บทที่ 3 วัตถุดิบและขั้นตอนการดำเนินงาน

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

วัตถุดิบและสารเคมีที่ใช้ในการคงรูปยางคอมปาวด์ระบบ CV, Semi-EV และ EV แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 วัตถุดิบและสารเคมีที่ใช้ในการคงรูปยางคอมปาวด์

ชื่อสารเคมี	ที่มา	หมายเหตุ
ยางธรรมชาติ	บริษัท พี ไอ อินดัสทรีย์ จำกัด (ประเทศไทย)	ยางเกรดที่มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง จึงเหมาะที่นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ด้านอนามัย
ซิงค์ออกไซด์ (Zinc oxide, ZnO)	บริษัท Thai Lysaght จำกัด (ประเทศไทย)	สารกระตุ้นปฏิกิริยาวัลคาไนซ์ในกระบวนการผลิตยาง
กรดสเตียริก (Stearic acid)	บริษัท อิมพีเรียล อินดัสเตรียล จำกัด (ประเทศไทย)	สารกระตุ้นปฏิกิริยาวัลคาไนซ์ในกระบวนการผลิตยาง
เมอร์แคบโตเบ็นโซไทอาโซล์ (Mercaptobenzothiazole, MBT)	บริษัท Zeon Advanced Polymix จำกัด (ประเทศไทย)	สารเร่งปฏิกิริยาวัลคาไนซ์ในกระบวนการผลิตยาง
ไดฟีนิลกัวนิดีน (Diphenylguanidine, DPG)	บริษัท สยามเมมี จำกัด (มหาชน) (ประเทศไทย)	สารเร่งปฏิกิริยาวัลคาไนซ์ในกระบวนการผลิตยาง
กำมะถัน (Sulphur) ขนาด 325 เมช	บริษัท Zeon Advanced Polymix จำกัด (ประเทศไทย)	สารช่วยในการคงรูปยางในกระบวนการผลิตยาง

3.2 สารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบ

สารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ผสมในยางคอมปาวด์และเชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ แสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อแบคทีเรีย

ชื่อสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	ที่มา	หมายเหตุ
2–hydroxypropyl–3–piperazinyl–quinoline carboxylic acid methacrylate ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก (HPQM, ชื่อทางการค้า Biocleanact™)	บริษัท Micro Science Tech จำกัด (ประเทศเกาหลี)	สารอินทรีย์แบบสารละลายที่ไม่มีความเป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีมาก มีความต้านทานต่อแสงแดด และสารเคมีได้
ซิลเวอร์ตรึงอยู่บนซีโอไลต์ (SSZ, ชื่อทางการค้า IRGAGUARD B 5000)	บริษัท Ciba Specialty Chemicals จำกัด (ประเทศไทย)	สารอนินทรีย์ที่เป็นผงสีขาวใช้ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เกิดจากการนำ ซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) เข้าไปใน ซีโอไลท์ (Zeolite) มีโครงสร้าง 3 มิติของอะมิโนซิลิเกต (Alumino-silicate)
ชื่อเชื้อแบคทีเรีย	**ที่มา**	**หมายเหตุ**
Escherichia coli (*E. coli*) ATCC 25923	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (ประเทศไทย)	แบคทีเรียแกรมลบ
Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ATCC 25922	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (ประเทศไทย)	แบคทีเรียแกรมบวก

3.3 สารเคมีสำหรับทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและสารเคมีทั่วไป

สารเคมีสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของยางคอมปาวด์ที่ผสมสารยับยั้งเชื้อและสารเคมีที่ใช้ทดสอบหาค่าความหนาแน่นของพันธะข้าม แสดงดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 สารเคมีสำหรับทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและสารเคมีทั่วไป

ชื่อสารเคมี	ที่มา	หมายเหตุ
Nutrient broth (NB)	บริษัท Laboratories Britania S.A. (ประเทศอาร์เจนตินา)	อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดเหลว ใช้ในการเตรียมเชื้อแบคทีเรียและทำการทดสอบเชิงคุณภาพ โดยใช้วิธีการทดสอบการเกิดบริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Halo test)
Nutrient agar (NA)	บริษัท Laboratories Britania S.A. (ประเทศอาร์เจนตินา)	อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดแข็งใช้ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดเหลว (NB) ในการทดสอบเชิงคุณภาพ โดยใช้วิธีการทดสอบการเกิดบริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Halo test)
Plate count agar (PCA)	บริษัท Hi Media Laboratories จำกัด (ประเทศอินเดีย)	อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งสำหรับนับโคโลนี ใช้ในการ Spread plate เพื่อนับปริมาณเชื้อที่เกิดขึ้น
เปปโตน (Peptone)	บริษัท Hi Media Laboratories จำกัด (ประเทศอินเดีย)	อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดเหลวใช้ทดสอบเชื้อแบคทีเรียเชิงปริมาณ
โทลูอีน (Toluene)	บริษัท Merck จำกัด (ประเทศไทย)	ตัวทำละลายที่นำมาใช้ในการหาปริมาณความหนาแน่นพันธะข้าม (Crosslink density) โดยคำนวณจากอัตราการบวมตัวของชิ้นงานในสารละลายโทลูอีน

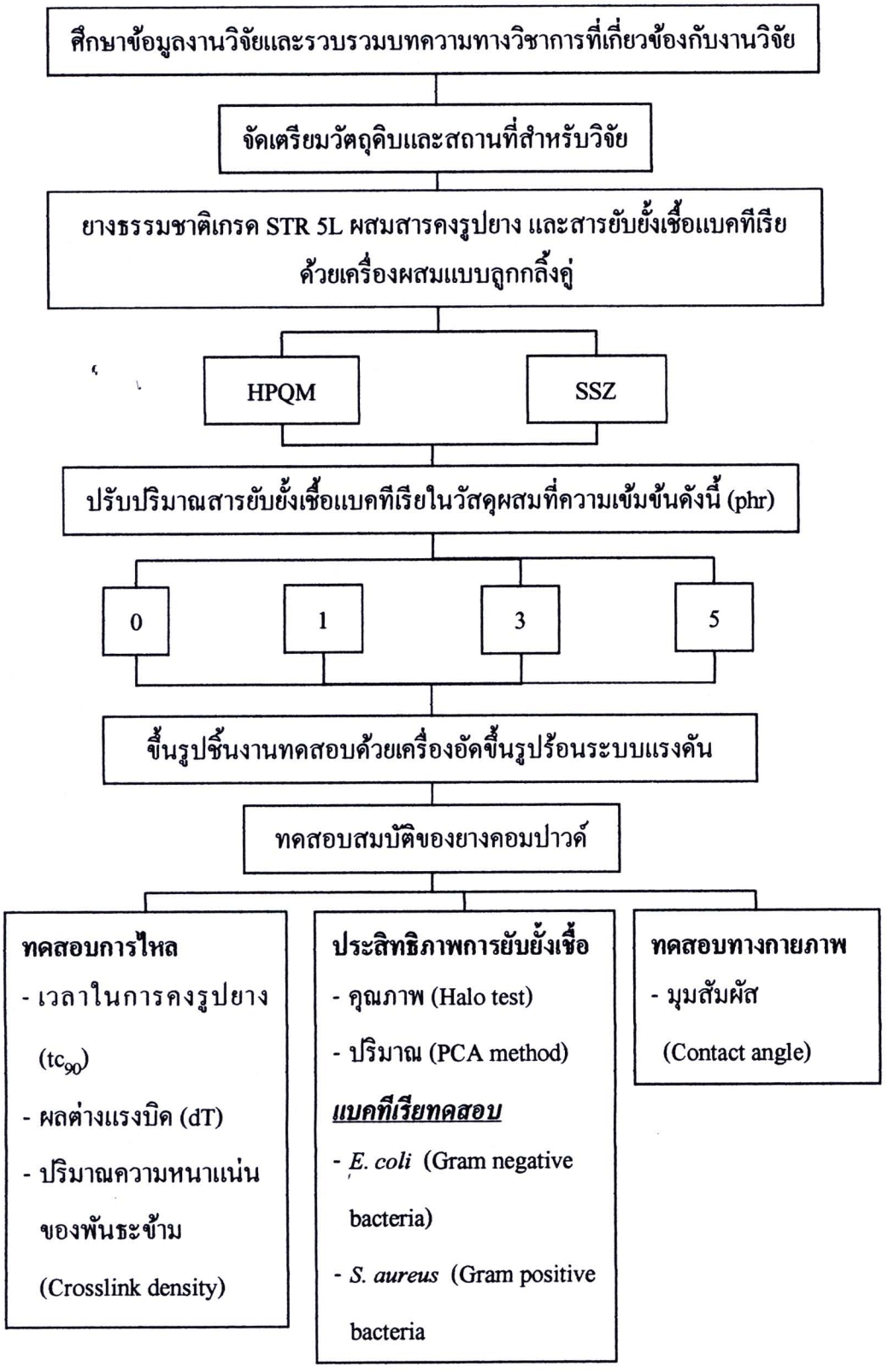
3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับขึ้นรูปและใช้ในห้องปฏิบัติการ

เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการขึ้นรูปชิ้นงานยางคอมปาวด์และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ แสดงดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับขึ้นรูปและใช้ในห้องปฏิบัติการ

ชื่อเครื่องมือ	ที่มา	หมายเหตุ
เครื่องบดผสมลูกกลิ้งคู่ (Two roll mill)	บริษัท ยง ฟง แมชชีนเนอรี จำกัด ประเทศไต้หวัน	-
เครื่องรีโอมิเตอร์แบบจานแกว่ง (Oscillating disk rheometer, ODR)	บริษัท GOTECH Testing Machine ประเทศไต้หวัน	รุ่น GT 70-70-S2
เครื่องอัดขึ้นรูปร้อนระบบแรงดัน (Hot press)	บริษัท LAB TECH จำกัด ประเทศไทย	-
หม้อนึ่งความดันไอน้ำฆ่าเชื้ออัตโนมัติ (Autoclave)	บริษัท Vision Scientific Co., Ltd. ประเทศเกาหลี	รุ่น VS-1321-60
ตู้อบอากาศร้อน (Hot air oven)	บริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี	รุ่น ULE 500
ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)	บริษัท SANYO E&E Europe BV, Biomedical Division ประเทศสหราชอาณาจักร	รุ่น MIR-153
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	บริษัท Hach Co., Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา	รุ่น DR/4000U (วัดค่า OD_{600})
	บริษัท Shimadzu Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น	รุ่น UV 3100 (พิสูจน์การแพร่ของสารเคมี)
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)	บริษัท Jeil Scientific Ind. Co., Ltd. ประเทศเกาหลี	รุ่น J-SIL
ออโตไมโครปิเปตต์ (Auto micro pipette)	บริษัท Transferpette® ประเทศเยอรมนี	ขนาด 20-200 µl 100-1000 µl และ 0.5-5 ml
เครื่องชั่ง (Balances)	บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์	รุ่น PB 4002-S
เครื่องวัดมุมสัมผัส (Contact angle)	บริษัท rame-hart instrument Co., Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา	รุ่น 100-00

3.5 การดำเนินงานวิจัย



รูปที่ 3.1 ผังการดำเนินงานวิจัยโดยรวม

3.6 การขึ้นรูปชิ้นงานทดสอบ

ผสมยางคอมปาวด์ที่คงรูปด้วยซัลเฟอร์ 3 ระบบ คือ ระบบ CV, Semi-EV และ EV ด้วยเครื่องผสมแบบลูกกลิ้งคู่และขึ้นรูปชิ้นงานทดสอบด้วยเครื่องอัดขึ้นรูปร้อนระบบแรงดันโดยในงานวิจัยมีการใช้สารเคมีของแต่ละระบบสูตรยาง แสดงดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบของสารประกอบยาง

Components	Content of chemical in rubber (phr)		
	CV	Semi-EV	EV
Natural rubber, STR 5L	100 part		
Zinc oxide, ZnO	5.0		
Stearic acid	2.0		
Mercaptobenzothiazole, MBT	0.5	1.5	2.5
Diphenyl guanidine, DPG	0.2	0.6	1.0
Sulphur	3.0	1.2	0.2
HPQM or SSZ	Varying 0 / 1 / 3 / 5		

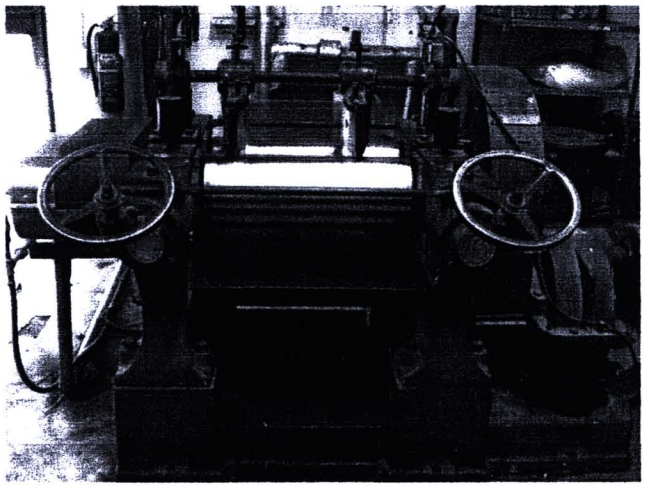
3.6.1 ขั้นตอนการเตรียมยางคอมปาวด์ด้วยเครื่องผสมแบบลูกกลิ้งคู่และขึ้นรูปยาง

การเตรียมยางคอมปาวด์โดยใช้เครื่องบดผสมลูกกลิ้งคู่ (Two roll mill) ดังรูปที่ 3.2 ตามส่วนประกอบของสารประกอบยางแสดงในตารางที่ 3.5 โดยใช้เวลาในการผสมสารประกอบยางที่ 30 นาที อุณหภูมิในการผสมที่ 40-45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ไม่เกินร้อยละ 50 โดยมีขั้นตอนการผสมดังต่อไปนี้

1) นำยางธรรมชาติ STR 5L บดผสม (Mastication) ในเครื่องบดผสมลูกกลิ้งคู่เป็นเวลา 5 นาที
2) ผสมสารกระตุ้นปฏิกิริยาชนิดซิงค์ออกไซด์ (Zinc oxide, ZnO) เป็นเวลา 5 นาที
3) ผสมสารกระตุ้นปฏิกิริยาชนิดกรดสเตียริค (Stearic acid) เป็นเวลา 5 นาที
4) ผสมสารเร่งการกระตุ้นปฏิกิริยาชนิดเมอร์แคบโตเบ็นโซไทอาโซล์ (Mercaptobenzothiazole, MBT) เป็นเวลา 5 นาที
5) ผสมสารเร่งการกระตุ้นปฏิกิริยาชนิดไดฟีนิลกัวนิดีน (Diphenylguanidine, DPG) เป็นเวลา 5 นาที

6) ผสมสารคงรูปยางชนิดกำมะถัน (Sulphur) เป็นเวลา 5 นาที

7) ผสมสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด HPQM หรือ SSZ เป็นเวลา 5 นาที



รูปที่ 3.2 เครื่องบดผสมลูกกลิ้งคู่

นำสารประกอบยางคอมปาวด์ไปขึ้นรูปเป็นแผ่นชิ้นงานทดสอบที่ความหนา 1 มิลลิเมตรด้วยเครื่องอัดขึ้นรูปร้อนระบบแรงดัน (Hot press) ดังรูปที่ 3.3 อุณหภูมิการขึ้นรูป 160 องศาเซลเซียส แรงดันปิดแม่พิมพ์ 180 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

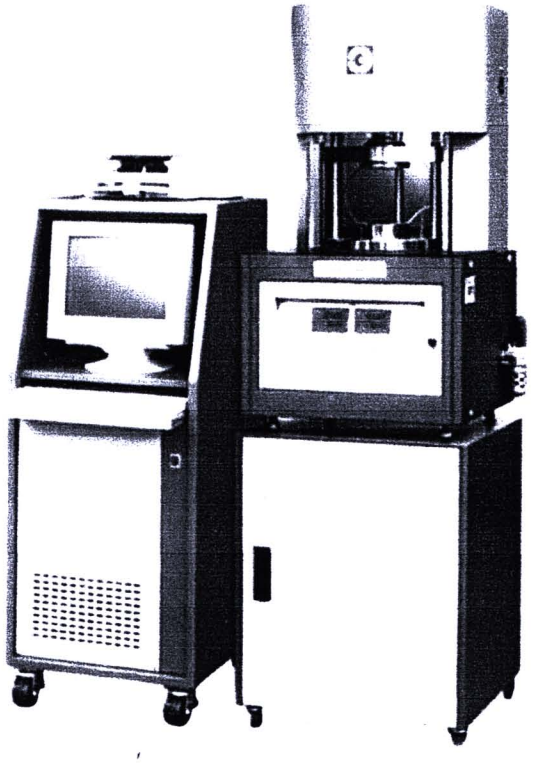
รูปที่ 3.3 เครื่องอัดขึ้นรูปร้อนระบบแรงดัน

3.7 การทดสอบเวลาในการคงรูปยางและความหนาแน่นของพันธะข้าม

การทดสอบเวลาในการคงรูปยางคอมปาวด์ถูกตรวจสอบด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์แบบจานแกว่ง ผลการทดสอบที่ได้เป็นเวลาในการคงรูปยางที่ร้อยละ 90 และผลต่างของแรงบิด ส่วนการตรวจสอบหาค่าความหนาแน่นของพันธะข้ามใช้วิธีการบวมตัวในสารละลายโทลูอีน แสดงรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.7.1 การตรวจสอบเวลาและผลต่างแรงบิดในการคงรูปยางคอมปาวด์

การตรวจสอบเวลาในการคงรูปของยางคอมปาวด์ทั้ง 3 ระบบ ด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์แบบจานแกว่ง (Oscillating disk rheometer, ODR) ดังรูปที่ 3.4 ใช้ในการทดสอบเวลาในการคงรูปของยางที่ร้อยละ 90 (tc_{90}) และความหนืดของยางขณะขึ้นรูป โดยสังเกตจาก ค่าผลต่างแรงบิด (Delta torque, dT) ตามมาตรฐาน ASTM D2084-01 ที่อุณหภูมิทดสอบ 160 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3.4 เครื่องรีโอมิเตอร์แบบจานแกว่ง

3.7.2 การทดสอบความหนาแน่นของพันธะข้าม (Crosslink density)

เตรียมชิ้นงานยางให้ได้ขนาด 2×2 ตารางเซนติเมตร สำหรับใช้ทดสอบความหนาแน่นของพันธะข้าม (Crosslink density) เริ่มจากนำชิ้นงานที่เตรียมได้ แช่ในสารละลายโทลูอีนเป็นเวลา 7 วัน โดยบันทึกผลน้ำหนักชิ้นงานก่อนและหลังแช่ในสารละลายโทลูอีนเพื่อนำมาคำนวณในสมการ Flory–Rehner [35] ดังแสดงในสมการ 3.1

$$-ln(1-V_r)-V_r-\chi V_r^2=2V_s\eta_{swell}(V_r^{1/3}-\frac{2V_r}{f}) \qquad \text{สมการที่ 3.1}$$

โดย V_r = สัดส่วนโดยปริมาตรของยางในยางที่บวมตัว

V_s = ปริมาตรต่อโมลของตัวทำละลาย (Molar volume) หรือปริมาตรตัวทำละลาย 1 โมล (ในการทดลองนี้มีค่า 106.2 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อโมล)

χ = ค่าพารามิเตอร์ของแรงที่กระทำกันระหว่างยางกับสารละลาย (งานวิจัยนี้มีค่าเท่ากับ 0.3795)

η_{swell} = ปริมาณ Crosslink density ของยาง (โมลต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)

f = ฟังก์ชันของ Crosslinks (ระบบการคงรูปด้วยซัลเฟอร์มีค่าเท่ากับ 4)

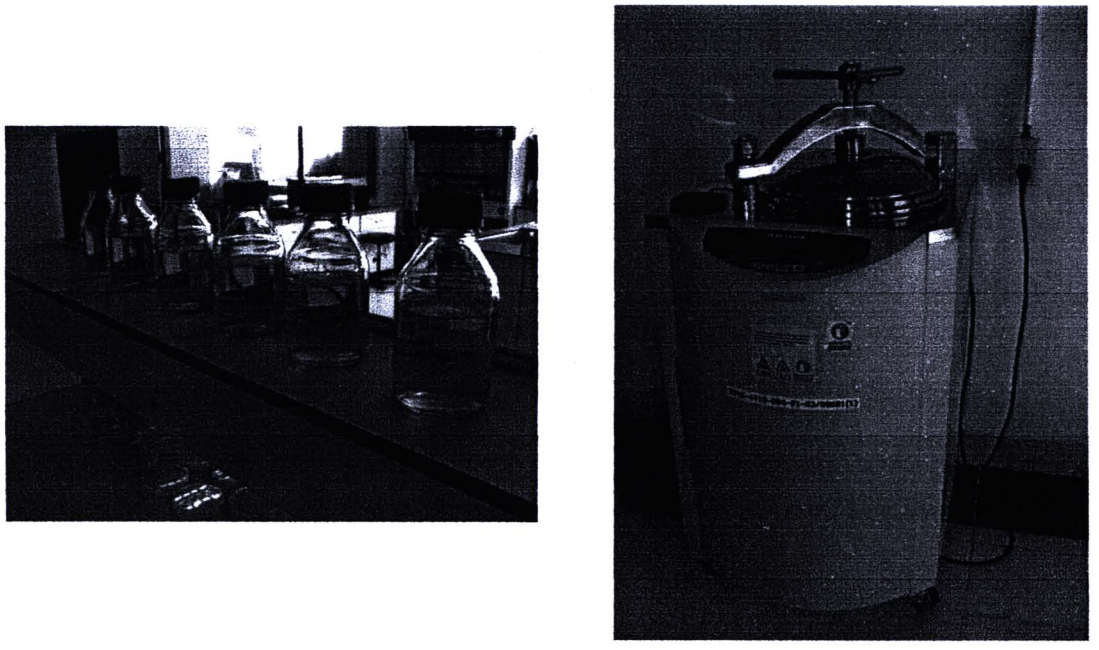
3.8 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียถูกแบ่งออกเป็น กระบวนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดสอบ การทดสอบบริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และการทดสอบเชิงปริมาณโดยใช้วิธีการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย แสดงดังต่อไปนี้

3.8.1 กระบวนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย:

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งสำหรับนับโคโลนี (PCA) โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งสำหรับนับโคโลนีปริมาณ 9.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันในขวดแก้วสำหรับบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังรูปที่ 3.5 (a)
2) นำจานเพาะเชื้อ (Petri dish) ใส่ถุงพลาสติกและสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นไปกำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำฆ่าเชื้ออัตโนมัติดังรูปที่ 3.5 (b) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยแก้วที่บรรจุสารละลายต้องทำการคลายเกลียวที่

ฝาให้หลวมเล็กน้อย (เพื่อกันการระเบิดของขวดแล้วที่บรรจุสารละลายไว้ ในขณะที่อยู่ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำฆ่าเชื้ออัตโนมัติ)

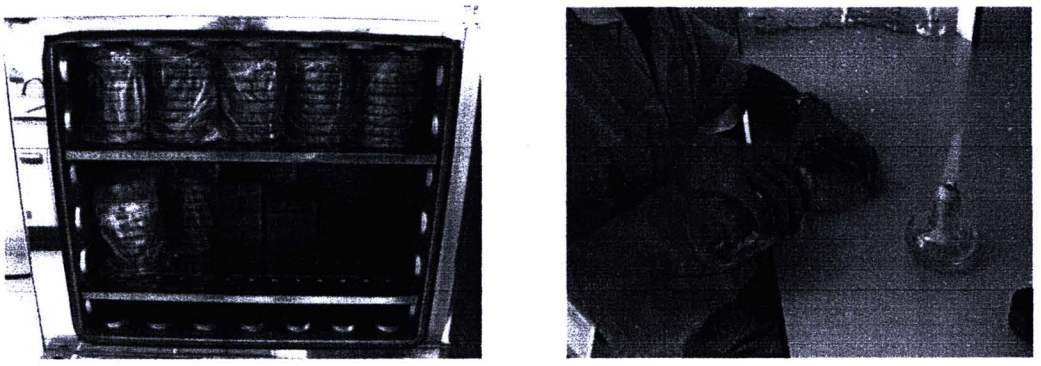


(a) (b)

รูปที่ 3.5 ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
(a) อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งสำหรับนับโคโลนี (PCA)
(b) หม้อนึ่งความดันไอน้ำฆ่าเชื้ออัตโนมัติ

3) หลังจากการอบฆ่าเชื้อเสร็จสิ้น นำจานเพาะเชื้อและขวดแก้วที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งสำหรับนับโคโลนีออกมาจากเครื่องอบฆ่าเชื้ออัตโนมัติ โดยนำจานเพาะเชื้อที่เปิดปากถุงใส่เข้าตู้อบอากาศร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 3.6 (a) เพื่อไล่ไอน้ำในจานเพาะเชื้อออก และนำขวดแก้วที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งสำหรับนับโคโลนีออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 60 องศาเซลเซียส
4) ก่อนที่อุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งสำหรับนับโคโลนีลดลงเหลือประมาณ 60 องศาเซลเซียส ให้นำจานเพาะเชื้อที่อบไล่ไอน้ำออกจากตู้อบอากาศร้อนมาวางไว้ ณ อุณหภูมิห้องเพื่อให้อุณหภูมิลดลง โดยโต๊ะที่วางจานเพาะเชื้อนั้นต้องเช็ดทำความสะอาดและฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 โดยปริมาตร

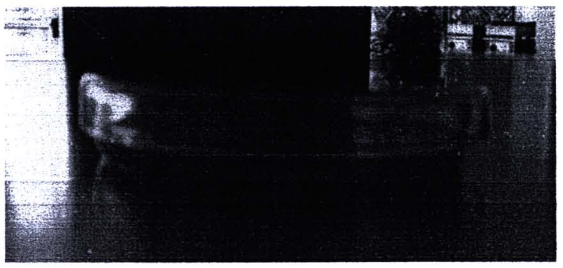
5) นำสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งสำหรับนับโคโลนีที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทลงบนจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยปริมาณสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งสำหรับนับโคโลนีที่ใช้ประมาณ 3 ใน 4 ส่วน ของจานเพาะเชื้อดังรูปที่ 3.6 (b) จากนั้นปิดฝาจานเพาะเชื้อ แล้วแกว่งเบาๆให้สารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อแพร่เต็มจานเพาะเชื้อ



(a) (b)

รูปที่ 3.6 ขั้นตอนการอบไล่ไอน้ำและเทอาหารเลี้ยงเชื้อ
(a) อบไล่ไอน้ำออกจากจานเพาะเชื้อด้วยตู้อบอากาศร้อน
(b) เทอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งสำหรับนำโคโลนีลงบนจานเพาะเชื้อ

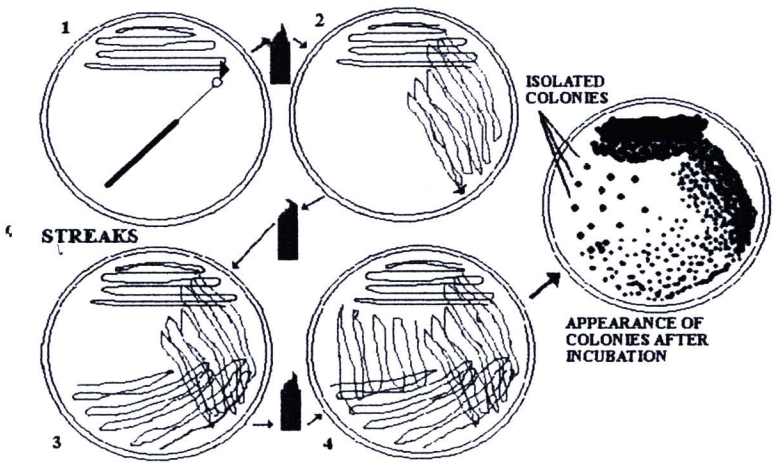
6) รอจนสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งสำหรับนับโคโลนีแข็งเป็นวุ้น ใช้เวลาประมาณ 15-20 นาที ดังรูปที่ 3.7 จากนั้นคว่ำจานเพาะเชื้อเพื่อป้องกันไอน้ำที่กลั่นตัวหยดลงบนวุ้นเลี้ยงเชื้อ ป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นในอากาศได้



รูปที่ 3.7 อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่เทบนจานเพาะเชื้อ

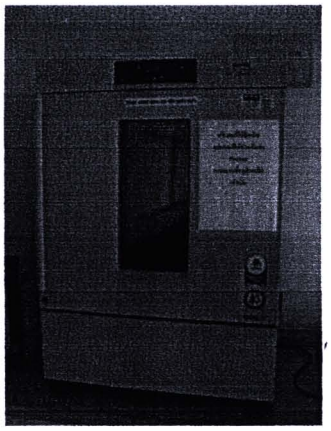
3.8.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดสอบ

1) นำเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ใน Stock ออกมา จากนั้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop) เผาฆ่าเชื้อแล้วปล่อยให้เย็น เขี่ยเชื้อแบคทีเรียจาก Stock มากระจายบนผิวหน้าของจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งสำหรับนับโคโลนี (Cross streak) ดังรูปที่ 3.8

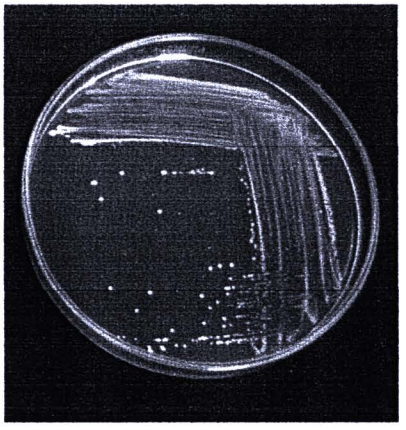


รูปที่ 3.8 การกระจายเชื้อแบคทีเรียเป็น Single colony [36]

2) นำจานเพาะเชื้อที่เขี่ยกระจายเชื้อเรียบร้อยแล้ว เข้าตู้บ่มเพาะเชื้อ ดังรูปที่ 3.9 เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



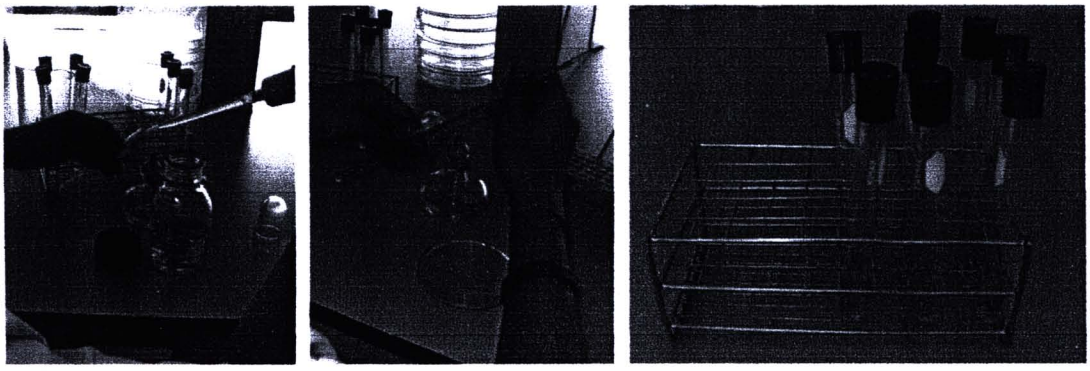
(a)



(b)

รูปที่ 3.9 ขั้นตอนการบ่มเชื้อ (a) ตู้บ่มเพาะเชื้อ
(b) เชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการบ่มเพาะบนจานเพาะเชื้อ

3) การเตรียมเชื้อให้อยู่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (NB) ดังรูปที่ 3.10 เตรียมโดยใช้ออโตไมโครปิเปตดูดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อเช่นเดียวกัน จากนั้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่เผาฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อที่เป็น Single colony ประมาณ 1-2 โคโลนี จากจานเพาะเชื้อ ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวอยู่



(a) (b) (c)

รูปที่ 3.10 ขั้นตอนการเตรียมเชื้อในหลอดทดลอง (a) ออโตไมโครปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (b) เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการลงในหลอดทดลอง (c) หลอดทดลองที่มีเชื้อในอาหารเหลว

4) นำหลอดทดลองที่ใส่เชื้อแบคทีเรียเข้าตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.8.3 การทดสอบบริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค Halo test

การทดสอบบริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียนั้นเป็นการทดสอบเชิงคุณภาพ [26] มีขั้นตอนทดสอบดังนี้

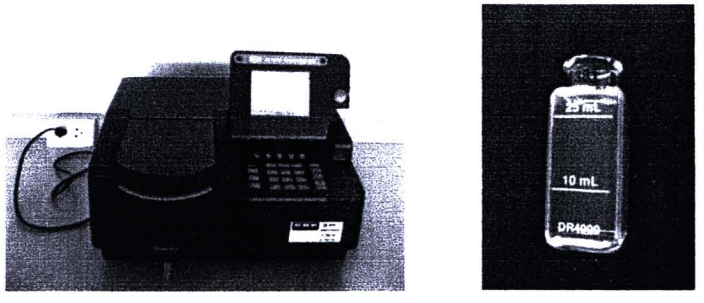
1) เตรียมอุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบบริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียนั้นเข้าหม้อนึ่งความดันไอน้ำฆ่าเชื้ออัตโนมัติ ดังนี้ จานเพาะเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (PCA) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (NA) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (NB) ปิเปตต์ทิป (Pipette tip) หลอดทดลอง เป็นต้น
2) นำอุปกรณ์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วเข้าตู้อบอากาศร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส (การใช้อุปกรณ์ในสภาวะที่อุณหภูมิห้อง เพื่อป้องกันเชื้อทดสอบตาย)

3) นำอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งสำหรับนับโคโลนี (PCA) เทลงบนจานเพาะเชื้อ รอทิ้งให้แข็งเป็นวุ้น แล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ
4) เตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดลองในอาหารเหลว โดยบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และเตรียมชิ้นงานเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
5) นำเชื้อที่เตรียมทดสอบ มาวัดค่าดัชนีความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเป็นตัวปรับค่า (Set zero)
6) ทำการผสมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในหลอดทดลองที่อัตราส่วน 1:1 เพื่อให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งแข็ง (Soft agar)
7) ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งแข็งกับเชื้อแบคทีเรีย ให้ได้ค่าดัชนีความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ดังรูป 3.11 โดยใช้สมการที่ 3.2

$$C_1V_1 = C_2V_2 \qquad \textbf{สมการที่ 3.2}$$

เมื่อ C_1 และ C_2 คือ ค่าดัชนีความขุ่นที่วัดได้จากเชื้อที่ได้เตรียมไว้ และค่าดัชนีความขุ่นที่ใช้ทดสอบ ตามลำดับ (โดยในการทดลองกำหนดที่ 0.1)

V_1 และ V_2 คือ ปริมาตรของเชื้อที่เตรียมไว้ และปริมาตรของเชื้อที่ต้องการใช้ในการทดสอบ



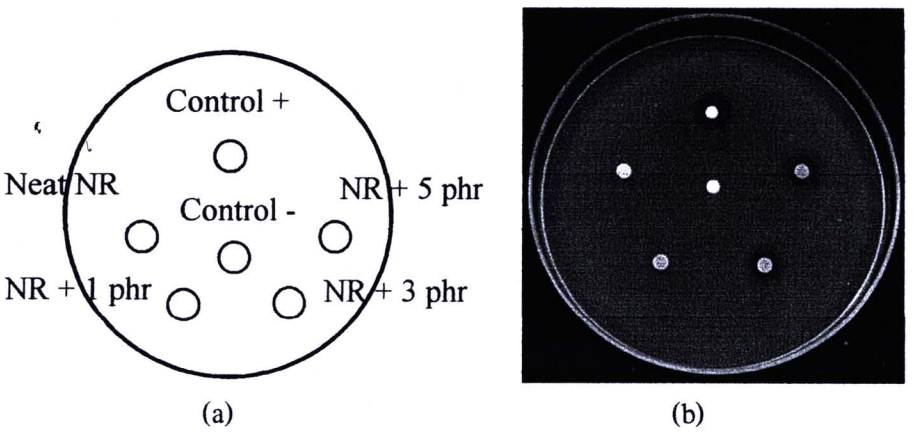
(a) (b)

รูปที่ 3.11 เครื่องวัดดัชนีความขุ่นของเชื้อทดสอบ
(a) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (b) ขวดไวออล

8) เทอาหารเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งแข็งที่ผสมเชื้อแบคทีเรียลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งสำหรับนับโคโลนี

9) วางกระดาษกรองเป็นตัวควบคุมแบบลบ (Control -) กระดาษกรองที่ชุบสารคอปเปอร์ซัลเฟต 1 โมลาร์ เป็นตัวควบคุมแบบบวก (Control +) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 3.12 เพื่อดูลักษณะชิ้นงานที่ไม่เกิดบริเวณการยับยั้งเชื้อและลักษณะการเกิดบริเวณการยับยั้งเชื้อ และวางชิ้นงานทดสอบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร บนจานเพาะเชื้อแล้วนำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

10) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเชื้อที่เกิดขึ้น



รูปที่ 3.12 ตำแหน่งการวางชิ้นงานทดสอบ (a) ลักษณะตำแหน่งการวางชิ้นงานยางคอมปาวด์ผสมสารยับยั้งเชื้อ (b) การวางชิ้นงานยางคอมปาวด์สำหรับทดสอบบริเวณการยับยั้งเชื้อ

3.8.4 การทดสอบเชิงปริมาณโดยใช้วิธีการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (Plate count agar method)

การทดสอบเชิงปริมาณโดยใช้วิธีนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียตามวิธีทดสอบมาตรฐาน ASTM E2149-01 โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

1) เตรียมอุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบบริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียนั้นเข้าหม้อนึ่งความดันไอน้ำฆ่าเชื้ออัตโนมัติดังนี้ จานเพาะเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (PCA) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (NB) น้ำกลั่น เปปโตน (Peptone) ปิเปตต์ทิป (Pipette tip) หลอดทดลอง ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดฝาด้วยฟอยล์ หลอดเก็บตัวอย่าง (Eppendrof) เป็นต้น

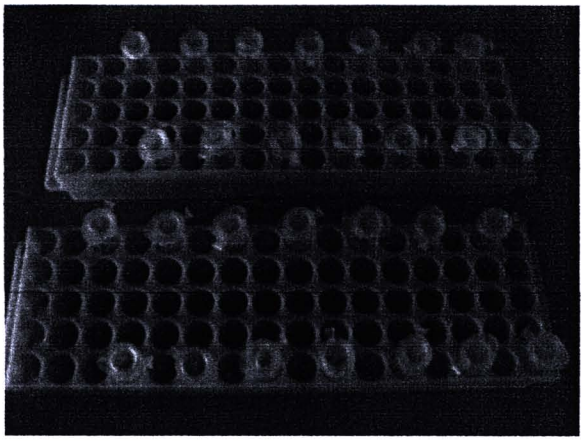
2) นำอุปกรณ์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วเข้าตู้อบอากาศร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส (การใช้อุปกรณ์ ในสภาวะที่อุณหภูมิห้อง เพื่อป้องกันเชื้อทดสอบตาย)

3) นำอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งสำหรับนับโคโลนี (PCA) เทลงบนจานเพาะเชื้อ รอทิ้งไว้ให้แข็งเป็นวุ้น แล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ
4) เตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดลองในอาหารเหลว โดยบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และเตรียมชิ้นงานทดสอบทดสอบขนาด 5×5 ตารางเซนติเมตร
5) นำเชื้อที่เตรียมไว้สำหรับทดสอบมาวัดหาค่าดัชนีความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเป็นตัวปรับค่าให้เป็นศูนย์
6) ผสมเปปโตนกับเชื้อแบคทีเรีย ให้ได้ค่าดัชนีความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.1 โดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$ (ปริมาตรสุทธิที่ใช้ทดสอบอยู่ที่ 50 มิลลิลิตร) ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
7) ใส่ชิ้นงานทดสอบ ปิดฝาด้วยฟอยล์ แล้วนำขวดรูปชมพู่ที่มีชิ้นงานมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ดังรูปที่ 3.13 เขย่าที่ 100 รอบต่อนาที (rpm) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามเวลาที่กำหนดไว้ (30 60 120 180 และ 240 นาที)

รูปที่ 3.13 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ

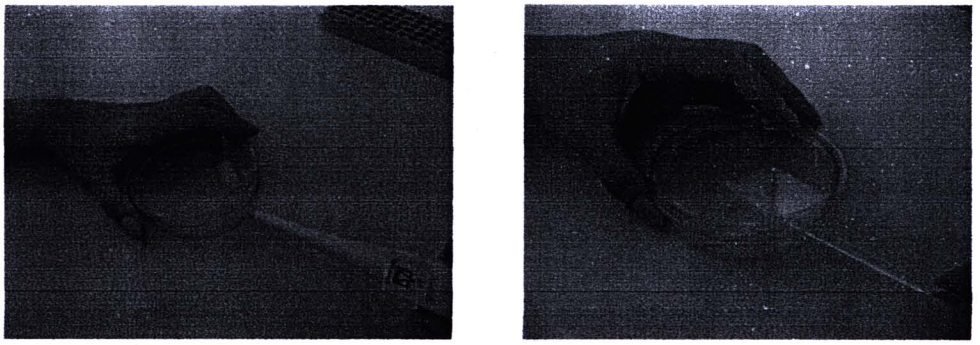
8) เมื่อถึงเวลาที่กำหนดไว้ นำสารละลายตัวอย่างออกมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างหลอดที่ 1 จากนั้นทำการเจือจางความเข้มข้นของเชื้อให้ลดลง ซึ่งใช้เทคนิคเจือจางเชื้อให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่า (Ten – fold serial dilution) โดยการดูดสารละลายตัวอย่างจาก

หลอดเก็บตัวอย่างหลอดที่ 1 มา 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างหลอดที่ 2 ที่มีเปปโตนที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 900 ไมโครลิตร (ทำการเจือจางเชื้อลง จนกระทั่งเชื้อมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) ดังรูปที่ 3.14



รูปที่ 3.14 หลอดเก็บตัวอย่าง (Eppendrof) สำหรับใช้เจือจางเชื้อ

9) นำเชื้อที่ถูกเจือจางมาเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งสำหรับนับโคโลนี โดยดูดสารละลายในหลอดเก็บตัวอย่างแต่ละหลอดปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาหยดลงบนจานเพาะเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วงอ (Spreader glass) เกลี่ยเชื้อให้ทั่วจานเพาะเชื้อ แล้วนำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ดังรูปที่ 3.15



(a) (b)

รูปที่ 3.15 ขั้นตอนการลงเชื้อทดสอบ (a) หยดเชื้อที่ผ่านการเจือจางลงบนจานเพาะเชื้อ (b) เกลี่ยเชื้อให้ทั่วจานเพาะเชื้อโดยใช้แท่งแก้วงอ (Spreader glass)

10) นับจำนวนเชื้อที่อยู่บนจานเพาะเชื้อระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจาน แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณปริมาณเชื้อดังสมการที่ 3.3 [26] และคำนวณเป็นร้อยละการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรีย ณ เวลาที่ทดสอบ

การคำนวณปริมาณเชื้อแบคทีเรียหลังการทดสอบดังสมการต่อไปนี้

$$cfu/ml = \frac{A}{(10^{-n} \times B)} \qquad \textbf{สมการที่ 3.3}$$

โดยที่ cfu/ml คือ กลุ่มแบคทีเรีย (Colony forming unit, cfu) ต่อมิลลิลิตร

A คือ จำนวนกลุ่มแบคทีเรียโดยเฉลี่ย (Colony)

n คือ จำนวนครั้งการเจือจาง

B คือ ปริมาตรสารละลายแบคทีเรีย (กำหนดที่ปริมาตร 100 ไมโครลิตร)

ตัวอย่างการคำนวณร้อยละการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรีย ณ เวลาที่ทดสอบ

ปริมาณเชื้อ กรณีไม่มีชิ้นงาน 30×10^{7} cfu/ml คิดเป็นร้อยละ 100

ปริมาณเชื้อ กรณีที่มีชิ้นงานทดสอบ 110×10^{4} cfu/ml คิดเป็นร้อยละ $\frac{110\times10^{4}\times100}{30\times10^{7}}$

= ร้อยละ 0.366

3.9 การทดสอบการแพร่ออกมาของสารเคมีและสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบการแพร่ออกมาของสารเคมีที่ใช้คงรูปยางคอมปาวด์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

การทดสอบการแพร่ออกมาของสารเคมีที่ใช้คงรูปยางคอมปาวด์ ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ของบริษัท Shimadzu Co., Ltd. มีวิธีการดังนี้

1. นำชิ้นงานยางคอมปาวด์แช่น้ำ DI เป็นเวลา 240 นาที จากนั้นนำน้ำ DI ที่แช่ยางคอมปาวด์ ไปวัดช่วงการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ช่วงความยาวคลื่น 400-200 นาโนเมตร
2. นำสารเคมีที่ใช้คงรูปยางคอมปาวด์ละลายด้วยน้ำ DI จากนั้นเข้าวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer

3. นำผลการดูดกลืนแสงของน้ำ DI ที่ผ่านการแช่ด้วยชิ้นงานยางคอมปาวด์ มาวิเคราะห์เทียบกับช่วงการดูดกลืนแสงของน้ำ DI ผสมสารเคมีที่ใช้คงรูปยางคอมปาวด์แต่ละชนิดแต่เพียงอย่างเดียว

การทดสอบการแพร่สารสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียออกมาที่ผิวชิ้นงานยางคอมปาวด์ผสมสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีวัดค่ามุมสัมผัส

การทดสอบการแพร่สารยับยั้งเชื้อขึ้นมาที่ผิวชิ้นงานยางคอมปาวด์ ซึ่งเป็นการประยุกต์ใช้การวัดค่ามุมสัมผัสของชิ้นงานที่เปลี่ยนแปลงโดยมีวิธีการดังนี้

1. หยดน้ำปราศจากไอออน (Deionized water, DI water) 1 หยด (ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร) ลงบนชิ้นงานยาง
2. วัดมุมสัมผัสของน้ำกับผิวชิ้นงานยาง (Contact angle) ด้วยโปรแกรม DROPimage Standard
3. หยดน้ำ DI เพิ่มอีก 1 หยด แล้ววัดมุมสัมผัส ทำจนครบ 5 ค่า แล้วหาค่าเฉลี่ย