

## บทที่ 3 การออกแบบและวิธีการทดลอง

### 3.1 วัสดุที่ใช้วิจัย

ในงานวิจัยนี้ใช้วัสดุหลัก ดังนี้ พอลิโพรพิลีน (Polypropylene, PP) และสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ HPQM (2-Hydroxypropyl-3-Piperazinyl-Quinoline carboxylic acid Methacrylate, HPQM) 2 รูปแบบ คือ รูปแบบสารละลาย และรูปแบบสารดูดซับ มีลักษณะดังรูปที่ 3.1 โดยมีการเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพ ดังแสดงในตารางที่ 3.1



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 3.1 วัสดุหลักที่ใช้ในงานวิจัย (ก) เม็ดพอลิโพรพิลีน (ข) สารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ HPQM รูปแบบสารละลาย และ (ค) สารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ HPQM รูปแบบสารดูดซับ

ตารางที่ 3.1 รายละเอียดวัสดุวิจัย

วัสดุวิจัย	รายละเอียด		ผู้ผลิต/จำหน่าย
	สมบัติ	รายละเอียด	
พอลิโพรพิลีน (Polypropylene)	เกรด	P403J	บริษัท ปูนซิเมนต์ไทย จำกัด (ประเทศไทย)
	ลักษณะทาง กายภาพ	เม็ดสีขาวขุ่น	
	ค่าความหนาแน่น (กรัมต่อลูกบาศก์ เซนติเมตร)	0.91	
	ดัชนีการไหล (กรัมต่อ 10 นาที)	3.5	
2-Hydroxypropyl-3- Piperazinyl-Quinoline Carboxylic Acid Methacrylate (HPQM) รูปแบบสารละลาย	เกรด	BCA-101A0	บริษัท Micro Science Tech จำกัด (ประเทศเกาหลีใต้)
	ลักษณะทาง กายภาพ	ของเหลวขุ่นสีเหลืองอ่อน	
	ความหนาแน่น (กรัมต่อลูกบาศก์ เซนติเมตร)	1.05	
	ความเข้มข้น Active ingredient (เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก)	10.0	
	ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) (Active ingredient) [15]	- <i>E. coli</i> (ATCC 25922): 0.015-0.03 mg/L - <i>S. aureus</i> (ATCC 29213): 0.25-0.5 mg/L	

ตารางที่ 3.1 รายละเอียดวัสดุวิจัย (ต่อ)

วัสดุวิจัย	รายละเอียด		ผู้ผลิต/จำหน่าย
	สมบัติ	รายละเอียด	
2-Hydroxypropyl-3-Piperazinyl-Quinoline Carboxylic Acid Methacrylate (HPQM) รูปแบบสารคูดซับ	เกรด	BCA-101A0 Powder	บริษัท โกวเนเจอร์ จำกัด (ประเทศไทย)
	ลักษณะทางกายภาพ	ผงละเอียดสีขาวน้ำหนักเบา	
	ความหนาแน่น (กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	0.21-0.23	
	ความเข้มข้น Active ingredient (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)	20.0	
	ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) (Active ingredient) [15]	- <i>E. coli</i> (ATCC 25922): 0.015-0.03 mg/L - <i>S. aureus</i> (ATCC 29213): 0.25-0.5 mg/L	

### 3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Nutrient Broth, NB) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Nutrient Agar, NA) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งสำหรับนับจำนวนโคโลนี (Plate Count Agar, PCA) และสารละลายเปปโตน (Peptone) ซึ่งรายละเอียดของวัสดุวิจัย แสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 รายละเอียดอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ส่วนผสม		ชื่อทางการค้า/ ผู้ผลิต/ผู้จำหน่าย
อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด เหลว(Nutrient broth)	Plurypeptone	กรัมต่อลิตร	Bo2-123-06 Laboratories Britania (ประเทศอาร์เจนตินา)
	Beef	5.0 3.0	
อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง สำหรับนับจำนวน โคโลนี (Plate count agar, PCA)	Casein enzymic hydrolysate	5.0	M 091 Himedia (ประเทศอินเดีย)
	Yeast extract	2.5	
	Dextrose	1.0	
	Agar	15.0	
อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Nutrient agar)	Plurypeptone	5.0	B02-122-06 Laboratories Britania (ประเทศอาร์เจนตินา)
	Beef	3.0	
	Sodium Chloride	8.0	
	Agar	15.0	
สารละลายเปปโตน (Peptone)	กรดอะมิโน โดยเฉพาะ Tryptophan		RM 001-500G Himedia (ประเทศอินเดีย)

### 3.3 เชื้อแบคทีเรียทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ ATCC 25922 และเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* (*B.cereus*) สายพันธุ์ ATCC 11778 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ประเทศไทย)

### 3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้วิจัย

สำหรับรายละเอียดอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับผสมวัตถุดิบพอลิโพรพิลีน และสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ HPQM รูปแบบสารละลายและรูปแบบสารคูลซ์ อุปกรณ์ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แสดง

รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 3.3 ส่วนเครื่องมือวัดความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย เครื่องทดสอบสมบัติทางกายภาพ เครื่องทดสอบสมบัติเชิงกล และเครื่องตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพอลิเมอร์ แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 3.4

**ตารางที่ 3.3** รายละเอียดและแหล่งที่มาของอุปกรณ์สำหรับเตรียมวัตถุดิบและการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

อุปกรณ์	รายละเอียด	ผู้ผลิต/ผู้จำหน่าย
เครื่องอัดขึ้นรูปแบบใช้ความร้อน (Compression moulding)	รุ่น LP-20M	บริษัท แลบทเทคเอนจิเนียริง จำกัด (ประเทศไทย)
เครื่องอัดรีดแบบเกลียวหอนคู่ (Twin screw extruder)	รุ่น CTW 100P	ของบริษัท Hakke Rheomex (ประเทศเยอรมนี)
เครื่องชั่งน้ำหนัก (Weight scale)	ความละเอียด 0.01 กรัม	บริษัท เมดเลอโทโลโด จำกัด (ประเทศไทย)
เครื่องเร่งสภาวะทดสอบ (Accelerated weathering tester)	รุ่น LU-0819	บริษัท Q-Panel Lab Products จำกัด (ประเทศสหรัฐอเมริกา)
เครื่องดูดสุญญากาศ (Vacuum pump)	รุ่น D0A-P504-BN	บริษัท GAST Manufacturing จำกัด (ประเทศสหรัฐอเมริกา)
ตู้นึ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูง (Auto –stream sterilizer)	รุ่น VS-1321-60	บริษัท Vision Scientific จำกัด (ประเทศเกาหลีใต้)
เครื่องอบลมร้อน (Hot air oven)	รุ่น ULE 500	บริษัท Memmert (ประเทศเยอรมนี)
ตู้นึ่งเชื้อ (Incubator)	รุ่น MIR-153	บริษัท SANYO E&E Europe BV, Biomedical Division จำกัด (สหราชอาณาจักร)
เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (Shaker incubator)	รุ่น J-SIL	บริษัท Jeil Scientific จำกัด (ประเทศเกาหลีใต้)
เครื่องเขย่าแบบวอร์เท็กซ์ (Vortex shaker)	รุ่น KMC-1300V	บริษัท Vision Scientific จำกัด (ประเทศเกาหลีใต้)
ปิเปตอัตโนมัติ (Auto-pipette)	ขนาด 2-20, 20-200, 100-1000 ไมโครลิตร และ 1-10, 0.5-5.0 มิลลิลิตร	บริษัท Brandtech Scientific จำกัด (ประเทศเยอรมนี)

**ตารางที่ 3.3** รายละเอียดและแหล่งที่มาของอุปกรณ์สำหรับเตรียมวัตถุดิบ และการทดสอบ  
ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (ต่อ)

อุปกรณ์	รายละเอียด	ผู้ผลิต/ผู้จำหน่าย
จานเพาะเชื้อ (Petri dish)	เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร	บริษัท เอ็มอาร์เอสไอแอนดิฟิค จำกัด (ประเทศไทย)
ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)	ขนาด 250 มิลลิลิตร	
หลอดแก้วทดลอง (Test tube)	ขนาด 15 มิลลิลิตร	
หลอดเก็บตัวอย่าง (Eppendorf tube)	ขนาด 1 มิลลิลิตร	
กระบอกตวง (Graduated cylinder)	ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร	
ขวดแก้ว (Bottle)	ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร	
บีกเกอร์ (Beaker)	ขนาด 50, 100, 250 และ 1000 มิลลิลิตร	
ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)	-	

**ตารางที่ 3.4** รายละเอียดและแหล่งที่มาของอุปกรณ์สำหรับการวัดความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรีย  
เครื่องทดสอบสมบัติทางกายภาพ เครื่องทดสอบสมบัติเชิงกล และเครื่องตรวจสอบ  
คุณลักษณะของพอลิเมอร์

เครื่องมือ	รายละเอียด	ผู้ผลิต/ผู้จำหน่าย
UV-Vis Spectrophotometer	รุ่น DR400	บริษัท เนชั่นเนลไคเรคเน็ทเวอร์ค จำกัด (ประเทศไทย)
UV-Vis-NIR Recording Spectrophotometer	รุ่น UV3100	บริษัท Shimadzu จำกัด (ประเทศญี่ปุ่น)
Universal Testing Machine	รุ่น Autograph AG-I	บริษัท Shimadzu จำกัด (ประเทศญี่ปุ่น)
Scanning Electron Microscope	รุ่น JSM-6610LV	บริษัท JEOL USA จำกัด (ประเทศสหรัฐอเมริกา)
Contact Angle Goniometer	รุ่น 100-00	บริษัท Ramé-hart Instrument จำกัด (ประเทศสหรัฐอเมริกา)

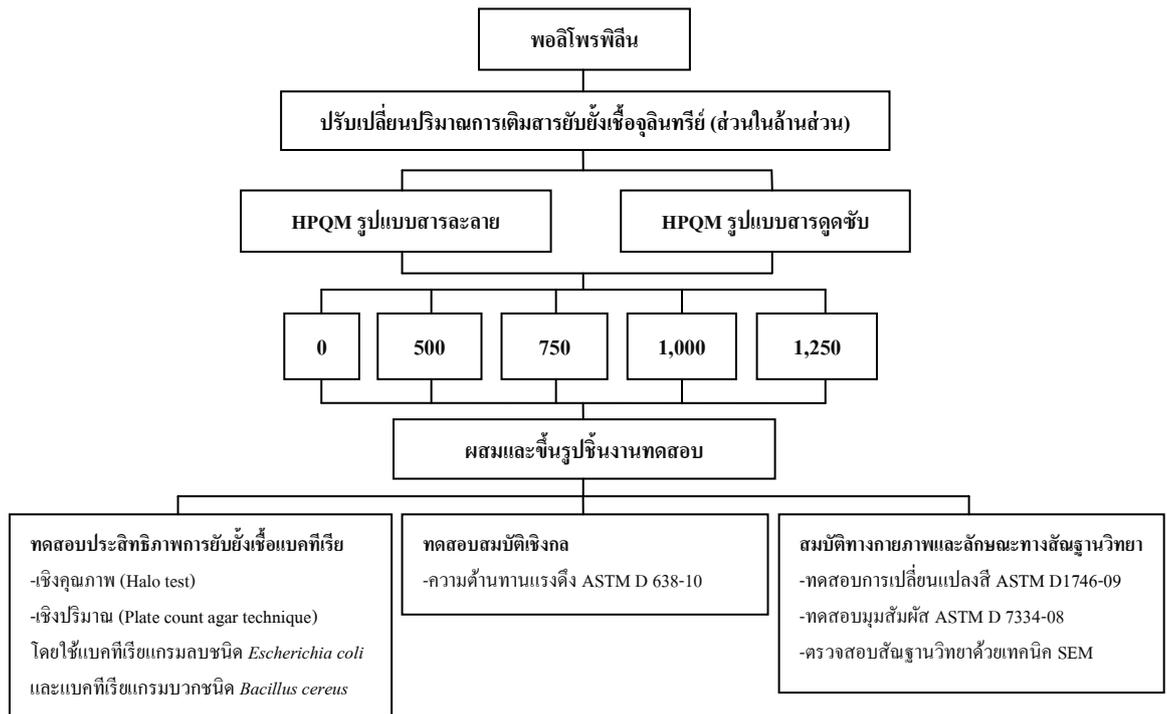
### 3.5 การออกแบบการทดลอง

แผนการดำเนินงานวิจัยได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนดังนี้

1. การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สมบัติเชิงกล และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพอลิโพรพิลีนที่ผสมสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในรูปแบบสารละลายและรูปแบบที่อยู่ในสารดูดซับในอัตราส่วนต่างๆ
2. การศึกษาอิทธิพลของการบ่มเร่งที่มีต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สมบัติเชิงกล และลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของพอลิโพรพิลีนที่ผสมสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

#### 3.5.1 การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สมบัติเชิงกล และลักษณะสัณฐานวิทยาของพอลิโพรพิลีนที่ผสมสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในรูปแบบสารละลาย และรูปแบบสารดูดซับ

แผนการดำเนินงานการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และสมบัติต่างๆ ของพอลิโพรพิลีนผสมสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ HPQM ที่มีปริมาณและรูปแบบที่แตกต่างกันแสดงดังรูปที่ 3.2 เริ่มจากการผสมพอลิโพรพิลีนกับสารยับยั้งเชื้อ HPQM ซึ่งจากการทดลองเบื้องต้นพบว่าช่วงความเข้มข้นของการผสมที่เหมาะสมสำหรับงานวิจัยนี้ [8] ได้แก่ 0, 500, 750, 1000 และ 1250 ส่วนในล้านส่วน กรณีที่ใช้ HPQM รูปแบบสารดูดซับผสมพอลิโพรพิลีน และสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ HPQM รูปแบบสารดูดซับเข้าด้วยกันด้วยเครื่องผสมแบบอครีคเกลียวหนอนคู่ โดยที่วัสดุผสมทั้ง 2 รูปแบบนำไปขึ้นรูปด้วยเครื่องอัดขึ้นรูป และนำชิ้นงานที่ขึ้นรูปได้ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สมบัติเชิงกล สมบัติทางความร้อน และลักษณะทางสัณฐานวิทยา

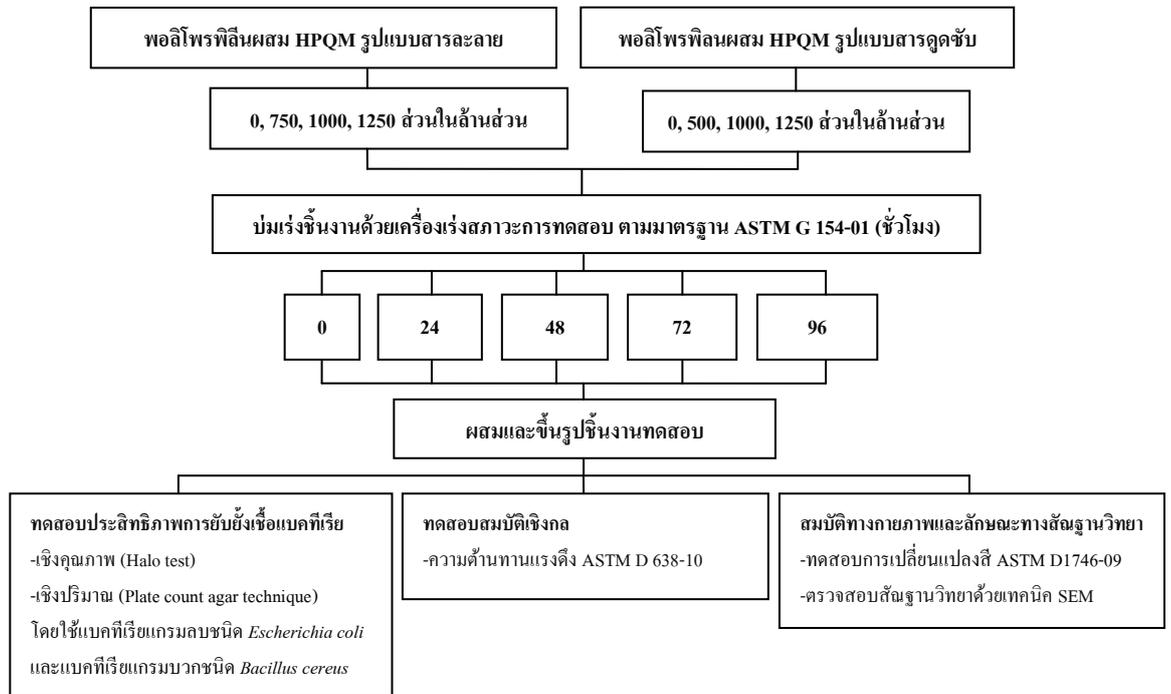


**รูปที่ 3.2** แผนการดำเนินงานการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สมบัติเชิงกล และสมบัติทางกายภาพของพอลิโพรพิลีนผสมสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ HPQM ในรูปแบบและปริมาณต่างๆ

### 3.5.2 การศึกษาอิทธิพลของการบ่มเร่งที่มีต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สมบัติเชิงกล และลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของพอลิโพรพิลีนที่ผสมสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

แผนการดำเนินงานการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และสมบัติต่างๆ ของพอลิโพรพิลีนผสมสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ HPQM หลังเข้าสู่สภาวะบ่มเร่งด้วยเครื่องเร่งสภาวะการทดสอบ (Accelerated weathering tester, QUV) เป็นระยะเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง [52] แสดงดังรูปที่ 3.3 โดยได้ทำการเลือกชิ้นงานที่มีปริมาณการผสมที่ต่ำที่สุดที่สามารถแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ร้อยละ 99.9 จากผลการทดสอบหัวข้อที่ 4.2.2 และชิ้นงานที่มีปริมาณการผสมที่เพิ่มขึ้น ได้แก่ ชิ้นงานพอลิโพรพิลีนผสมสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ HPQM รูปแบบสารละลายที่ความเข้มข้น 750, 1000 และ 1250 ส่วนในล้านส่วน และHPQM รูปแบบสารดูดซับที่

ความเข้มข้น 500, 1000 และ 1250 ส่วนในล้านส่วน เพื่อศึกษาแนวโน้มอิทธิพลของสภาวะบ่มเร่งด้วยเครื่องเร่งสภาวะการทดสอบ ที่มีต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สมบัติเชิงกล สมบัติทางกายภาพ และลักษณะทางสัณฐานวิทยา



รูปที่ 3.3 แผนการดำเนินการพอลิพรพิลีนผสมสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ HPQM หลังผ่านสภาวะบ่มเร่งด้วยเครื่องเร่งสภาวะการทดสอบ

## 3.6 วิธีการทดลอง

### 3.6.1 การเตรียมวัสดุผสมและกระบวนการขึ้นรูปชิ้นงานทดสอบ

#### 3.6.1.1 การเตรียมวัสดุผสม

การเตรียมวัสดุผสมแบ่งเป็น 2 รูปแบบ ดังนี้ การผสมพอลิโพรพิลีนกับสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ HPQM รูปแบบสารดูดซับ และการผสมพอลิโพรพิลีนกับสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ HPQM รูปแบบสารละลาย

- การเตรียมวัสดุผสมพอลิโพรพิลีนกับสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ HPQM รูปแบบสารดูดซับ  
เริ่มจากการนำพอลิโพรพิลีน และสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ HPQM ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผสมด้วยกัน โดยเครื่องผสมแบบอครีคเกลียวหนอนคู่ แสดงดังรูปที่ 3.4
- การเตรียมวัสดุผสมพอลิโพรพิลีนกับสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ HPQM รูปแบบสารละลาย  
นำสารละลาย HPQM ผสมกับพอลิโพรพิลีนจากนั้นนำไปไล่ความชื้นที่อุณหภูมิห้องในสภาวะสูญญากาศเป็นเวลา 7-10 วัน เพื่อระเหยน้ำซึ่งเป็นตัวทำละลายออก และนำของผสมที่ได้มาทำการผสมด้วยเครื่องอครีคแบบเกลียวหนอนคู่ต่อไป



รูปที่ 3.4 เครื่องอครีคแบบเกลียวหนอนคู่

### 3.6.1.2 การขึ้นรูปชิ้นงานทดสอบ

ชิ้นงานสำหรับทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สมบัติเชิงกล และสมบัติกายภาพของ พอลิโพรพิลีนผสมสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ HPQM ขึ้นรูปเป็นชิ้นงานทดสอบด้วยเครื่องอัดขึ้นรูปด้วยความร้อน (Compression moulding) แสดงในรูปที่ 3.5 โดยชิ้นงานทดสอบที่ผ่านกระบวนการขึ้นรูปมีความหนาประมาณ 1.0 มิลลิเมตร



รูปที่ 3.5 เครื่องอัดขึ้นรูปด้วยความร้อน

#### สถานะการขึ้นรูปชิ้นงานทดสอบ [29]

- นำวัสดุผสมที่ได้จากหัวข้อ 3.6.1.1 น้ำหนัก 35 กรัม ใส่แม่พิมพ์ จากนั้นปิดแม่พิมพ์
- เริ่มให้ความร้อนแก่วัสดุผสมที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที
- เพิ่มความดันแม่พิมพ์เป็น 50 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที
- เพิ่มความดันแม่พิมพ์เป็น 100 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที
- หล่อเย็นแม่พิมพ์ด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง ความดันปิดแม่พิมพ์ 100 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 5 นาที

- ตัดชิ้นงานเป็นรูปแบบชิ้นงานเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียตามมาตรฐาน ASTM E2149-2013 และสมบัติเชิงกลตามมาตรฐาน ASTM D638-2010

### 3.6.2 การทดสอบสภาวะบ่มเร่งด้วยเครื่องเร่งสภาวะการทดสอบ

การเตรียมชิ้นงานทดสอบทำเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.6.1 โดยสภาวะบ่มเร่งชิ้นงานทดสอบตามมาตรฐาน ASTM G 154 (2006) Cycle 1 ด้วยเครื่องเร่งสภาวะการทดสอบ (Accelerated weathering tester, QUV) แสดงดังรูปที่ 3.6 ซึ่งชิ้นงานสัมผัสรังสียูวี-เอ (UVA) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง สลับกับการสัมผัสความชื้นในสภาวะควบแน่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยช่วงเวลาของการทดสอบเป็น 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงตามลำดับ [29] ต่อจากนั้นนำชิ้นงานที่ผ่านสภาวะบ่มเร่งในช่วงเวลาต่างๆ ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และสมบัติต่างๆ ในลำดับต่อไป



รูปที่ 3.6 เครื่องเร่งสภาวะการทดสอบ

### 3.6.3 การเตรียมชิ้นงานทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

การเตรียมชิ้นงานทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสามารถแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ โดยแบ่งตามเทคนิคของการทดสอบ [39] ดังนี้

- ชิ้นงานทดสอบรัศมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Halo test): ชิ้นงานทดสอบถูกตัดให้มีลักษณะเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
- ชิ้นงานทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคการนับเชื้อแบคทีเรีย (Plate count agar technique): เตรียมชิ้นงานทดสอบขนาด 2.5x5 ตารางเซนติเมตร จำนวน 2 ชิ้น

### 3.6.4 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

งานวิจัยนี้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ โดยเทคนิคการวัดรัศมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเทคนิคการนับเชื้อแบคทีเรีย ตามลำดับ โดยขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียควบคุมการทดสอบภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่มาจากสิ่งแวดล้อม

#### 3.6.4.1 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

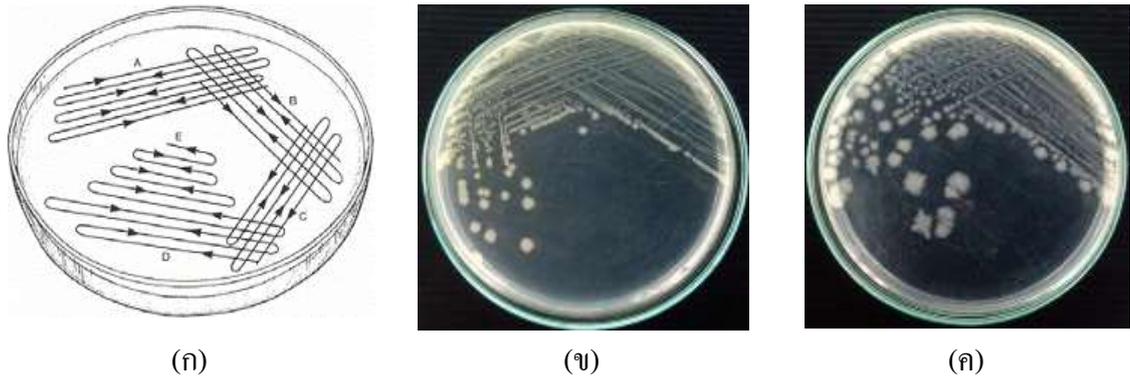
- การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งสำหรับนับจำนวนโคโลนี (Plate count agar): ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำหนัก 23.5 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเข้าตู้นิ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 เมกะปาสคาล
- การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Nutrient agar): ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำหนัก 31.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเข้าตู้นิ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 เมกะปาสคาล
- การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Nutrient broth): ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำหนัก 8.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเข้าตู้นิ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 เมกะปาสคาล

- การเตรียมสารละลายเปปโตน (Peptone): การเตรียมผสมอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำหนัก 1 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเข้าตู้เย็นฆ่าเชื้อแรงดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 เมกะปาสกาล
- การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็ง (Soft agar): ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Nutrient agar) และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Nutrient broth) ในอัตราส่วน 1:1 ในหลอดพลาสติกที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว พร้อมทั้งเขย่าเพื่อให้อาหารทั้งสองชนิดเข้ากัน ในขั้นตอนนี้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง กรณีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งสำหรับนับจำนวนโคโลนีเมื่อผ่านขั้นตอนการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยตู้เย็นฆ่าเชื้อแรงดันสูงแล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และรักษาอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ให้มีอุณหภูมิสูงกว่า  $60 \pm 5$  องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการแข็งตัวก่อนใช้งาน จากนั้นนำวุ้นเลี้ยงเชื้อเทลงในจานเพาะเชื้อ (Petri dish) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยให้ความหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร รอให้วุ้นแข็งตัว กรณีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว เมื่อผ่านขั้นตอนการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยตู้เย็นฆ่าเชื้อแรงดันสูงแล้ว วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเตรียมไว้ใช้งานสำหรับเพาะเชื้อเริ่มต้น

#### 3.6.4.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบเริ่มต้น

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ เริ่มจากขั้นตอนของการแยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยว หรือเชื้อบริสุทธิ์ (Single colony) โดยวิธีการจีดเชื้อ (Streak plate) จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

- ขั้นตอนการจีดเชื้อ (Streak plate) เริ่มจากนำห้วงลวด (Incubating loop) ฆ่าเชื้อโดยการลนไฟ และรอให้ห้วงลวดเย็น จากนั้นใช้ห้วงลวดจุ่มลงในหลอดเชื้อเริ่มต้น จากนั้นนำมาจีดลงบนวุ้นเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งสำหรับนับจำนวนโคโลนีที่เตรียมไว้โดยให้มีลักษณะตัดกัน 3 แนว แสดงดังรูปที่ 3.7 (ก) และนำเชื้อที่ผ่านการจีดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ซึ่งโคโลนีที่ได้จากการจีดเชื้อมีลักษณะดังรูปที่ 3.7 (ข) และ 3.7 (ค)



รูปที่ 3.7 เทคนิคการทำเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธีการขีดเชื้อ

(ก) ลักษณะของแนวในการขีดเชื้อก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส [53]

(ข) ลักษณะของโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli*

(ค) ลักษณะของโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *B. cereus*

- ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดแก้วทดลอง (Test tube) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำห้วงหลอดที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยโคโลนีเดี่ยวจากจานเลี้ยงเชื้อจำนวน 1 โคโลนี แล้วจุ่มเชืวดังกล่าวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว และนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

#### 3.6.4.3 การกำหนดปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น

- นำเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่ผ่านการบ่มเชื้อมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบวอร์เท็กซ์ เพื่อให้มีการกระจายตัวสม่ำเสมอ จากนั้นทำการวัดความขุ่น ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร (Optical density at 600 nm,  $OD_{600}$ ) ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ดังรูปที่ 3.8 โดยปรับเส้นมาตรฐาน (Based line) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว



รูปที่ 3.8 เครื่อง UV-Vis spectrophotometer

- นำค่าที่ได้จากการวัดความขุ่นมาคำนวณหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ดังสมการที่ 3.1

$$(OD)_1 \cdot V_1 = (OD)_2 \cdot V_2 \quad \text{สมการที่ 3.1}$$

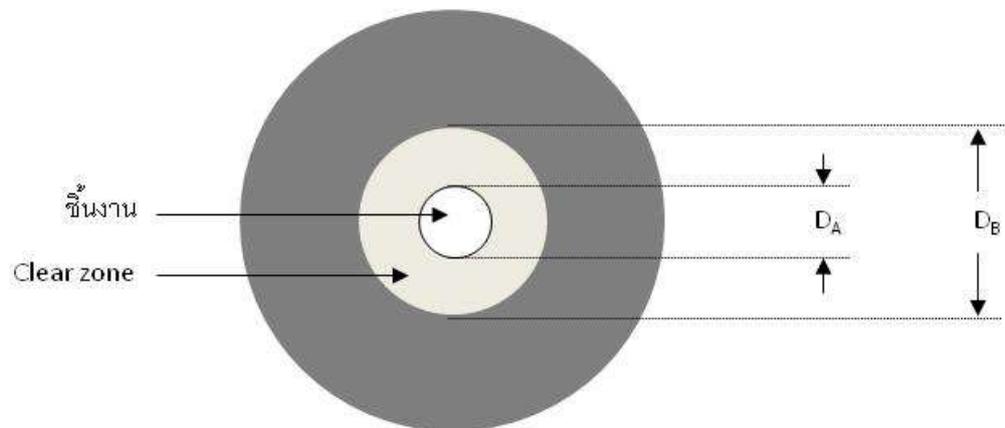
- โดย  $(OD)_1$  คือ ค่า  $OD_{600}$  ของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น
- $V_1$  คือ ปริมาตรของเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการเจือจาง
- $(OD)_2$  คือ ค่า  $OD_{600}$  ของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น ซึ่งในงานวิจัยนี้กำหนดค่าเท่ากับ 0.1
- $V_2$  คือ ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบกับชิ้นงาน ซึ่งยกตัวอย่างให้มีค่าเท่ากับ 50 มิลลิลิตร

#### 3.6.4.4 การทดสอบรัศมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Halo test)

การทดสอบรัศมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป็นเทคนิคที่ตรวจสอบ บริเวณที่ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย บริเวณรอบชิ้นงาน ซึ่งการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยสามารถเปรียบเทียบได้จากค่ารัศมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบริเวณรอบชิ้นงานทดสอบ (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) แสดงดังรูปที่ 3.9 โดยมีขั้นตอนดังนี้

- ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวและแข็งในอัตราส่วน 1:1 ในหลอดพลาสติกที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว พร้อมทั้งเขย่าเล็กน้อยเพื่อให้อาหารทั้งสองชนิดเข้ากัน ได้อาหารเลี้ยงเชื้อในรูปกึ่งแข็ง

- ปิเปตเชื้อเริ่มต้นที่วัดค่า OD<sub>600</sub> แล้ว ในปริมาตรที่ได้จากการคำนวณด้วยสมการที่ 3.1 (โดยกำหนดให้ OD<sub>2</sub> และ V<sub>2</sub> มีค่าเท่ากับ 0.1 และ 15 มิลลิลิตร ตามลำดับ) ลงในหลอดแก้วทดลองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งที่เตรียมจากขั้นตอนที่แล้ว อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ในหลอดแก้วทดลองดังกล่าวจนกระทั่งมีปริมาตรครบ 15 มิลลิลิตร
- เขย่าหลอดแก้วทดลองเล็กน้อย และเทบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งในงานเพาะเชื้อ จากนั้นเหวี่ยงงานเพาะเชื้อเล็กน้อยเพื่อให้ของผสมระหว่างเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อกระจายในงานเพาะเชื้ออย่างทั่วถึง
- รอให้ของผสมแข็งตัว แล้วจึงวางชิ้นงานที่เตรียมไว้ในขั้นตอนข้างต้น โดยการจับและวางชิ้นงานอาศัยปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์ ลนไฟ เพื่อฆ่าเชื้อ และควรวางชิ้นงานที่ผสมและไม่ผสมสารยับยั้งเชื้อลงในจานเดียวกัน เพื่อควบคุมให้อยู่ในสถานะเดียวกัน
- นำงานเพาะเชื้อที่วางชิ้นงานแล้วเข้าสู่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นจึงวิเคราะห์ความกว้างของบริเวณที่เกิดการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และคำนวณเป็นรัศมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ดังรูปที่ 3.9 และสมการที่ 3.2



รูปที่ 3.9 แบบจำลองการวัดขนาดรัศมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

สูตรการคำนวณรัศมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

$$D_c = \frac{D_B - D_A}{2}$$

สมการที่ 3.2

- โดย  $D_C$  คือ ค่ารัศมีการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร)  
 $D_B$  คือ เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญเติบโตรอบชิ้นงาน (มิลลิเมตร)  
 $D_A$  คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของชิ้นงานทดสอบ (มิลลิเมตร)

### 3.6.4.5 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย รายละเอียดดังต่อไปนี้

- ปิเปตเชื้อเริ่มต้นที่วัดค่า  $OD_{600}$  แล้ว ในปริมาตรที่ได้จากการคำนวณด้วยสมการที่ 3.1 (โดยกำหนดให้  $OD_2$  และ  $V_2$  มีค่าเท่ากับ 0.1 และ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ) ลงในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีกระดาษอลูมิเนียม (Aluminium foil) ปิดและผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติมสารละลายเปปโตน ในขวดรูปชมพู่ดังกล่าวจนกระทั่งมีปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร เพื่อเป็นตัวกลางสำหรับทดสอบการต้านทานเชื้อแบคทีเรียของวัสดุที่ผสมสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย
- บรรจุชิ้นงานทดสอบขนาด 2.5x5 ตารางเซนติเมตร จำนวน 2 ชิ้น เข้าขวดรูปชมพู่ดังกล่าวด้วยเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (Shaking incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสด้วยอัตรา 100 รอบต่อนาที และทำการเก็บสารแขวนลอยเชื้อตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 [54] ชั่วโมงตามลำดับ
- เมื่อครบกำหนดเวลาในการเก็บสารแขวนลอยเชื้อตัวอย่าง โดยปิเปตสารแขวนลอยจากขวดรูปชมพู่ทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดเก็บตัวอย่างซึ่งมีน้ำกลั่นปริมาตร 900 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นการเจือจางเชื้อในลำดับที่ 1 ( $n=1$ ) จากนั้นเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบออร์เทกซ์ โดยการกระทำดังกล่าวเป็นการเจือจางให้เชื้อทดสอบมีความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า (Ten-fold serial dilution) จากนั้นเจือจางเชื้อต่อโดยปิเปตเชื้อจากหลอดลำดับที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอดเก็บตัวอย่างลำดับที่ 2 ( $n=2$ ) เจือจางเชื้อตามขั้นตอนนี้ต่อไป ประมาณ 6-7 ครั้ง
- จากนั้นนำเชื้อที่ผ่านระดับการเจือจางตามที่ต้องการจำนวน 10 ไมโครลิตร หยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งในจานเพาะเชื้อ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
- ตรวจสอบจำนวนโคโลนีที่ได้จากการทดสอบ (ช่วงของปริมาณของโคโลนีที่เหมาะสมต่อการนำไปวิเคราะห์คือ 3-30 โคโลนี) และสามารถคำนวณประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากปริมาณความเข้มข้นของเชื้อในรูปแบบโคโลนีต่อมิลลิลิตร หรือ CFU/ml และร้อยละการลดลงของเชื้อแบคทีเรียหลังผ่านการทดสอบในเวลาที่กำหนด ดังสมการที่ 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ

การคำนวณปริมาณของเชื้อที่มีอยู่

$$\text{จำนวน โคลิฟอร์มต่อมิลลิลิตร (CFU/ml)} = \frac{\text{จำนวน โคลิฟอร์มแบคทีเรียโดยเฉลี่ย}}{10^n \cdot \text{ปริมาตรของเชื้อที่นำมาเลี้ยงบนอาหาร (มิลลิลิตร)}}$$

สมการที่ 3.3

โดย n คือ จำนวนครั้งของการเจือจาง

การคำนวณร้อยละการลดลงของเชื้อ

$$\text{ร้อยละการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย (R)} = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad \text{สมการที่ 3.4}$$

โดย A คือ จำนวนแบคทีเรียทดสอบที่มีชีวิตหลังผ่านการทดสอบตามเวลาที่กำหนด

(CFU/ml): กรณีชิ้นงานทดสอบที่ ไม่ผสมสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

B คือ จำนวนแบคทีเรียทดสอบที่มีชีวิตหลังผ่านการทดสอบตามเวลาที่กำหนด

(CFU/ml): กรณีชิ้นงานทดสอบที่ ผสมสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

### 3.6.5 การทดสอบสมบัติเชิงกลด้านความต้านทานต่อแรงดึง

งานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบ มอดุลัสแรงดึง (Tensile modulus) ความต้านทานต่อแรงดึง (Tensile strength) และการยืดตัวที่จุดขาด (Elongation at break) ด้วยเครื่อง Universal testing machine แสดงในรูปที่ 3.10 โดยสภาวะการทดสอบที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วในการดึง 50 มิลลิเมตรต่อ นาที และการเตรียมชิ้นงานอ้างอิงตามมาตรฐาน ASTM D638-10 type 4



รูปที่ 3.10 เครื่อง Universal Testing Machine

### 3.6.6 การทดสอบสมบัติทางกายภาพ

#### 3.6.6.1 การทดสอบการเปลี่ยนแปลงสีของพอลิเมอร์

งานวิจัยนี้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีของชิ้นงานโดยทดสอบด้วยระบบ Hunter Lab ด้วยเครื่อง UV-Vis-NIR Recording Spectrophotometer ดังรูปที่ 3.11 เพื่อหาค่า  $L^*$  (lightness),  $a^*$  และ  $b^*$  ซึ่งได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อที่ 2.7



รูปที่ 3.11 เครื่อง UV-Vis-NIR Recording Spectrophotometer [55]

### 3.6.6.2 การทดสอบการเปียกผิวของพอลิเมอร์

งานวิจัยนี้ได้ทำการวัดมุมสัมผัสของพอลิเมอร์ทดสอบ ตามมาตรฐาน ASTM D7334 (2008) ด้วย เครื่องวัดมุมสัมผัส (Contact angle goniometer) ดังรูปที่ 3.12



รูปที่ 3.12 เครื่องวัดมุมสัมผัส

### 3.6.7 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

การวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของชิ้นงานทดสอบ เพื่อแสดงการเปลี่ยนแปลงของชิ้นงานที่ผสมสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ HPQM รูปแบบสารละลายและรูปแบบสารคูดซับ ก่อนและหลังสภาวะบ่มเร่งด้วยเครื่องเร่งสภาวะการทดสอบ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และสมบัติต่างๆ โดยตัดชิ้นงานทดสอบบนแท่น (Stub) ด้วยเทปกาวคาร์บอน แล้วนำไปเคลือบทองด้วยเครื่องระบบสุญญากาศ ที่กระแสไฟฟ้า 20 แอมแปร์ ความดัน 3 บาร์ เวลา 200 วินาที [52] และนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ดังแสดงในรูปที่ 3.13



รูปที่ 3.13 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด