

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
2. ขวดฝาเกลียว
3. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
4. จานเพาะเชื้อ (steriled petri disc or plate)
5. ปิเปตต์ (steriled pipet)
6. เครื่องอ่างน้ำ (water bath)
7. Dextrose 10 กรัม
8. Yeast extract 10 กรัม
9. กลูโคส 1.0 กรัม
10. Malt extract 5 กรัม
11. ผงวุ้น (agar) 30 กรัม
12. น้ำกลั่น 2,000 กรัม ปรับพีเอชสุดท้ายเท่ากับ 7.0 ± 0.1 (25 องศาเซลเซียส)
13. เครื่องนับโคโลนี
14. Nutrient broth 8.0 กรัม
15. เครื่องชั่ง

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient broth

ละลาย Nutrient broth ลงในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแก้วให้สารอาหารละลายปรับ pH ด้วย 0.1 NaOH หรือ 0.1 N HCl จนได้ประมาณ 6.8 - 7 ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรนำไปผสมวุ้นต้มจนละลายเทอาหารใส่ขวดปริมาณขวดละ 200 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี ปิด

ทับด้วยกระดาษอีกครึ่งนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

2. Malt Yeast Agar (MYA)

วิธีเตรียม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรต้มวุ้นให้สุกแล้วนำมาผสมกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร เทใส่ขวดอาหารขวดละประมาณ 150 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดให้สนิทนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

วิธีการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากมะหาดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากมะหาด ในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* , *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ (Larry McKANE .et al., 1985) ของสารสกัดจากมะหาด ซึ่งใช้เอธิลอะซิเตรตและเมทานอลเป็นตัวทำละลายตามลำดับดังต่อไปนี้

1. ป้ายเชื้อที่ใช้ทดสอบแบบ 3 – dimension
2. วาง disc ลงบนจานเพาะเชื้อ (plates) ให้ครบ 4 จุด แล้วทำการปิเปต (pipette) สารสกัดจากมะหาดมา 50 ไมโครลิตร
3. บ่มเพาะเชื้อที่ตู้บ่มเชื้อ (incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 – 24 ชม.
4. วัดขนาดของ zone of inhibition

การเตรียมตัวอย่างตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง 6 ตำรับ

การตั้งตำรับสูตรเครื่องสำอางชนิดผิว

1. เตรียมครีมเบสหนึ่ง
2. ปรับความเข้มข้นของปริมาณผงมะหาดในตำรับครีมเบสที่เตรียมไว้ ตามความเข้มข้น คือ 1%, 2%, 3%, 4% และ 5%
3. ตำรับครีมเบสที่จะใช้คือ

ตาราง 3.1 สูตรครีมตำรับสครับขัดผิว

สาร	ชื่อเคมี (INCI Name)	% w/w
วัฏภาคน้ำ (water phase)		
Aqua	Distilled water	55.0
Glycerin	Glycerin	4.0
สารสกัดมะหาด	-	2.0
วัฏภาคน้ำมัน (oil phase)		
Cremophor [®] A6	Ceteareth-6(and) Stearyl Alcohol	2.0
Cremophor [®] A25	Ceteareth-25	1.0
G.M.S.		3.0
Wax C	Cetyl alcohol	1.0
Lexol EHP	Ethylhexyl Palmitate	14.50
Nikko MM		1.00
Silicone 345	Cyclomethicone	2.0
White oil	Minerol oil	14.50
Unigerm G-2	Propylene Glycol and Diazolidinyl Urea and Methylparaben and Propylparaben	0.3
Fragrance	-	-

ที่มา: ดัดแปลงจาก สูตรตำรับนิ้วตัวของ บ. วันรัต

การตั้งตำรับสูตรโลชั่น

ตาราง 3.2 สูตรตำรับโลชั่นมะหาด 2% w/w

สาร	ชื่อเคมี (INCI Name)	% w/w
Aqua	Distilled water	Diluent
EDTA 2 Na	Disodium EDTA	0.2
DHDH Hydantoin	DHDH Hydantoin	0.6
Sodium stearyl glutamate	Sodium stearyl glutamate	0.2
สารสกัดมะหาด		5%
วัฏภาคน้ำมัน (oil phase)		
Sodium polycrylate	Sodium polycrylate	1.0
Dicarpryl ether	Dicarpryl ether	3.0
Minerol oil	Minerol oil	4.0
Propylene glycol	Propylene glycol	4.0
Fragrance	-	

การตั้งตำรับสูตรครีมอาบน้ำ

ตารางที่ 3.3 สูตรตำรับครีมอาบน้ำมะหาด 2% w/w

สาร	ชื่อเคมี (INCI Name)	% w/w
Aqua	Distilled water	73.8
SLS	Sodium Laureth Sulfate	15.0
EDTA 2 Na	Disodium EDTA	0.2
DHDH Hydantoin	DHDH Hydantoin	0.5
Lauamind [®] C	Cocamide DEA	2.5
Fiquat [®] CP	Quaternium-75	5.0
Propylene glycol	Propylene glycol	3.0

วิธีตรวจนับจุลินทรีย์มาตรฐาน หรือ Standard plate count (SPC)

การเตรียมและเจือจางตัวอย่าง

1. ทำ Serial dilution โดยใช้ปิเปต (steriled pipet) ขนาด 1 มล. ดูดตัวอย่างออกไป 1 มล. ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 9 มล. ผสมให้เข้ากันดี ดังนั้นตัวอย่างจะถูกทำให้เจือจางลง 10 เท่า เป็น $1:10$ หรือ 10^{-1}

2. จากนั้นเปลี่ยนปิเปตใหม่ (steriled pipet) และปิเปต (steriled pipet) ดูดของเหลวจากข้อ 1 ออกไป 1 มล. ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 9 มล. ผสมให้เข้ากันดี ดังนั้น ตัวอย่างจะถูกทำให้เจือจางลงอีก 10 เท่า เป็น $1:100$ หรือ 10^{-2}

3. จากนั้นเปลี่ยนปิเปตใหม่ (steriled pipet) และปิเปต (steriled pipet) ดูดของเหลวจากข้อ 2 ออกไป 1 มล. ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 9 มล. ผสมให้เข้ากันดี ดังนั้นตัวอย่างจะถูกทำให้เจือจางลงอีก 10 เท่า เป็น $1:1,000$ หรือ 10^{-3}

4. ใช้ปิเปต (steriled pipet) ขนาด 1 มล. ดูดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} จำนวน 0.1 มล. ใส่ใน Sterilized Petri dish 1 จานต่อ 1 ความเข้มข้น จากนั้นเทอาหาร Nutrient agar ขณะที่ยังอุ่นๆ ทับลงไปค่อยๆ ผสมจนเข้ากันดีแล้วทิ้งไว้ รอจนอาหารแห้ง

5. คว่ำจานอาหารที่แห้งแล้วใส่ถุงพลาสติกรัดยางให้แน่นแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ 24 ชั่วโมง แล้วนำมานับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ ยีสต์ และรา

การตรวจวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ตามมาตรฐาน Standard plate count (SPC)

1. ดูดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} จากข้อ 1 - 3 จำนวน 0.1 มล. ใส่ใน Sterilized Petri dish 1 จานต่อ 1 ความเข้มข้นทั้งหมด 80 จาน

2. จากนั้นเท Nutrient broth และ Malt Yeast Agar (MYA) ขณะที่ยังอุ่นๆ ทับลงไปค่อยๆ ผสมจนเข้ากันดี แล้วทิ้งไว้ รอจนอาหารแห้ง

3. คว่ำจานอาหารที่แห้งแล้วใส่ถุงพลาสติกรัดยางให้แน่นแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ 24 ชั่วโมงแล้วนำมาวิเคราะห์จุลินทรีย์

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากมะหาดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ จากการวัดบริเวณขนาด clear zone ที่เกิดขึ้น

2. วิธี Standard plate count เริ่มจากการเก็บตัวอย่าง จากนั้นนำมาเจือจางเป็นลำดับเท่าติดต่อกัน (serially diluted) หาจำนวนจุลินทรีย์จากส่วนหนึ่ง (aliquotes) ของตัวอย่างที่เจือจาง (dilution) บนอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดไม่คัดเลือก (non-selective medium) จำนวนจุลินทรีย์ต่อหนึ่งหน่วยน้ำหนักหรือจำนวนจุลินทรีย์ต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรจะสามารถคำนวณได้จากผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่โตในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์จากลำดับตัวอย่างที่เจือจางเป็นเท่าติดต่อกัน

การคำนวณทำได้โดย

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

3. การตรวจวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ตามมาตรฐาน จากการพบจุลินทรีย์ในตัวอย่างแต่ละชนิดหรือไม่