactericidal ของน้ำมันปริมาณต่างๆต่อเชื้อทดสอบ
- ตารางที่ 8 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจาก stock strain ของน้ำมันกระเบา
- ตารางที่ 9 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมาตรฐานของน้ำมันกระเบาลำปาง
- ตารางที่ 10 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันกระเบาจากขอนแก่นและลำปาง
- ตารางที่ 11 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันกระเบาจากอำนาจเจริญและอุทัย Lot 1
- ตารางที่ 12 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันกระเบาจากอำนาจเจริญและอุทัย Lot 2
- ตารางที่ 13 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสปู่ก้อนจากน้ำมันกระเบา
- ตารางที่ 14 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารที่ใช้ในการตั้งตำรับ
- ตารางที่ 15 ฤทธิ์ของครีมตำรับและครีมพื้นในการต้านเชื้อที่สัมพันธ์กับการก่อสิว
- ตารางที่ 16 คุณภาพด้านจุลชีววิทยาของน้ำมันกระเบาจากสี่จังหวัด
- ตารางที่ 17 คุณภาพด้านจุลชีววิทยาของสปู่ก้อนและครีมบำรุงผิว

สารบัญภาพ

รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมัน

รูปที่ 2 โครงสร้างสาร 5 ชนิดจาก *Hydnocarpus anthelminthica* Pierre ex Laness

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

°	องศาเซลเซียส
μg	ไมโครกรัม
μl	ไมโครลิตร
ATCC	ATCC American Type Culture Collection
BHI	BHI Brain Heart Infusion
CAMHB	cation-adjusted Mueller-Hinton broth
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cfu/CFU	colony forming unit
DMSO	dimethyl sulfoxide
FDA	US Food and Drug Administration
g	กรัม
kg	กิโลกรัม
m ³	ลูกบาศก์เมตร
MBC	minimal bactericidal concentration
mg	มิลลิกรัม
MHA	Mueller-Hinton agar
MHB	Mueller-Hinton broth
MIC	minimal inhibitory concentration
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
NFC	minimal fungicidal concentration
TAMC	Total aerobic microbial count
TSA	tryptic soy agar
TYMC	Total combined yeasts and molds count

สารบัญ

บทนำ

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	1
สารสำคัญจากกระเบา	9
ศักยภาพของสารสำคัญจากกระเบา	10

ประโยชน์ด้านอื่นจากฤทธิ์ของกระเบา	14
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	
การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและราของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์	16
การตรวจสอบคุณภาพด้านจุลชีววิทยาของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป	16
การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและราของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์	16
วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย	19
วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านรา	20
คุณภาพด้านจุลชีววิทยาของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป	
Microbial enumeration tests: Plate Method	22
Tests for Specified microorganisms	23
ผลการวิจัย	
การทดสอบฤทธิ์ของ emulsifier ต่อการเจริญของเชื้อทดสอบ	25
ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันกระเบาจากลำปาง	26
การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันกระเบา	
จากลำปางในอัตราส่วนต่างๆ	27
ฤทธิ์ของน้ำมันกระเบาในการต้านแบคทีเรียจาก stock strain	
และ ATCC strain	27
ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันกระเบาจากขอนแก่นและลำปาง	28
ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันกระเบาจากอำนาจเจริญและอยุธยา (Lot 1)	30
ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันกระเบาจากอำนาจเจริญและอยุธยา (Lot 2)	31
ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์จากน้ำมันกระเบา	32
อภิปรายและวิจารณ์ผล	34
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	40
บรรณานุกรม	
ภาคผนวก	