บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างพืชสมุนไพร

พืชสมุนไพรที่ใช้ในการทดลองมีจำนวน 21 ชนิด (ตาราง 1)

ตาราง 1 พืชสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดพืชสมุนไพร	ส่วนที่ใช้ทดลอง
ซื้อจากลำปางรักษ์สมุนไพร อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง	
กานพลู (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry)	ดอก
ขอบชะนาง (*Pouzolzia pentandra* Benn.)	ใบ
ชุมเห็ดเทศ (*Senna alata* (L.) Roxb.)	ใบ
มะกา (*Bridelia ovata* Decne.)	ใบ
ย่านางแดง (*Bauhinia strychnifolia* Craib)	ใบ
เสลดพังพอน (*Clinacanthus nutans* (Burm.f) Lindau.)	ใบและลำต้น
อบเชยไทย (*Cinnamomum bejolghota* (Buch.-Ham.) Sweet.)	เปลือก
ซื้อจากตลาดเมืองใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่	
พลูคาว (*Houttuynia cordata* Thunb.)	ใบและยอดอ่อน
ซื้อจากไร่ยาสูบ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่	
ยาเส้นแห้ง (*Nicotiana tabacum* L.)	ใบและลำต้น
ยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.)	ใบ
สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.)	ใบ
เก็บตัวอย่างจากอุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย	
สาบหมา (*Eupatorium adenophora* (*Spreng.*) R.M.King & H.Rob.)	ใบและยอดอ่อน
เก็บตัวอย่างจากบริเวณมหาวิทยาลัยเชียงใหม่	
ชงโค (*Bauhinia purpurea* Linn.)	ใบ

ตาราง 1 พืชสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

ชนิดพืชสมุนไพร	ส่วนที่ใช้ทดลอง
ว่านหางจระเข้ (*Aloe vera* Linn.)	วุ้น
ฝิ่นต้น (*Jatropha multifida* Linn.)	ยาง
พะยอม (*Shorea roxburghii* G. Don)	ดอก
พญาสัตบรรณ (*Alstonia scholaris* (L.) R. Br.)	เปลือก, ยาง
ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.)	ใบ
สาบเสือ (*Eupatorium odoratum* Linn.)	ใบและยอดอ่อน
เสี้ยวดอกขาว (*Bauhinia variegata* L.)	ใบ
หนุมานนั่งแท่น (*Jatropha podagrica* Hook.f.)	ยาง

2. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้รับความอนุเคราะห์จาก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

2.2 *Staphylococcus aureus*

2.3 methicillin - resistant *S. aureus* (MRSA)

2.4 *Staphylococcus epidermidis*

2.5 *Streptococcus pyogenes*

ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่

2.6 *Escherichia coli* 0157: H7

2.7 *Propionibacterium acnes* DMST 14916

3. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

3.1 Agar (ยี่ห้อ เฮลลิคอปเตอร์)

3.2 Brain heart broth (BHI) (ยี่ห้อ Merck)

3.3 Mueller - Hinton broth (MHB) (ยี่ห้อ Merck)

4. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง (ภาคผนวก ข)

4.1 สารเคมีทั่วไป

4.1.1 ชุดย้อมสีแกรม

4.1.2 ยาปฏิชีวนะ gentamicin ยี่ห้อ Acme Genta จากบริษัท British Dispensary

4.1.3 เอทานอล 95%

4.1.4 Dimethyl sulfoxide (DMSO)

4.1.5 Glycerol

4.1.6 ครีมเบส และโลชั่นเบส

4.2 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนผสมของครีมพื้นฐาน

4.2.1 Cethyl alcohol

4.2.2 Liquid paraffin

4.2.3 Methyl paraben

4.2.4 Propyl paraben

4.2.5 Sodium lauryl sulfate

4.2.6 Stearyl alcohol

5. วัสดุอุปกรณ์

5.1 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

5.2 กระบอกตวง ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

5.3 กรวยกรอง

5.4 ขวดแก้ว ขนาด 5, 10, 15, 20, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

5.5 จานอาหารเลี้ยงเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร

5.6 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม

5.7 ช้อนตักสาร

5.8 แท่งแก้วคนสาร

5.9 บีกเกอร์ ขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

5.10 ปากคีบ

5.11 ปิเปต ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

5.12 ไม้พันสำลี เบอร์ L ยี่ห้อ HI-VAN

5.13 สไลด์แก้ว

5.14 หลอดทดลองขนาด 10 x 100 และ 16 x 150 มิลลิเมตร

5.15 ห่วงถ่ายเชื้อ

5.16 Magnetic bar และ magnetic stirrer

5.17 Micropipette ขนาด 50-200 และ 200-1,000 ไมโครลิตร

5.18 Paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Macherey-Nagel

5.19 Pipette tip

6. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง (ตาราง 2)

ตาราง 2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือ	รุ่น (Model)	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ	-	Olympus	USA
เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง	BP 3100S	Satorius	Germany
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	20S A SCS	Precisa	UK
ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย	LG2/ER	Tyco Thermal Controls	USA
ตู้ดูดควัน	I-LAB	IiM	-
ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส	SF-C991 NG	Sanyo	-
ตู้ปลอดเชื้อ laminar flow	TL2448	Holten LaminAir	Denmark
Autoclave	SS-325	Tomy	Japan
Centrifuge	Harrier 18/80	Sanyo	UK
Hot air oven	-	Heraeus	USA
Incubator	-	Memmert	Germany
Incubator, 5% CO_2	-	Memmert	Germany
Lyophilizer	-	FTS systems	USA
Magnetic stirrer	Cerastir	Clifton	UK
pH meter	F21	Horiba	Japan
Rotary evaporator	R-124	Buchi	Switzerland
Spectrophotometer	Genesys 20	Thermo spectronic	USA

ตาราง 2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

เครื่องมือ	รุ่น (Model)	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Vortex mixer	Genie 2	Bibby	UK
Water bath	TW12	Julabo	Germany

7. วิธีการวิจัย

7.1 กลั่นน้ำมันหอมระเหยจากใบยูคาลิปตัส

7.1.1 นำใบยูคาลิปตัสสดที่ต้องการกลั่นน้ำมันหอมระเหยมาล้างทำความสะอาดหั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก และนำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

7.1.2 บรรจุใบยูคาลิปตัสสดลงในโถกลั่นประมาณสองในสามส่วน เติมน้ำกลั่นให้ท่วม

7.1.3 ประกอบชุดกลั่น ให้ความร้อนตลอดเวลาในการกลั่นประมาณ 3-5 ชั่วโมง เมื่อน้ำและน้ำมันหอมระเหยขึ้นไปถึงตัวควบแน่น (condenser) จะกลั่นตัวเป็นของเหลว

7.1.4 แยกเอาส่วนน้ำมันหอมระเหยออกจากน้ำ และเก็บน้ำมันหอมระเหยที่ได้ในขวดทึบแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7.2 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

7.2.1 นำสมุนไพรมาล้างด้วยน้ำเปล่าให้สะอาด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 - 72 ชั่วโมง จากนั้นบดให้ละเอียดโดยเครื่องบด

7.2.2 ชั่งสมุนไพรชนิดละ 50 กรัม ใส่ในขวดแก้วที่มีฝาปิด ทำการทดลอง 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อกลุ่มที่ 2 เติม เอทานอล 95% โดยใช้อัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลายเป็น 1: 10

7.2.3 แช่ขวดแก้วที่บรรจุสมุนไพรในกลุ่มแรกใน water bath 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ส่วนกลุ่มที่ 2 นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7.2.4 กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ก่อนทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer แล้วเก็บในโถดูดความชื้น (desiccator)

7.2.5 นำสารที่สกัดได้ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คือ สารสกัดด้วยน้ำให้ละลายกลับด้วยน้ำกลั่น ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลให้ละลายกลับด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) เนื่องจากละลายสารสกัดได้ดีกว่าการใช้เอทานอล ส่วนน้ำมันหอมระเหย วุ้นว่านหางจระเข้และยางไม้ สามารถนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้เลย โดยไม่ต้องมีการสกัดหรือเจือจาง

7.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี agar disc diffusion

7.3.1 เพาะเลี้ยง *E. coli* O157:H7, *Ps. aeruginosa*, *S. aureus*, methicillin – resistant *S. aureus* และ *S. epidermidis* ในอาหาร Mueller Hinton broth (MHB) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยง *St. pyogenes* ในอาหาร MHB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ใน candle jar และเพาะเลี้ยง *P. acnes* DMST 14916 ในอาหาร Brain Heart infusion broth (BHI) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ใน aerobic jar ที่ปราศจากออกซิเจน

7.3.2 เมื่อบ่มแบคทีเรียนาน 16-18 ชั่วโมง (หรือ 48 ชั่วโมง สำหรับ *P. acnes* DMST 14916) เพื่อให้ได้ความขุ่นของแบคทีเรียเทียบเท่า McFarland standard เบอร์ 0.5 ทั้งนี้เพื่อเป็นการควบคุมปริมาณเชื้อให้เท่ากันทุกครั้งที่ทดสอบ

7.3.3 ใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อจุ่มลงในหลอดเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิด ในข้อ 7.3.1 จากนำไปเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) ยกเว้น *P. acnes* DMST 14916 เกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร BHI agar

7.3.4 นำ paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จุ่มลงในสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำมันหอมระเหย วุ้นว่านหางจระเข้และยางไม้ ความเข้มข้น 100% ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปวางบนผิวหน้าอาหาร MHA และ BHI agar ในข้อ 7.3.3 และใช้ paper disc ที่ชุบตัวทำละลายวางเป็นชุดควบคุม ส่วนน้ำมันหอมระเหย วุ้นว่านหางจระเข้และยางไม้ใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม

7.3.5 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *P. acnes* DMST 14916 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใน anaerobic jar บันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้ง

7.3.6 คัดเลือกสารสกัดสมุนไพรที่ให้ผลบวก เพื่อทดสอบหาค่า MIC และ MBC ต่อไป

7.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

7.4.1 ทำการเจือจางลำดับส่วนสารสกัดสมุนไพรที่ให้ผลบวกโดยวิธี agar disc diffusion แบบ 2 เท่าโดยสารสกัดสมุนไพรให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำมันหอมระเหย วุ้นว่านหางจระเข้ ยางไม้ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 100 % และยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

7.4.2 เตรียมแบคทีเรียทดสอบ ดังเช่น ข้อ 7.3.1

7.4.3 เติมสารต่างๆลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด (ตาราง 3)

ตาราง 3 การเติมสารลงในหลอดทดลองเพื่อหาค่า MIC

สาร (มิลลิลิตร)	ปริมาณที่เติม (มิลลิลิตร) ในหลอดทดลองที่									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
สารทดสอบ	0.5	0.5→	0.5→	0.5→	0.5→	0.5→	0.5→	0.5	-	-
TSB หรือ BHI broth	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-	1.0
แบคทีเรียทดสอบ	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เติม

→ หมายถึง ดูดออกใส่หลอดต่อไป

7.4.4 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 72 ชั่วโมง อ่านผลการเกิดความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบในหลอดทดลองด้วยตาเปล่าเทียบกับหลอดควบคุม (หลอดที่ 9 และ 10) ค่า MIC คือค่าความเข้มข้นของสารทดสอบ หรือยาปฏิชีวนะ gentamicin ในหลอดทดลองที่ไม่เกิดความขุ่นขึ้น

7.5 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถฆ่าแบคทีเรียทดสอบ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

7.5.1 นำหลอดทดสอบที่ไม่พบการเจริญของเชื้อในข้อ 7.4.4 มา streak plate บนอาหาร MHA โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อมาตรฐานขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ซึ่งสามารถบรรจุของเหลวได้ 0.01 มิลลิลิตร (นฤมล, 2549) ส่วน *P. acnes* DMST 14916 streak plate บนอาหาร BHI agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *P. acnes* DMST 14916 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใน anaerobic jar อ่านผลโดยดูการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

7.5.2 แปลค่าที่ได้โดยความเข้มข้นที่อ่านเป็นค่า MBC คือค่าที่ให้ผลของการนับจำนวนเซลล์ไม่เกิน 0.01% ของจำนวนเซลล์เริ่มต้น

7.6 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์เพาะเลี้ยงโดยวิธี Reed and Muench (Reed and Muench, 1938)

7.6.1 เติมสารสกัดในแต่ละความเจือจางลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม จากนั้นเติมเซลล์เพาะเลี้ยงลงในทุกหลุม นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

7.6.2 ย้อมสีเซลล์ด้วย crystal violet 0.1% ในเอทานอล 1% ทิ้งไว้ 15 นาที และล้างสีย้อมออก คำนวณค่าความเข้มข้นของสารละลายที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 50% (50% Cytotoxic dose, CD_{50})

7.7 การวิเคราะห์กลุ่มสารเคมีที่มีในสมุนไพร

7.7.1 วิเคราะห์สารสกัดสมุนไพรที่ให้ผลบวกจำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ ยางสดฝิ่นต้น เปลือกตีนเป็ด, ใบยาสูบ, ใบย่านางแดง และเปลือกอบเชยที่สกัดด้วยน้ำ ใบสาบหมา, ใบเสี้ยวดอกขาว, ใบสาบเสือ, ใบย่านางแดง และเปลือกอบเชยที่สกัดด้วยเอทานอล เพื่อให้ทราบถึงกลุ่มของสารที่มีอยู่ในสารสกัดสมุนไพรโดยวิธี GC-MSD scan

7.7.2 ชั่งสารสกัดสมุนไพร 0.1 กรัม ละลายใน methanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ก่อนฉีดเข้าไปในเครื่อง GC/MSD นำผลที่ได้ไปตรวจสอบในฐานข้อมูล และวิเคราะห์ 4-5 สารที่มีปริมาณสูงสุด โดยเปรียบเทียบ retention time กับสารประกอบที่มีอยู่ในฐานข้อมูล

7.7.3 นำกลุ่มสารที่ได้ไปเปรียบเทียบกับสารประกอบที่มีอยู่ในฐานข้อมูล SciFider on Web เพื่อหารูปโครงสร้างและสูตรโครงสร้างของกลุ่มสารเคมีที่มีในสมุนไพร

7.8 การพัฒนาตำรับครีมสมุนไพรต้านแบคทีเรีย

นำสารสกัดสมุนไพรที่ได้คัดเลือก 4 ชนิด ได้แก่ กานพลู ยูคาลิปตัส สาบหมา และย่านาง-แดงที่สกัดด้วยเอทานอล โดยพิจารณาจากประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบและราคาต้นทุนของผลิตภัณฑ์โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับค่า MIC ของสารสกัดที่คัดเลือกมาผสมกันในอัตราส่วนต่างๆ (ตาราง 4) จากนั้นนำมาผสมกับสารเคมีเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ครีมต้นแบบ โดยมีสูตรตำรับทั้งหมด 3 สูตร (ตาราง 5) ดังนี้

ตาราง 4 สัดส่วนการผสมสารสกัดสมุนไพรในแต่ละตำรับ

สมุนไพร	ตำรับที่	ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
กานพลู: ยูคาลิปตัส: สาบหมา: ย่านางแดง	1.1, 2.1, 3.1	125
อัตราส่วน (1:1:1:1)		(31.2: 31.2: 31.2: 31.2)
กานพลู: ยูคาลิปตัส: สาบหมา: ย่านางแดง	1.2, 2.2, 3.2	125
อัตราส่วน (0.5:1:1:1)		(15.6: 36.5: 36.5: 36.5)
ยูคาลิปตัส: สาบหมา: ย่านางแดง	1.3, 2.3, 3.3	125
อัตราส่วน (1:1:1)		(41.7: 41.7: 41.7)

หมายเหตุ เลขตัวแรกหมายถึง 1 ครีมเบส, บริษัทโอวีเคมีคอล จำกัด
2 โลชั่นเบส, บริษัทโอวีเคมีคอล จำกัด
3 ครีมพื้นฐานที่เตรียมขึ้นเอง (ดัดแปลงจากจิราภรณ์, 2545)

ตาราง 5 สูตรตำรับครีม

ลำดับที่	สาร	ปริมาณสาร (%)		
		ตำรับ 1	ตำรับ 2	ตำรับ 3
1	Aloevera extract	-	0.05	-
2	Carbomer	0.5	0.5	-
3	Cetearyl alcohol	0.5	0.5	-
4	Cetyl alcohol	-	-	2.0
5	Collagen	0.5	0.5	-
6	Dimethicone	-	5	-
7	Fragrance	-	q.s.	-
8	Isopropyl myristate	5	5	-
9	Liquid paraffin	-	-	18.0
10	Methyl paraben	0.05	0.05	0.02
11	Propyl paraben	0.05	0.05	0.01
13	Sodium lauryl sulfate	-	-	0.38
14	Stearyl alcohol	0.5	-	4.5
15	Titanium dioxide	0.05	-	-
16	Triethanolamine	0.5	0.5	-
17	Vitamin E	0.3	0.3	-
18	White mineral oil	5	-	-
19	Yogurt	-	0.5	-
20	น้ำ	87	87	50.0
21	สารสกัดสมุนไพร	ดังตาราง 4		

หมายเหตุ: q.s. = quantity sufficient

- หมายถึง ไม่เติม

7.9 การทดสอบประสิทธิภาพของตำรับครีมสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ทดสอบโดย วิธี well diffusion

7.9.1 ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 7.3.1-7.3.3

7.9.2 ใช้พลาสเจอร์ปิเปตที่ไร้เชื้อเจาะหลุม โดยให้แต่ละหลุมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

7.9.3 นำครีมที่ต้องการทดสอบใส่ลงในหลุมที่ทำการเจาะไว้บนอาหาร MHA และอาหาร BHI agar สำหรับ *P. acnes* DMST 14916 ในปริมาณ 100 ไมโครลิตร โดยใช้ครีมพื้นฐานที่ไม่ผสมสมุนไพรเป็นชุดควบคุม (control)

7.9.4 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *P. acnes* DMST 14916 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใน anaerobic jar บันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้ง

7.10 การประเมินความพึงพอใจของอาสาสมัคร

สำรวจความพึงพอใจของอาสาสมัครจำนวน 10 คน ชาย 5 คน และหญิง 5 คน อายุระหว่าง 21-28 ปี โดยใช้แบบสอบถามให้คะแนน (ภาคผนวก ง) โดยประเมินผลิตภัณฑ์จาก รูปลักษณ์ภายนอกและความน่าใช้ของผลิตภัณฑ์ ความพึงพอใจด้านความเป็นเนื้อเดียวกัน สี กลิ่นของผลิตภัณฑ์ และความชอบโดยรวมของผู้บริโภค

7.11 การทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนัง (อ้างโดย วิสาข์ศิริและศิริพร, 2545)

ทดสอบการระคายเคืองและการแพ้ โดยอาสาสมัคร 10 คน เป็นชาย 5 คน และหญิง 5 คน อายุระหว่าง 20-25 ปี ทำการทดสอบดังนี้

7.11.1 ทำความสะอาดผิวหนังบริเวณต้นแขนด้านในของอาสาสมัคร โดยเช็ดด้วยสำลีชุบน้ำสะอาด และเอทานอล 70% ทิ้งไว้ให้แห้ง

7.11.2 แบ่งบริเวณทดสอบเป็นช่องสี่เหลี่ยมขนาด 1×1 เซนติเมตร จำนวน 2 ช่อง แต่ละช่องห่างกันประมาณ 1-2 เซนติเมตร ทาครีมลงไปตำรับละ 1 ช่อง ในปริมาณเท่ากัน

7.11.3 นำผ้าพันแผลแผ่นสี่เหลี่ยมที่สะอาดขนาด 1×1 เซนติเมตร ปิดทับบริเวณทดสอบแล้วปิดพลาสเตอร์กันน้ำทับอีกครั้ง เพื่อป้องกันการเลื่อนหลุดและเปียกน้ำ เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ดึงแผ่นพลาสเตอร์ออก รอประมาณ 10-15 นาที อ่านผลจากตรงกลางของบริเวณที่ปิดผ้าพันแผล ให้คะแนนโดยใช้หลักเกณฑ์ดังนี้

0 = ไม่เกิดอาการแพ้

\+ = mild erythema คือ แดงเล็กน้อย

++ = severe erythema คือ แดงมากแต่บริเวณผิวยังเรียบเนียนอยู่

+++ = erythema and papules คือ แดงและมีตุ่มเกิดขึ้น ผิวไม่เรียบ

++++ = erythema, papules and vesiculation คือ แดงเป็นตุ่ม มีการบวมคั่งของเลือดและมีการเกาะกลุ่มของตุ่ม และอาจแตกเป็นน้ำใสไหลออกมาได้

7.12 การทดสอบความคงตัวของตำรับครีมสมุนไพร

7.12.1 สังเกตลักษณะทางกายภาพของตำรับครีม เช่น สี กลิ่น การแยกชั้นหรือความเป็นเนื้อเดียวกัน

7.12.2 วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของตำรับครีมด้วยเครื่องวัดค่า pH

7.12.3 ทดสอบความคงตัวของตำรับครีมโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 3 เดือน แล้วนำมาประเมินลักษณะทางกายภาพ

7.12.4 ทดสอบ heating-cooling cycle โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อีก 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำการทดสอบรวมทั้งสิ้น 8 รอบ แล้วนำมาประเมินลักษณะทางกายภาพ

7.13 การทดสอบความเป็นพิษของตำรับครีมสมุนไพรต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

7.13.1 เติมครีมสมุนไพรในแต่ละความเจือจางลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม จากนั้นเติมเซลล์เพาะเลี้ยงลงในทุกหลุม นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

7.13.2 ย้อมสีเซลล์ด้วย crystal violet 0.1% ในเอทานอล 1% ทิ้งไว้ 15 นาที และล้างสีย้อมออก คำนวณค่าความเข้มข้นของสารละลายที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 50% (50% Cytotoxic dose, CD_{50}) โดยวิธีของ Reed and Muench (1938)