บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ เชื้อจุลินทรีย์ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

1. น้ำมันกานพลูทางการค้า (บริษัท ศรีจันทร์สหโอสถ จำกัด, กรุงเทพ)
2. น้ำมันกระเทียมทางการค้า (บริษัท เครื่องหอมไทย-จีน จำกัด, กรุงเทพ)
3. สารสกัดจากเปลือกทับทิม ด้วยตัวทำละลาย (hexane, ethyl acetate, Chloroform, ethanol และน้ำ
4. L-α-เลซิติน (phosphotidyl choline $\geq$ ร้อยละ 96.4, Merck, Germany)
5. LM-Pectin (Poly-D-galacturonic acid methyl ester, Himedia, India)

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

Escherichia coli ATCC 25922 *Escherichia coli* ATCC 8739 *Salmonella* Typhimurium ATCC 23564 *Salmonella* Choleraesuis ATCC 25923 *Pseudomonas sp.* ATCC 25619 ได้จัดหาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (นนทบุรี) *Lactobacillus sp.* TISTR 539 และ *Lactobacillus sake* TISTR 890 ได้จัดหาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (ปทุมธานี)

3.1.3 สารเคมี/อาหารเลี้ยงเชื้อ/วัสดุ

1. ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 99 (Merck, Germany)
2. Tetracycline (Becton, Dickson and Company, USA)
3. Chloramphenical (Benex Limited, USA)
4. lactobacilli MRS broth (Himedia , India)
5. lactobacilli MRS agar (Himedia , India)
6. nutrient broth (Himedia , India)
7. nutrient agar (Himedia , India)

8. Calciun chloride (Calcium chloride dehydrate, Ajax Finechem, Australia)
9. Sorbitol (Ajax Finechem, Australia)
10. Glycerol (Ajax Finechem, Australia)
11. Magnesium nitrate (Ajax Finechem, Australia)
12. Plate count agar (Britania, Argenitina)
13. Pseudomonas agar base (Oxoid, England)
14. Pseudomonas C-F-C Supplement (Oxoid, England)
15. Salmonella – Shigella (SS) agar (Merck, Germany)
16. Peptone from casein ((Merck, Germany)
17. E.coli/Coliform Count Plate (Petrifilm®, 3M, USA)
18. Gaspak Anaerobic system (Merck, USA)
19. Antibiotica-Testblattchen paper disc (Duran, USA)

3.1.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องตีผสมแรงดันสูง (Homogenizer, Ystral X10/25, Ballrechten-Dottingen, Netherlands)
2. เครื่องกำเนิดความถี่เหนือเสียงแบบหัวโพรบ (Ultrasonication probe, Dr.hielscher Up400s, Germany)
3. เครื่องวัดแรงตึงผิว (Goniometer FTA 100, First Ten Angstroms, Portsmouth, Wirginia, USA)
4. เครื่องกำเนิดความถี่เหนือเสียงแบบอ่าง (Bath sonicate, Ultrasonik, Fisher scientific worldwide, Germany)
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, DH-60-110, Sentific promotion co.th , Thailand)
6. เครื่องเคลือบฟิล์ม (Film coater PI-1210, Japan)
7. เครื่องอบแห้ง (17200 Tutingen, Wtc binder, Germany)
8. Micrometer (Dial Thinckness Gauge 7301, Mitutoyo, Tokyo, Japan; 0.01 μm limit)
9. Texture Analyzer (Intron 5565, USA)
10. Desiccator

11. แม่พิมพ์สำหรับขึ้นรูปฟิล์ม ทำจากแผ่นพลาสติก acrylic ใส
12. เครื่องวัดสี (Minolta Chroma Meter model CR-400, Osaka, Japan)
13. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (V-530PC, Japan)
14. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รุ่น JSM-5410 LV, Japan)
15. Anaerobic jar (Oxoid, England)
16. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (A&D company รุ่น HR-200)
17. ตู้ควบคุมความชื้น
18. Stomacher (รุ่น 400 circular, England)
19. ถุงพลาสติกชนิด low density polyethylene

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การประเมินความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกานพลู กระเทียมและเปลือกทับทิม

3.2.1.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* ATCC 25922 *E. coli* ATCC 8739 *Salmonella* Typhimurium *Salmonella* Choleraesuis *Pseudomonas sp.* ใน NB broth ซึ่งจะใช้เป็น standardized culture และเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus sp.* TISTR 539 และ *Lactobacillus sake* TISTR 890 ใน MRS broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ได้เข้าสู่ stationdary phase มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^7 CFU/ml เป็นปริมาณทำให้เนื้อเสื่อมเสียได้ (Ouattara *et al.*, 1997)

3.2.1.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของน้ำมันกานพลู น้ำมันกระเทียม และสารสกัดจากเปลือกทับทิม โดยวิธี disc diffusion

นำเซลล์จาก standardized culture มาบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB broth และ MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ sterile cotton swab จุ่มเชื้อที่ใช้ทดสอบ แล้วนำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร nutrient agar (NA) และ MRS agar นำ sterile paper disc (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร) จุ่มลงในน้ำมันกานพลู น้ำมันกระเทียม และสารสกัดจากเปลือกทับทิมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ (hexane, ethyl acetate,

chloroform, ethanol และน้ำ) นำ paper disc ที่จุ่มสารดังกล่าวแล้วมาวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ swab เชื้อไว้ข้างต้น บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ในกรณีเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus sp.* และ *Lactobacillus sake* ทดสอบ 2 ซ้ำ วัดผลในการประเมินความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยพิจารณาจากเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (clear zone) (Ahmad *et al.*,1998)

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 13.0 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

3.2.2 การศึกษาสัดส่วนระหว่างสารละลายเลซิตินและสารสกัดต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม สำหรับการผลิตไลโพโซมโดยเทคนิคดับเบิ้ลอิมัลชันและประเมินความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไลโพโซมเอนแคปซูเลชันของสารสกัด โดยวิธี disc diffusion

3.2.2.1 การวิเคราะห์ค่า critical micelle concentration (CMC) ของสารละลายเลซิติน

เตรียม stock solution จาก L-α-เลซิตินความบริสุทธิ์ $\geq$ ร้อยละ 94 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ผสมสารละลายเลซิติน 25 กรัมกับน้ำกลั่น 125 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่อง homogenizer ที่อัตราความเร็วรอบ 22,000 rpm/นาที เป็นเวลา 10 นาทีให้เป็นเนื้อเดียวกัน (emulsified) เพื่อให้ได้อิมัลชันเบื้องต้น จากนั้นนำไป sonicate (0.5 cycle 60% Amplitude 400 W 15 นาที) โดย Ultra sonication probe จนกระทั่งสารผสมรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน มีลักษณะเป็นสารละลายใสและไม่แยกชั้นเมื่อทิ้งไว้ 30 นาทีภายหลัง sonication จากนั้นเจือจางสารตั้งต้นให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 0.1-20 โดยน้ำหนัก ปริมาณตัวอย่างละ 10 มิลลิลิตร โดยเตรียมสารละลายแต่ละความเข้มข้นด้วยเครื่อง homogenizer ที่อัตราความเร็วรอบ 22,000 rpm/นาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้สารเป็นเนื้อเดียวกันและไม่แยกชั้น ปิดผนึกภายใต้แก๊สไนโตรเจน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้สารละลายอิ่มตัว จากนั้นนำไปวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension) โดยใช้เครื่องวัดแรงตึงผิว (goniometer) วัดด้วยวิธี pendant drop โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร ดูดสารที่ต้องการวัด แล้วใส่เข็มฉีดยาหัวตัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.483 mm ติดตั้งกระบอกฉีดยานี้บนเครื่องวัดแรงตึงผิวกดก้านลูกสูบโดยควบคุมอัตราเร็วในการกดที่ 4.5 µl /s เพื่อให้ของเหลวหยดออกจากปลายเข็ม บันทึกรูปของหยด $\leq$ 10 หยด ต่อ 1 ครั้ง

ทดลอง 2 ซ้ำทุกตัวอย่าง โปรแกรมคอมพิวเตอร์ของเครื่องคำนวณค่าแรงตึงผิวของของเหลวที่วัดจากรูปทรงของหยดที่บันทึกรูปไว้ แล้วหาค่าเฉลี่ยของแรงตึงผิวของสารละลายเลซิติน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1-20 โดยน้ำหนักสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงตึงผิวของสารละลายอิมัลชันกับความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชัน เพื่อหาค่า CMC ของตัวทำอิมัลชันในตัวทำละลาย

3.2.2.2 การศึกษาหาสัดส่วนที่เหมาะสมของสารละลายเลซิติน และสารสกัดต้านเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับการผลิตไลโพโซมโดยเทคนิคดับเบิ้ลอิมัลชัน

เอนแคปซูเลชันสารสกัดจากธรรมชาติทั้ง 3 ชนิด คือ น้ำมันกานพลู น้ำมันกระเทียม และสารสกัดจากเปลือกทับทิมด้วยเอธานอล โดยเทคนิคดับเบิ้ลอิมัลชัน หรือ $W_1/O/W_2$ ซึ่งดัดแปลงจาก Wang และคณะ (2006) โดยเตรียมสารละลายเลซิตินในเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 99 ให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 12 14 และ 16 โดยน้ำหนัก เตรียมวัฏภาคน้ำมัน (oil phase-O) โดยผสมสารละลายเลซิติน (ที่ความเข้มข้นร้อยละ 12 14 และ 16 โดยน้ำหนัก) กับน้ำมันผสม (ซึ่งประกอบด้วยน้ำมันกานพลูและน้ำมันกระเทียม ในสัดส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก) ให้ได้สัดส่วนโดยน้ำหนักของสารละลายเลซิตินต่อน้ำมันผสมเท่ากับ 1:2 1:4 และ 1:6 ส่วนวัฏภาคน้ำ (water phase- W1) คือสารละลายน้ำของสารสกัดจากเปลือกทับทิมด้วยเอธานอล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 13.3 16.0 และ 17.2 โดยน้ำหนักในขั้นแรกทำอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน (W_1/O) สัดส่วนของวัฏภาคน้ำมันต่อวัฏภาคน้ำเท่ากับ 2:1 ทำให้วัฏภาคน้ำเกิดเป็นอนุภาคกระจายในวัฏภาคน้ำมัน โดยปั่นด้วยเครื่อง homogenizer ที่ความเร็ว 22,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไป sonicate โดยใช้เครื่อง ultrasonic ที่ 60 Hz และ amplitude 400 W เป็นเวลา 30 นาที โดยทำขั้นตอนกระจายน้ำในน้ำมันนี้ 2 รอบ แล้วนำอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมันที่เตรียมได้นี้ไปผสมกับวัฏภาคน้ำ (W_2 ซึ่งในการวิจัยนี้ W_2 เป็นสารละลายเดียวกันกับ W_1) ในสัดส่วน 3:4 จากนั้นนำอัดรีดผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุน 100 นาโนเมตร 3 รอบ ควบคุมอุณหภูมิตลอดการเตรียมอิมัลชันให้ไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส โดยการหล่อด้วยน้ำผสมน้ำแข็ง ในการเตรียมแปรความเข้มข้นของเลซิตินสัดส่วนของสารละลายเลซิตินกับความเข้มข้นของน้ำมันผสม และสารละลายสารสกัดจากเปลือกทับทิมด้วยเอธานอล เพื่อให้ได้สัดส่วนโดยน้ำหนักของสารละลายเลซิตินต่อสารสกัดทั้งสามชนิดรวมกัน (น้ำมันกระเทียม น้ำมันกานพลูและสารสกัดจากเปลือกทับทิมด้วยเอธานอลที่มีปริมาณเท่าๆกัน) เท่ากับ 1:3 1:6 และ 1:9 ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ปริมาณขององค์ประกอบอิมัลชัน ($W_1/O/W_2$)

องค์ประกอบของอิมัลชัน	สัดส่วนโดยน้ำหนักของสารละลายเลซิตินต่อสารต้านจุลินทรีย์ผสม		
	1:3	1:6	1:9
	ปริมาณขององค์ประกอบอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)		
สารละลายเลซิติน	9.43	5.71	4.09
น้ำมันกานพลู	9.43	11.4	12.3
น้ำมันกระเทียม	9.43	11.4	12.3
สารสกัดจากเปลือกทับทิมด้วยเอธานอล	9.43	11.4	12.3
น้ำ	62.3	60.0	59.2

3.2.2.3 การศึกษาความคงตัวของอิมัลชัน

เก็บอิมัลชันที่เตรียมได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการแยกชั้นของอิมัลชันภายหลังการเตรียมเป็นเวลา 7 วัน (Edwards and Baeumner, 2006) จากนั้นเปรียบเทียบการแยกชั้นของอิมัลชัน โดยเทียบกับความสูงทั้งหมด หาค่าสัดส่วนของสารละลายเลซิตินและสารต้านจุลินทรีย์ผสมที่มากที่สุดที่ไม่เกิดการแยกชั้นของสารสกัดและความคงตัวทางกายภาพของไลโพโซม ทดลอง 3 ซ้ำ

วางแผนการทดลองแบบ symmetric factorial CRD ขนาด 3 x 3 ทดลอง 3 ซ้ำ มี 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของเลซิตินและความเข้มข้นสารต้านจุลินทรีย์ผสม วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 13.0 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

3.2.2.4 การประเมินฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของอิมัลชันของสารสกัด โดยวิธี disc diffusion

ขั้นตอนการตรวจสอบเช่นเดียวกับ 3.2.1.2 โดยวัดขนาดของวงใสรอบแผ่น paper disc ที่ชุบอิมัลชันที่ศึกษา (อิมัลชันเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน กรณีเกิดการแยกชั้น เลือกเฉพาะส่วนที่ยังคงเป็นครีมอิมัลชันมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์) และสารละลายเลซิตินที่ความเข้มข้นร้อยละ 12 14 และ 16 โดยน้ำหนักใช้เป็น negative control

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 13.0 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

3.2.3 การศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของเพกตินและแคลเซียมคลอไรด์ พลาสติไซเซอร์ และสารสกัดในรูปไลโพโซมสำหรับการขึ้นรูปเป็นฟิล์มเพกติน

3.2.3.1 การศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของเพกติน และแคลเซียมคลอไรด์สำหรับการขึ้นรูปเป็นฟิล์มเพกติน

ทดลองขึ้นรูปเป็นฟิล์มเพกตินในสัดส่วนที่เหมาะสมของเพกติน และแคลเซียมคลอไรด์ (ดัดแปลงจาก Kang *et al.*, 2005) โดยนำผงเพกตินมาละลายใน deionized water (DI water) (240 ml) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนได้ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 3 3.5 และ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นผสมให้ละลายเป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (ความเข้มข้นร้อยละ 3 5 7 และ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)ที่ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อปริมาตรสารละลายเพกติน 30 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที นำไปไล่ฟองอากาศออก โดย sonicating ด้วยเครื่อง bath sonicate เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำฟองอากาศออก จากนั้น sonicate ต่อ เป็นเวลา 25 นาที สารละลายที่ได้ปรับอุณหภูมิในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปขึ้นรูปฟิล์มบนแผ่น acrylic ใส โดยใช้เครื่องเคลือบฟิล์ม นำแผ่นฟิล์มขึ้นรูปไปอบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกระทั่งฟิล์มแห้ง ลอกแผ่นฟิล์มออกแล้วนำไปเก็บในตู้ควบคุมความชื้น โดยควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 50 ± 5 ด้วยสารละลาย magnesium nitrate อิ่มตัว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปตรวจสอบสมบัติต่างๆต่อไป ในข้อ 3.2.3.2

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

วางแผนการทดลองแบบ symmetric factorial CRD ขนาด 4 x 4 มี 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของเพกตินและแคลเซียมคลอไรด์ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 13.0 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

3.2.3.2 การวิเคราะสมบัติต่าง ๆของฟิล์มเพกติน

ตรวจสอบสมบัติของฟิล์มเพกตินที่ผลิตได้ในขั้นตอน 3.2.3.1 ดังนี้

1.การวัดความหนาของแผ่นฟิล์ม (Film thickness) วัดความหนาของแผ่นฟิล์ม (3 x15 เซนติเมตร) ใช้เครื่อง micrometer วัดแผ่นฟิล์มละเก้าตำแหน่ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.1)

2. วัดค่าความต้านทานแรงดึงและร้อยละการยืดตัวของฟิล์มโดยการใช้เครื่อง Texture Analyzer (ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.2)

3. การทดสอบความสามารถในการซึมผ่านของไอน้ำของแผ่นฟิล์ม (Water Vapor Permeability) โดยทดสอบตามวิธีมาตรฐาน ASTM E 96-95 (1999) (ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.3)

4. การวัดค่าความแตกต่างสี โดยใช้เครื่องวัดสี Minolta Chroma Meter model CR-400 (ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.4)

5. วัดค่าความขุ่นของแผ่นฟิล์ม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.4)

6. ลักษณะโครงสร้างของฟิล์มเพกติน ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.5)

3.2.3.3 การศึกษาผลของชนิดและปริมาณพลาสติไซเซอร์ที่มีต่อสมบัติด้านต่าง ๆของฟิล์มเพกติน

ผลิตฟิล์มจากเพกตินเช่นเดียวกับวิธีการผลิตในข้อ 3.2.3.1 โดยคัดเลือกฟิล์มที่ผลิตได้ในข้อ 3.2.3.1 เลือกฟิล์มที่ใส แข็งแรง มีความยืดหยุ่นไม่ขาดง่าย มีค่าอัตราการซึมผ่านของไอน้ำต่ำ คัดเลือกไว้ 3 สภาวะ ปรับภาวะในการผลิต (ปริมาณเพกตินและแคลเซียมคลอไรด์) เช่นเดียวกับตัวอย่างที่คัดเลือกได้ 3 สภาวะ ใช้พลาสติไซเซอร์ 2 ชนิด คือ ซอร์บิทอล

(SOR) และกลีเซอรอล (GLY) แปรปริมาณพลาสติไซเซอร์ 3 ระดับได้แก่ ร้อยละ 40 50 และ 60 ของน้ำหนักของเพกตินที่ใช้ในการผลิตแผ่นฟิล์ม (Choi and Han, 2001) ผสมกับ film forming solution จากนั้นวิเคราะห์สมบัติต่างๆของฟิล์มเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.2

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 13.0 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

3.2.3.4 การศึกษาผลความเข้มข้นของสารสกัดในรูปไลโพโซมในฟิล์มเพกติน

ผลิตฟิล์มจากเพกตินเช่นเดียวกับวิธีการผลิตในข้อ 3.2.3.1 โดยคัดเลือกฟิล์มที่ผลิตได้ในข้อ 3.2.3.3 เลือกฟิล์มที่ใส แข็งแรง มีความยืดหยุ่นไม่ขาดง่าย มีค่าอัตราการซึม-ผ่านของไอน้ำต่ำ ปรับภาวะในการผลิต (ปริมาณเพกติน แคลเซียมคลอไรด์และชนิดกับปริมาณพลาสติไซเซอร์) เช่นเดียวกับตัวอย่างที่สามารถคัดเลือกได้ จากนั้นแปรความเข้มข้นของไลโพโซมที่ต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ร้อยละ 2 4 และ 6 โดยน้ำหนักใช้ในการผลิตแผ่นฟิล์มโดยผสมกับ film forming solution เป็นเวลา 10 นาที ตามวิธีของ Del Nobile และคณะ (2008) จากนั้นนำไปไล่ฟองอากาศออก แล้วนำไปขึ้นรูปฟิล์ม นำแต่ละตัวอย่างนำไปวิเคราะสมบัติของฟิล์ม เช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.2 และประเมินความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของฟิล์มเพกติน โดยวิธี disc diffusion โดยตัดฟิล์มเพกตินผสมไลโพโซมเป็นวงกลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร แบ่งฟิล์มที่ลอกได้จากแม่พิมพ์เป็นสามส่วน จากนั้นสุ่มส่วนละ 3 แผ่นมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แบบเดียวกับวิธี 3.2.1.2 เปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของฟิล์มเพกตินที่ผสมไลโพโซมกับฟิล์มเพกตินที่ผสมน้ำมันกานพลู ฟิล์มเพกตินที่ผสมน้ำมันกระเทียม และฟิล์มเพกตินที่ผสมสารสกัดจากเปลือกทับทิมด้วยเอธานอล ที่สัดส่วนเดียวกันกับความเข้มข้นของ ไลโพโซม(ร้อยละ 2 4 และ 6 โดยน้ำหนัก)

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 13.0 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's newmultiple range test

3.2.4 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของฟิล์มเพกตินที่มีไลโพโซมห่อหุ้มสารสกัดจากกานพลู กระเทียมและเปลือกทับทิม เมื่อใช้กับเนื้อสัตว์ตัดแต่งระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เลือกแผ่นฟิล์มเพกตินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดจากขั้นตอนที่ 3.2.3.4 มาใช้ร่วมกับเนื้อวัวและเนื้อหมูตัดแต่งจากส่วนของสันนอกของสัตว์ในลักษณะ steak piece ที่มีขนาด 10 x 6 x 1 เซนติเมตร (น้ำหนักประมาณ 60 กรัม) ใช้แผ่นฟิล์มเพกตินหุ้มทั้งด้านบนและล่างของเนื้อตัดแต่ง บรรจุบนถาดโฟมและหุ้มด้วยฟิล์มห่ออาหาร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างมาตรวจสอบคุณภาพทุกๆ 2 วัน ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ เป็นเวลา 16 วัน ตรวจวัด aerobic plate count (APC) lactic acid bacteria *Escherichia coli* coliform และ *Pseudomonas sp.* (ภาคผนวก ข)

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทดลอง 2 ซ้ำ นำผลที่ตรวจสอบได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี t-test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 13.0