

การทดสอบประสิทธิภาพของสารกันเสียในโลชั่นกันยุง

THE USE OF THE CHALLENGE TEST TO ANALYZE
THE PRESERVATIVE EFFICIENCY IN
MOSQUITO REPELLENT LOTION

ชัยวัฒน์ เตชปิติกุล
นันทกาล ทิพวรรณ

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การทดสอบประสิทธิภาพของสารกันเสียในโลชั่นกันยุง

THE USE OF THE CHALLENGE TEST TO ANALYZE
THE PRESERVATIVE EFFICIENCY IN
MOSQUITO REPELLENT LOTION

ชัยวัฒน์ เตชปีติกุล
นันทกาล ทิพวรรณ

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

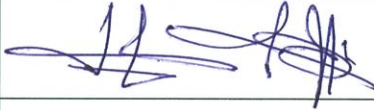


THE USE OF THE CHALLENGE TEST TO ANALYZE
THE PRESERVATIVE EFFICIENCY IN
MOSQUITO REPELLENT LOTION

CHAIWAT TACHAPEETIKUL
NANTHAKARN TIPPAWAN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงการพิเศษ	การตรวจสอบประสิทธิภาพของสารกันเสียในโลชั่นกันยุง The use of the challenge test to analyze the preservative efficiency in mosquito repellent lotion
ชื่อนักศึกษา	นายชัยวัฒน์ เตชปีติกุล รหัสนักศึกษา 57050818 นางสาวนันทกาล ทิพวรรณ รหัสนักศึกษา 57050840
ปริญญา ภาควิชา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์ กรรมการ	
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การตรวจสอบประสิทธิภาพของสารกันเสียในโลชั่นกันยุง		
ชื่อนักศึกษา	นายชัยวัฒน์	เดชปีติกุล	รหัสนักศึกษา 57050818
	นางสาวนันทกาล	ทิพวรรณ	รหัสนักศึกษา 57050840
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ปีการศึกษา	2560		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี		

บทคัดย่อ

ในกระบวนการผลิตเครื่องสำอางหรือผลิตภัณฑ์บำรุงผิว อาจเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ขึ้น การเติมสารกันเสียจึงเป็นอีกหนึ่งวิธีที่สามารถต้านทานการเจริญของเชื้อที่ปนเปื้อนเหล่านี้ได้ โดยน้ำมันหอมระเหยได้ถูกนำมาใช้ในการต้านทานการเจริญของจุลินทรีย์แทนการใช้สารกันเสีย ในการศึกษาโลชั่น 4 ชนิดได้มีการเตรียมขึ้นโดยใช้สารกันเสียที่แตกต่างกัน โลชั่นสูตรที่ 1 คือ โลชั่นที่ไม่มีการเติมสารกันเสียและน้ำมันหอมระเหย โลชั่นสูตรที่ 2 คือ โลชั่นที่มีการเติมสารกันเสีย Phenoxyethanol และ Ethylhexylglycerin 0.4% โลชั่นสูตรที่ 3 คือ โลชั่นที่เติมน้ำมันหอมระเหย 5% ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยชิงผสม โลชั่นสูตรที่ 4 คือ โลชั่นที่เติมสารกันเสีย 0.4% และน้ำมันหอมระเหย 5% การทดสอบประสิทธิภาพของสารกันเสียในโลชั่นนั้นใช้จุลินทรีย์ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าในโลชั่นสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 นั้นมีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในทุกกระยะของการทดสอบ แต่ในโลชั่นสูตรที่ 3 และ 4 นั้นไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เมื่อครบกำหนด 28 วัน ซึ่งน้ำมันหอมระเหยชิงผสมนั้นได้ถูกนำมาทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) และความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MBC) ผลการทดสอบพบว่าค่า MIC และค่า MBC ของ *Candida albicans* คือ 0.15 mg/ml ในส่วนของ *Staphylococcus aureus* ค่า MIC คือ 0.63 mg/ml และค่า MBC คือ 1.25 mg/ml *Pseudomonas aeruginosa* ค่า MIC คือ 2.50 mg/ml และค่า MBC คือ 5.00 mg/ml แต่ใน *Escherichia coli* ไม่สามารถระบุค่า MIC และค่า MBC ได้ เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยชิงผสมนั้นไม่เหมาะสมสำหรับการทดสอบนี้

คำสำคัญ : การทดสอบประสิทธิภาพของสารกันเสีย, โลชั่นกันยุง, การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

Title	The use of the challenge to analyze the preservative efficiency in mosquito repellent lotion	
Students	Mr. Chaiwat Tachapeetikul	Student ID 57050818
	Miss Nanthakarn Tippawan	Student ID 57050840
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)	
Department	Biology	
Faculty	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2017	
Advisor	Assist. Prof. Dr. Pana Lohasupthawee	

Abstract

In the process of producing cosmetics or skin care products contamination may occur. The addition of preservatives is another way that can resist the growth of microbial contamination. The essential oils have been used to resist the growth of microorganisms instead of preservatives. In this study, four lotions were prepared with different preservative systems. Lotion formula No.1 is a lotion without added preservative and essential oil. Lotion formula No.2 is a lotion with 0.4% of Phenoxyethanol and Ethylhexylglycerine. Lotion formula No.3 is a lotion with 5% ginger essential oil mixed. Lotion formula No.4 is a lotion with 0.4% preservative and 5% ginger essential oil mixed. The challenge test used 4 microorganisms including *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* to challenge the lotion products. The result showed that the growth of microorganisms at every stage of challenge test in the lotion formula No.1 and No.2, but in the lotion formula No.3 and No.4 showed no growth of all microorganisms at 28-day challenge period. Ginger essential oil mixed were test for minimum inhibitory concentration(MIC) and minimum bactericidal concentration(MBC). The results showed that MIC and MBC of *C. albicans* were 0.15 mg/mL. In *S. aureus*, MIC was 0.63 mg/mL and MBC was 1.25 mg/mL. In *P. aeruginosa*, the MIC was 2.50 mg/mL and the MBC was 5.00 mg/mL. In *E. coli*, we could not find MIC and MBC because the concentration of ginger essential oil mixed in the experiment was not suitable.

Keywords : Challenge test, Mosquito repellent lotion , Preservative efficiency

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้ประสบความสำเร็จและผ่านลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าต้องขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่คอยให้ความรู้ ให้คำปรึกษา ให้การสนับสนุน ชี้แนะ และเสนอแนวทางในการจัดทำโครงการพิเศษ ทั้งยังคอยดูแลเอาใจใส่ จนโครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงและเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สร้อยญา พันพฤกษ์ และผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ คณะกรรมการ ที่คอยช่วยเหลือในการตรวจสอบ แก้ไข และแนะนำให้โครงการพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ผู้ที่อบรมสั่งสอน คอยเลี้ยงดู ส่งเสริม สนับสนุนในสิ่งที่ข้าพเจ้าสนใจเสมอมา อีกทั้งยังคอยเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าสามารถทำโครงการพิเศษฉบับนี้ผ่านไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณพี่น้องวิทยาศาสตร์ บุคลากร ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในส่วนของการสนับสนุนในด้านวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี เครื่องมือ ทั้งยังช่วยอำนวยความสะดวกในเรื่องต่างๆสำหรับโครงการพิเศษนี้

สุดท้ายขอขอบคุณเพื่อนๆทุกคน สำหรับการให้ข้อมูล การชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหา หรือช่วยให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆตลอดมาจนโครงการพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ชัยวัฒน์ เตชปีติกุล

นนทกาล ทิพวรรณ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย (TH SarabunPSK 16)	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 Challenge test	3
2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	3
2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
2.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.1.4 <i>Candida albicans</i>	5
2.3 สมุนไพรที่ใช้เป็นส่วนประกอบในน้ำมันหอมระเหย	6
2.2.1 กานพลู	6
2.2.2 ขิง	7
2.2.3 อบเชย	8
2.4 ฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหย	9
2.4.1 ฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย	9
2.4.2 ฤทธิ์การต้านเชื้อรา	9
2.4.3 ฤทธิ์การไล่แมลง ข่าแมลง ข่าหนอนพยาธิ ต้านปรสิต	9
2.5 อิมัลชัน (Emulsion)	10
2.5.1 ส่วนประกอบของอิมัลชัน	10
2.5.2 ชนิดของอิมัลชัน	10
2.5.3 ลักษณะของอิมัลชัน	11
2.5.4 ความหนืดของอิมัลชัน	11
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	14
บทที่ 4 ผลการวิจัย	20

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	34
เอกสารอ้างอิง	37

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1	15
3.2	16
3.3	16
3.4	16
4.1	23
4.2	24
4.3	25
4.4	26
4.5	27
4.6	27
4.7	27
4.8	28
5.1	31

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 <i>Escherichia coli</i>	3
2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.4 <i>Candida albicans</i>	6
4.1 อาหาร NB ที่เติมน้ำมันหอมระเหยในความเข้มข้นที่แตกต่างกันและเติมเชื้อ <i>C.albicans</i> ก่อนนำไปป่ม (a.) และหลังนำไปป่ม (b.)	29
4.2 อาหาร NB ที่เติมน้ำมันหอมระเหยในความเข้มข้นที่แตกต่างกันและเติมเชื้อ <i>E.coli</i> ก่อนนำไปป่ม (a.) และหลังนำไปป่ม (b.)	29
4.3 อาหาร NB ที่เติมน้ำมันหอมระเหยในความเข้มข้นที่แตกต่างกันและเติมเชื้อ <i>P.aeruginosa</i> ก่อนนำไปป่ม (a.) และหลังนำไปป่ม (b.)	30
4.4 อาหาร NB ที่เติมน้ำมันหอมระเหยในความเข้มข้นที่แตกต่างกันและเติมเชื้อ <i>S.aureus</i> ก่อนนำไปป่ม (a.) และหลังนำไปป่ม (b.)	31
4.5 การทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>C.albicans</i>	31
4.6 การทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>E.coli</i>	32
4.7 การทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>P.aeruginosa</i>	32
4.8 การทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>S.aureus</i>	33

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
DEET	N,N-diethyl-meta-toluamide
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MBC	Minimum Bactericidal Concentration
O/W	Oil in water emulsion
W/O	Water in oil emulsion
mg	มิลลิกรัม
ml	มิลลิลิตร
g	กรัม
MHA	Mueller-Hinton agar
PDA	Potato Dextrose agar
CFU	Colony forming unit
°C	องศาเซลเซียส
TNTC	Too numerous to count
T7	ระยะการบ่มในวันที่ 7
T14	ระยะการบ่มในวันที่ 14
T21	ระยะการบ่มในวันที่ 21
T28	ระยะการบ่มในวันที่ 28

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ยุง นับได้ว่าเป็นหนึ่งในสัตว์ที่ก่อความรำคาญ รวมถึงก่อโรคให้กับประชากรในประเทศเขตร้อนเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันนั้นได้มีการผลิตผลิตภัณฑ์สำหรับกันยุงออกมาหลากหลายชนิด เช่น ยาจุดกันยุง สเปรย์ไล่ยุง โลชั่นกันยุง หรือแม้แต่ธูปหอมกันยุง ซึ่งบางชนิดมีส่วนผสมของสารเคมีที่ออกฤทธิ์ไล่แมลง โดยเฉพาะยุง ได้แก่ N,N-diethyl-meta-toluamide หรือเป็นที่รู้จักในชื่อ DEET โดยเมื่อใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลาอันยาวนานจะก่อผลเสียต่อผู้ใช้เป็นอย่างมาก ไม่ควรใช้กับเด็กเล็ก และพบว่ายุงนั้นมีความสามารถในการจดจำพฤติกรรมและกลิ่นของสารชนิดนี้ได้ (Jeff, 2018) ซึ่งในปัจจุบันนั้นได้มีการคิดค้นผลิตภัณฑ์ไล่ยุงที่นำความรู้และภูมิปัญญามาประยุกต์ใช้ เพื่อเป็นอีกหนึ่งแนวทางของการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์กันยุงที่มาจากผลิตผลจากธรรมชาติ โดยเฉพาะการใช้น้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรต่างๆ นอกจากเพิ่มกลิ่นให้แก่ผลิตภัณฑ์แล้ว น้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรเหล่านี้ยังมีความสามารถในการเป็นสารกันเสียจากธรรมชาติอีกด้วย โดยผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์บำรุงผิวที่ผลิตขึ้นนั้นอาจจะเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างการผลิต การเก็บรักษา หรือระหว่างการเปิดใช้งานได้ จึงจำเป็นต้องเติมสารกันเสียเพื่อต้านทานการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น แต่ในปัจจุบันพบว่าผู้บริโภคที่มีอาการแพ้สารกันเสียเพิ่มมากขึ้น การใช้น้ำมันหอมระเหยจึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมที่มีประสิทธิภาพในการต้านทานการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เช่นเดียวกับสารกันเสียที่เกิดจากการสังเคราะห์

และด้วยความสามารถของน้ำมันหอมระเหยที่เป็นสารกันเสียธรรมชาตินั้น จึงได้มีการเล็งเห็นถึงประโยชน์ที่จะนำมาใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์กันยุงชนิดโลชั่น ซึ่งในงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัย ต่อเนื่องมาจากงานวิจัยการใช้น้ำมันหอมระเหยซึ่งผสมเพื่อผลิตโลชั่นกันยุง โดยการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากานพลู ชิง ลาเวนเดอร์ ยูคาลิปตัส และอบเชยที่เป็นส่วนผสมในโลชั่นกันยุง ในด้านการเป็นสารกันเสียจากธรรมชาตินั้นจึงเป็นการค้นคว้าที่ได้รับความสนใจอีกหนึ่งหัวข้อ เพื่อนำมาเป็นข้อมูลในการตัดสินใจผลิตผลิตภัณฑ์ทางเลือกสำหรับผู้บริโภค การต้านทานการเจริญของจุลินทรีย์ ด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา หรือ Challenge test ตามมาตรฐานการทดสอบ ISO 11930 เพื่อทดสอบความสามารถในการต้านทานการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยการทดสอบทางจุลชีววิทยา หรือ Challenge test นั้น เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของสารกันเสียที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการทดสอบสารกันเสียในผลิตภัณฑ์อาหาร ยา และเครื่องสำอาง ใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการทดสอบทั้งหมด 5 ชนิด ประกอบไปด้วยแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* และ *Aspergillus niger*

ในการศึกษาประสิทธิภาพการต้านทานการเจริญของจุลินทรีย์นั้น เป็นผลทำให้เกิดการค้นคว้าโดยทำการทดสอบหาระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำมันหอมระเหยจากานพลู ชิง ลาเวนเดอร์ ยูคาลิปตัสและอบเชย ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ ซึ่งการศึกษานี้ได้มีการเล็งเห็นถึงความสำคัญ

ในการขยายการผลิตผลิตภัณฑ์กัญชงชนิดโลชั่นที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหย เพื่อลดต้นทุนการผลิตผลิตภัณฑ์

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการต้านทานการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์โลชั่นที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหย และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านทานการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์กับโลชั่นสูตรธรรมดา

1.2.2 เพื่อทดสอบหาปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยซึ่งผสมที่ต่ำที่สุดที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษาประสิทธิภาพการต้านทานการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์โลชั่นที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหย โดยการใช้การทดสอบทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐาน ISO 11930 หรือเทคนิค Challenge test ด้วยจุลินทรีย์ 4 ชนิดในการทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* โดยใช้ระยะเวลาในการทดสอบ 28 วัน และทำการทดสอบหาระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำมันหอมระเหยที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (MIC) และระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำมันหอมระเหยที่มีความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MBC)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถนำสูตรของผลิตภัณฑ์โลชั่นกัญชงที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยขยายสู่ระดับอุตสาหกรรม

1.4.2 สามารถนำการศึกษาด้านความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ต่ำที่สุดที่สามารถต้านทานการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มาลดต้นทุนในการผลิตโลชั่นกัญชงที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยในปริมาณมาก

1.4.3 เป็นทางเลือกในการผลิตผลิตภัณฑ์โลชั่นที่ใช้ส่วนประกอบจากธรรมชาติในให้กลิ่นและการต้านทานการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 Challenge test (Siegert W., 2013)

Challenge test คือ เทคนิคการทดสอบประสิทธิภาพของสารกันเสียในผลิตภัณฑ์ ด้วยวิธีการทางด้านจุลชีววิทยา เพื่อประเมินว่าสารกันเสียชนิดนั้นมีประสิทธิภาพในการต้านทาน การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้หรือไม่เมื่อใส่ลงไป ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ซึ่งเป็นเทคนิคที่ระบุไว้ในตำราทางเภสัชศาสตร์ของยุโรป และอเมริกา และได้ถูกรับรองโดยมาตรฐาน ISO 11930 ซึ่งเป็นอีก หนึ่งขั้นตอนในการประเมินประสิทธิภาพการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ โดยเป็นขั้นตอนที่ใช้จุลินทรีย์ชนิด แบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รา และยีสต์มาทำการทดสอบ เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการ ทดสอบนั้นเปรียบเสมือนกับตัวแทนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากการปนเปื้อนในระหว่างการใช้งาน ผลิตภัณฑ์ของผู้บริโภค รวมถึงตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการผลิต ผลิตภัณฑ์และระยะเวลาการเก็บรักษา โดยเชื้อจุลินทรีย์จะถูกผสมลงในตัวอย่างของผลิตภัณฑ์และสุ่ม ออกมาตรวจสอบในช่วงระยะเวลาที่กำหนดเพื่อตรวจวัดการลดจำนวนลงของเชื้อจุลินทรีย์

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

2.2.1 *Escherichia coli* (วฤษณี, 2554)



รูปที่ 2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli หรือ *E. coli* นั้นเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่ง (rod shape) มีแฟลกเจลล่าทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้ ดังรูปที่ 2.1 เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) พบมาก ในลำไส้สัตว์ ซึ่ง *E. coli* สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobe) และในสภาวะที่ไม่มี ออกซิเจน (anaerobe)

ในเชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์มีคุณสมบัติในการก่อโรคทางเดินอาหารในคนและสัตว์ ซึ่งมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนเชื้อในอาหาร และเครื่องดื่มที่ถูกเตรียมขึ้นโดยไม่ถูกสุขลักษณะอนามัย องค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาจึงได้กำหนดให้มีการตรวจสอบคุณภาพ ของผลิตภัณฑ์อาหาร เครื่องดื่ม ยา และเครื่องสำอาง เพื่อมาตรฐานและความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

จำแนกอนุกรมวิธาน ดังนี้

อาณาจักร (Kingdom) : Bacteria
 ไฟลัม (Phylum) : *Proteobacteria*
 ชั้น (Class) : *Enterobacteriales*
 วงศ์ (Family) : *Enterobacteriaceae*
 สกุล (Genus) : *Escherichia*
 สปีชีส์ (Species) : *Escherichia coli*

2.2.2 *Pseudomonas aeruginosa* (พินิจ, 2553)



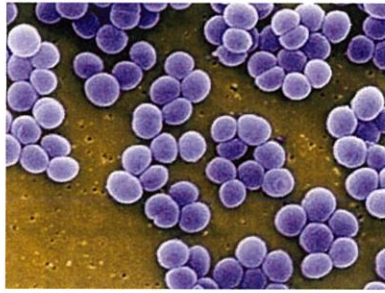
รูปที่ 2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa หรือ *P. aeruginosa* เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง (rod shape) มีแฟลกเจลล่าทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้ดังรูปที่ 2.2 มีความสามารถพิเศษในการผลิตสารสี ซึ่งปรากฏในสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเขียว *P. aeruginosa* สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobe) เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) เมื่อร่างกายมีภูมิคุ้มกันต่ำ เชื้อจะสามารถกระตุ้นอาการอักเสบรุนแรงในร่างกายได้ ซึ่งเป็นเหตุให้เกิดการต้านยาปฏิชีวนะ ในระยะเริ่มแรกจึงถือได้ว่า *P. aeruginosa* เป็นเชื้อที่พบมากที่สุดในการติดเชื้อในโรงพยาบาล

จำแนกอนุกรมวิธาน ดังนี้

อาณาจักร (Kingdom) : Bacteria
 ไฟลัม (Phylum) : *Proteobacteria*
 ชั้น (Class) : *Pseudomonadales*
 วงศ์ (Family) : *Pseudomonadaceae*
 สกุล (Genus) : *Pseudomonas*
 สปีชีส์ (Species) : *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.3 *Staphylococcus aureus* (นิติพงษ์ และเอกชัย, 2552)



รูปที่ 2.3 *Staphylococcus aureus*

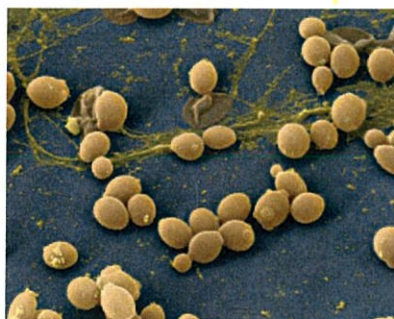
Staphylococcus aureus หรือ *S. aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก รูปร่างกลม (cocci) ส่วนมากพบเป็นสายสั้นๆ หรือเกาะกลุ่มเป็นรูปพวงงอ ดังรูปที่ 2.3 เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobe) และในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobe) และเป็นแบคทีเรียชนิดทนเค็ม สามารถเจริญได้ในความเข้มข้นเกลือสูงๆ เป็นสาเหตุให้เกิดโรคหลายชนิด เนื่องจากสามารถพบเชื้อชนิดนี้ได้มากที่บริเวณผิวหนังที่มีความผิดปกติของคนและสัตว์เลือดอุ่น

S. aureus มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมเป็นอย่างมาก จึงทำให้สามารถอาศัยอยู่ภายนอกร่างกายได้และ *S. aureus* เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญทางผิวหนัง เช่น ฝี แผลติดเชื้อ แผลอักเสบ ซึ่งเชื้อชนิดนี้สามารถพบได้ทั้งในผู้ที่มีอาการของโรคและคนที่มีสุขภาพดี

จำแนกอนุกรมวิธาน ดังนี้

อาณาจักร (Kingdom)	: Bacteria
ไฟลัม (Phylum)	: Firmicutes
ชั้น (Class)	: Bacillales
วงศ์ (Family)	: Staphylococcaceae
สกุล (Genus)	: Staphylococcus
สปีชีส์ (Species)	: <i>Staphylococcus aureus</i>

2.2.4 *Candida albicans* (จิราภรณ์ และคณะ, 2554)



รูปที่ 2.4 *Candida albicans*

Candida albicans หรือ *C. albicans* อยู่ในอาณาจักรฟังไจ ที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปไข่ หรือกลม และสายยาว ติดแถมบวก ดังรูปที่ 2.4 เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ในร่างกายมนุษย์ บริเวณที่พบส่วนมากได้แก่ ลำไส้ หลอดอาหาร และช่องคลอด เมื่อร่างกายเกิดสภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ เชื้อจะสามารถก่อโรคให้แก่ร่างกายได้ โดยเชื้อสามารถบุกรุกเข้าไปในเนื้อเยื่อของผู้ป่วยบริเวณที่เชื่อนั้นอาศัยอยู่ ซึ่งเป็นผลให้เกิดการอักเสบและมีอาการคัน

จำแนกอนุกรมวิธาน ดังนี้

อาณาจักร (Kingdom) : Fungi
 ไฟลัม (Phylum) : *Ascomycota*
 ชั้น (Class) : *Saccaromycetes*
 วงศ์ (Family) : *Saccaromycetaceae*
 สกุล (Genus) : *Candida*
 สปีชีส์ (Species) : *Candida albicans*

2.3 สมุนไพรที่ใช้เป็นส่วนประกอบในน้ำมันหอมระเหย

2.3.1 กานพลู (ศิริเพ็ญ และคณะ, 2548)

ชื่อภาษาไทย กานพลู

ชื่ออื่นๆ จันจี่ (ภาคเหนือ)

ชื่อภาษาอังกฤษ Clove

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Syzygiu aromaticum* (L.) Merr. & Perry

ชื่อพ้อง *Eygenia aromatic* (L.) Baill., *Eugenia caryophyllata* (Spreng.) Bullock & Herrison,

Eugenia caryophyllata Thunb., *Caryophyllus aromaticus* L.

วงศ์ Myrtaceae

ส่วนที่ใช้ เปลือกต้น ใบ ดอกตูม ผล น้ำมันหอมระเหยกานพลู

สรรพคุณ (สุนทรี, 2536)

- เปลือกต้น แก้ปวดท้อง แก้ลม คุมธาตุ
- ใบ แก้ปวดมวน
- ดอกตูม รับประทานขับลม ไข้แตงกลื่น
- ดอกกานพลูแห้ง ที่ยังไม่ได้สกัดเอาน้ำมันออก และมีกลิ่นหอมจัด มีน้ำมันหอมระเหยมาก รสเผ็ด ช่วยขับลม แก้อาการท้องอืด ปวดเฟื้อ ปวดท้อง และแน่นจุกเสียด แก้อุจจาระพิการ แก่โรคเหน็บชา แก่หืด แก่ไอ แก่น้ำเหลืองเสีย แก่เลือดเสีย ขับน้ำคาวปลา แก่ลม แก่ธาตุพิการ บำรุงธาตุ ขับเสมหะ แก่เสมหะเหนียว ขับผายลม ขับลมในลำไส้ แก่ท้องเสียในเด็ก แก่ปากเหม็น แก่เลือดออกตามไรฟัน แก่ร้มนะนาด ดับกลิ่นเหม็น แก่ปวดฟัน
- ผล ใช้เป็นเครื่องเทศ เป็นตัวช่วยให้มีกลิ่นหอม
- น้ำมันหอมระเหยจากกานพลู ใช้เป็นยาชาเฉพาะแห่ง แก้ปวดฟัน ข้่าเชื่อในทางพันธุกรรม เป็นยาระงับการชักกระตุก ทำให้ผิวแห้งชา

สารเคมี

ประกอบด้วย Eugenol, Cinnamic aldehyde Vanillin น้ำมันหอมระเหย Caryophylla-3(12)-6-dien-4-ol

องค์ประกอบทางเคมี

- ดอกกานพลู ดอกแห้ง เมื่อนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำ ได้น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 6.0 องค์ประกอบทางเคมี ประกอบด้วย eugenol, trans-caryophyllene และ α -humulene
- ใบกานพลู ใบสด เมื่อนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีกลั่นด้วยน้ำ ได้น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 2.0 องค์ประกอบทางเคมี ประกอบด้วย eugenol, trans-caryophyllene และ α -humulene

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

เป็นยาชาเฉพาะที่ ขับลม ต้านเชื้อแบคทีเรีย รา และยีสต์ ไล่งู ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ประโยชน์

ทางยาใช้แก้ปวดฟัน ขับลมและฆ่าเชื้อโรค ใช้ผสมในยาสีฟันและยารอบปาก ใช้แต่งกลิ่นอาหารจำพวกเนื้อ เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ ขนมเค้ก และลูกกวาด

2.3.2 ขิง (ศิริเพ็ญ และคณะ, 2548)

ชื่อภาษาไทย ขิง

ชื่ออื่นๆ ขิงแกลง ขิงแดง ขิงเผือก สะเอ

ชื่อภาษาอังกฤษ Ginger

ชื่อวิทยาศาสตร์ Zingiber officinale Roscoe

ชื่อพ้อง -

วงศ์ Zingiberaceae

ส่วนที่ใช้ เหง้าแก่สด ต้น ใบ ดอก ผล

สรรพคุณ (สุนทร, 2536)

- เหง้าแก่สด แก้อาเจียน ยาขมเจริญอาหาร ยาแก้ท้องขึ้น ท้องอืดเฟ้อ ขับลม ยาแก้ไอ ขับเสมหะ บำรุงธาตุ สามารถต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ลดอาการจุกเสียดได้ดี มีฤทธิ์ในการขับน้ำดี เพื่อช่วยย่อยอาหาร แก้ปากคอเปื่อย แก้ท้องผูก ลดความดันโลหิต
- ต้น ขับผายลม แก้จุกเสียดแน่นเฟ้อ แก้นิว บำรุงไฟธาตุ แก้คอเปื่อย ช่วยย่อยอาหาร ฆ่าพยาธิ แก้โรคตา แก้บิด แก้ท้องร่วงอย่างแรง แก้อาเจียน
- ใบ แก้โรคกำเดา ขับผายลม แก้นิวแก้เบาขัด แก้คอเปื่อย บำรุงไฟธาตุ ช่วยย่อยอาหาร ฆ่าพยาธิ แก้โรคตา ขับลมในลำไส้
- ดอก ทำให้ชุ่มชื้น แก้โรคตาและ ฆ่าพยาธิ ช่วยย่อยอาหาร แก้คอเปื่อย บำรุงไฟธาตุ แก้นิว แก้เบาขัด แก้บิด
- ผล แก้ไข้

สารเคมี

- เหง้า พบ Gingerol Zingiberene, Zingiberone Zingiberenol, Shogaol, Fenchone, Camphene, Cineol Citronellol

- น้ำมันหอมระเหย พบ Bisabolene, Zingierone Zingiberol, Zingiberene, Limonene, Citronellol Gingerol, Camphene, Boenrol, Cineol
- ทั้งต้น พบ S-(1)-6-Gingerol
- ใบ พบ Shikimic acid

องค์ประกอบทางเคมี

- เหง้าสด เมื่อนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ ได้น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 0.20 องค์ประกอบทางเคมี ประกอบด้วย camphene, 1,8-cineole, citral b, citral a, zingiberene, nerolidol และ β -sesquiphellandrene

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ต้านแบคทีเรีย และเชื้อรา แก้อักเสบ คลายกล้ามเนื้อเรียบ

ประโยชน์

ใช้แต่งกลิ่นเครื่องดื่ม ขนมหวาน และช่วยขับลม

2.3.3 อบเชยลังกา (ศิริเพ็ญ และคณะ, 2548)

ชื่อภาษาไทย อบเชยลังกา

ชื่ออื่นๆ การบูร อบเชยเทศ

ชื่อภาษาอังกฤษ Ceylon cinnamon, Cinnamon tree

ชื่อวิทยาศาสตร์ Cinnamomum zeylanicum Nees

ชื่อพ้อง -

วงศ์ Lauraceae

ส่วนที่ใช้ เปลือกต้น ใบ

สรรพคุณ (สุนทรี, 2536)

- เปลือกต้น ใช้บำรุงดวงจิต แก้อ่อนเพลีย ทำให้มีกำลัง ใช้ขับลม บำรุงธาตุ บดเป็นผงใช้เป็นเครื่องเทศใส่อาหาร ใส่เครื่องสำอาง ใช้ปรุงเป็นยาหอม แก้มวิงเวียน และจุดเสียด
- ใบ มีน้ำมัน ใช้แต่งกลิ่น ฆ่าเชื้อ

องค์ประกอบทางเคมี

- ใบอบเชย เมื่อนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ ได้น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 1.8 องค์ประกอบทางเคมี ประกอบด้วย δ -3-carene, linalool, eugenol และ trans-caryophyllene
- เปลือกอบเชย เมื่อนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ ได้น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 0.5-2.0 องค์ประกอบทางเคมี ประกอบด้วย 1,8-cineole, E-cinnamaldehyde และ methyl cinnamate

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ต้านเชื้อแบคทีเรีย รา ไล่แมลง

ประโยชน์

ใช้แต่งกลิ่นอาหาร และเป็นส่วนผสมในครีมทาถูขนาดแก้ปวด

2.4 ฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหย (ฐาปนีย์, 2550)

น้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ ได้แก่ ต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านไวรัส

2.4.1 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

องค์ประกอบสำคัญของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ได้แก่

- สารประกอบฟีนอล เช่น carvacrol และ thymol เป็นสารกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียสูง
- สารประกอบแอลดีไฮด์ เช่น citral และ citronellal
- สารประกอบแอลกอฮอล์ เช่น linalool และ cineol สารกลุ่มนี้จะทำลายโปรตีนของเชื้อแบคทีเรียทำให้เชื้อตาย
- สารประกอบเอสเทอร์ เช่น geranyl acetate
- สารประกอบคีโตน เช่น menthone และ carvone

กลไกการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

กลไกการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสาร terpenoids เหล่านี้เกิดจากการยับยั้งการทำงานของผนังเซลล์ของเชื้อโดยการยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron transport) การเคลื่อนย้ายโปรตีน (protein translocation) ตลอดจนปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆทำให้เซลล์เชื้อตาย เนื่องจากสาร terpenoids เป็นสารละลายได้ดีในไขมันดังนั้นจึงละลายได้ดีในส่วนของผนังเซลล์ของเชื้อ

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยอาจทำได้โดยการเปรียบเทียบค่า phenol coefficient ของสารแต่ละชนิดและองค์ประกอบหลักบางชนิดกับค่าฟีนอลซึ่งจะมีค่า phenol coefficient เท่ากับ 1 ดังนั้นถ้าค่า phenol coefficient สูงแสดงว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสูง ในทางตรงกันข้ามถ้าหากมีค่า phenol coefficient ต่ำแสดงว่ามีประสิทธิภาพในการระงับเชื้อต่ำ

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ระงับเชื้อของน้ำมันหอมระเหยในน้ำเสีย (sewage water) โดยดูจากค่าการเจือจาง (dilution) ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดที่ให้ประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากัน และมีการทดสอบกับฟีนอลเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบประสิทธิภาพด้วย ถ้าหากค่าการเจือจางยิ่งต่ำแสดงว่ามีประสิทธิภาพ ในการระงับเชื้อสูง ในทางตรงกันข้ามถ้าค่าการเจือจางยิ่งสูงแสดงว่ามีประสิทธิภาพในการระงับเชื้อต่ำ

2.4.2 ฤทธิ์การต้านเชื้อรา

องค์ประกอบสำคัญของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์การต้านเชื้อรามักเป็นสารประกอบแอลดีไฮด์ ได้แก่ citral หรือสารประกอบเอสเทอร์ น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อรา ได้แก่ น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ น้ำมันเทียนข้าวเปลือก น้ำมันทีทรี น้ำมันกานพลู เป็นต้น น้ำมันหอมระเหยบางชนิดอาจมีคุณสมบัติทั้งต้านแบคทีเรียและต้านเชื้อรา เช่น น้ำมันอบเชยจีน น้ำมันอบเชยลังกา น้ำมันทีทรี น้ำมันโรส น้ำมันกานพลู น้ำมันตะไคร้ เป็นต้น

2.4.3 ฤทธิ์การไล่แมลง ฆ่าแมลง ฆ่าหนอนพยาธิ ต้านปรสิต

ปัจจุบันมีการนำน้ำมันหอมระเหยมาใช้ในการไล่แมลง (insect repellent) ฆ่าหนอนพยาธิ (anthelmintic) ฆ่าแมลง (insecticide) ต้านปรสิต (antiparasitic) องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่มีคุณสมบัติฆ่าแมลง ได้แก่ citronella, citral, cinnamic aldehyde, carvone เป็นต้น

น้ำมันหอมระเหย ที่มีคุณสมบัติฆ่าแมลง ได้แก่ น้ำมันอบเชยลังกา น้ำมันอบเชยจีน น้ำมันกานพลู น้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันตะไคร้ เป็นต้น น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณสมบัติต้านปรสิตโดยเฉพาะเหาหรือหมัด ได้แก่ น้ำมันโรม์ น้ำมันทีทรี

2.5 อิมัลชัน (Emulsion) (พิมพร, 2532)

อิมัลชัน (Emulsion) คือ ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบไปด้วยของเหลวที่แตกต่างกัน 2 ชนิดที่ไม่สามารถละลายหรือรวมตัวให้เข้ากันได้ เช่น น้ำกับน้ำมัน โดยเมื่อนำมารวมกันจำเป็นต้องใช้สาร emulsifier เป็นสารช่วยในการผสมผสานของเหลวทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน ซึ่งเมื่อมองด้วยตาเปล่าจะสามารถเห็นได้ว่าสารอิมัลชันที่ได้นั้นเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อทำการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ก็จะพบว่าอิมัลชันนั้นแบ่งเป็น 2 ภูมิภาค ได้แก่ ภูมิภาคภายใน (Internal or Dispersed Phase) ซึ่งเป็นหยดของเหลวเล็กๆกระจายตัวอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่งที่เรียกว่า ภูมิภาคภายนอก (External or Continuous Phase)

2.5.1 ส่วนประกอบของอิมัลชัน

1. ภูมิภาคน้ำ (Water Phase) ซึ่งไม่ได้มีแค่น้ำเพียงชนิดเดียว แต่รวมถึงสารที่สามารถละลายได้ในน้ำชนิดต่างๆร่วมด้วย เช่น สารเพิ่มความหนืด สารกันเสีย สารอิวเทกแทนต์ สารลดแรงตึงผิว สารต้านการออกซิเดชัน หรือสารสีที่ละลายในน้ำได้

2. ภูมิภาคน้ำมัน (Oil Phase) ได้แก่ น้ำมันชนิดต่างๆ ไขมัน แร็กซ์ รวมถึงสารต่างๆที่สามารถละลายได้ในน้ำมัน เช่น น้ำหอม น้ำมันหอมระเหย สารกันหืน สารออกฤทธิ์ต่างๆจำพวกฮอร์โมน วิตามิน และสีที่ละลายในน้ำมัน

3. ตัวทำอิมัลชัน (Emulsifier) เป็นสารที่ช่วยผสมผสานระหว่างสารในภูมิภาคน้ำและน้ำมันทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน ได้แก่ สารลดแรงตึงผิว เช่น Tween Span คอลลอยด์ที่ชอบน้ำ เช่น Gelatin ของแข็งอนุภาคละเอียด เช่น Bentonite, Colloidal magnesium aluminium silicate เป็นต้น

2.5.2 ชนิดของอิมัลชัน

1. อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (Water in Oil Emulsion, W/O Emulsion) ซึ่งเป็นอิมัลชันชนิดที่มีภูมิภาคภายในเป็นน้ำ และภูมิภาคภายนอกเป็นน้ำมัน สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์บำรุงผิวโดยทั่วไป เช่น ครีมทาแก้ม คีร์มล้างหน้า และครีมทาคิ้วหน้า ซึ่งมีความเหนอะหนะและล้างด้วยน้ำออกยาก

2. อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (Oil in Water Emulsion, W/O Emulsion) อิมัลชันชนิดนี้มีภูมิภาคภายในคือน้ำมัน และภูมิภาคภายนอกคือน้ำ มีความเหนอะหนะน้อยกว่าอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันและกระจายตัวได้ดีเมื่อทา เป็นที่นิยมในการนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและบำรุงผิว โดยตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ โลชั่นทาผิว ครีมกันแดด ครีมรองพื้น และครีมทาหน้า

3. อิมัลชันเชิงซ้อน (Multiple Emulsion) เป็นผลิตภัณฑ์อิมัลชันที่มีภูมิภาคภายในซ้อนกัน ได้แก่ อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันในน้ำ (Water in Oil in Water Emulsion, W/O/W Emulsion) และอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำในน้ำมัน (Oil in Water in Oil Emulsion, O/W/O Emulsion)

2.5.3 ลักษณะของอิมัลชัน

1. Macroemulsion คือ อิมัลชันสีขาวขุ่น ซึ่งอนุภาคของวัฏภาคภายในนั้นมีขนาดใหญ่ (0.25 – 10 ไมครอน) จึงเกิดค่าที่แตกต่างกันในการหักเหแสงของวัฏภาคทั้งสองชนิดและเกิดการกระจายแสงจึงทำให้เห็นเป็นสีขาวขุ่น โดยทั่วไปสามารถจำแนกสารชนิด Macroemulsion ได้เป็น อิมัลชันเนื้อหยาบ (Coarse emulsion) ซึ่งเป็นชนิดที่มีอนุภาคค่อนข้างใหญ่ และอิมัลชันเนื้อละเอียด (Fine emulsion) ซึ่งมีอนุภาคค่อนข้างเล็กหรือเล็กกว่า 5 ไมครอน
2. Microemulsion เป็นอิมัลชันที่มีลักษณะโปร่งใส เนื่องจากอนุภาคของวัฏภาคภายในเล็กมาก (0.01 - 0.75 ไมครอน) ซึ่งมีค่าน้อยกว่าความยาวคลื่นแสงที่มองเห็นได้ (Visible light) จึงไม่เกิดการหักเหหรือกระจายแสงได้ จึงโปร่งใสแสงจึงสามารถทะลุผ่านได้ หยตของวัฏภาคภายในมีลักษณะกลม ถูกล้อมรอบด้วยฟิล์มของตัวทำอิมัลชัน มีทั้ง ชนิด O/W และ W/O

2.5.4 ความหนืดของอิมัลชัน

1. โลชั่น (Lotion) เป็นอิมัลชันที่มีความหนืดต่ำ มีวัฏภาคภายในไม่เกิน 35% ซึ่งเป็นได้ทั้งอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O emulsion) และ อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W Emulsion) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ทาผิวที่พบโดยทั่วไป เนื่องจากทาแล้วให้ความชุ่มชื้น ไม่เหนอะหนะ ล้างออกได้ง่าย และซึมสู่ผิวได้ดี
2. ครีม (Cream) เป็นอิมัลชันที่มีความหนืดสูง ครีมมีความหนืดกว่าโลชั่น เพราะมีปริมาณวัฏภาคภายในสูงกว่าประมาณ 35 – 75 % เนื่องจากมีส่วนประกอบของสารจำพวกแว็กซ์ และไขมัน ซึ่งเป็นตัวช่วยเพิ่มความหนืด และเป็นเนื้อครีมที่ผสมอยู่กับน้ำมันในวัฏภาคน้ำมัน ซึ่งผลิตภัณฑ์ครีมเป็นได้ทั้งอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O emulsion) และ อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W Emulsion)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Brannan D.K. *et al.* (1987) ได้ศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของสารกันเสียโดยใช้วิธีจำลองเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในการใช้ผลิตภัณฑ์ 2 ชนิดคือ ยาสระผม และโลชั่น ซึ่งเรียกวิธีการนี้ว่า Challenge test โดยทำการผสมเชื้อจุลินทรีย์ 4 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้นที่ 30% 50% 70% และ 100% ติดตามผลเป็นเวลา 28 วัน วิธีการนี้เป็นการประเมินประสิทธิภาพของสารกันเสียว่ามีประสิทธิภาพไม่ดี ปานกลาง หรือดี ซึ่งจากการทดสอบพบว่าผลิตภัณฑ์ที่สารกันเสียไม่มีประสิทธิภาพนั้นมีการปนเปื้อนหลังการเปิดใช้งานนั้นมีมากถึง 46% - 90% ของผลิตภัณฑ์ที่วางจำหน่ายในขณะนั้น และพบว่าผลิตภัณฑ์ที่มีสารกันเสียที่มีประสิทธิภาพดีนั้นไม่มี การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

Siegert W. (2013) ได้ทำการศึกษาการเปรียบเทียบขั้นตอนการทดสอบความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ด้านจุลินทรีย์ โดยยึดหลักการของการพิจารณาประสิทธิภาพการเก็บรักษาด้วยเทคนิค Challenge test ของมาตรฐาน ISO 11930 โดยเทคนิคนี้จะใช้ความแตกต่างของจุลินทรีย์แต่ละชนิดได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา ในการทดสอบซึ่งมีเกณฑ์มาตรฐานที่เป็นที่ยอมรับและบอกถึงประสิทธิภาพของสารกันเสียในผลิตภัณฑ์ ในการศึกษาได้ทำการทดสอบโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 5 ชนิดได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* และ *Aspergillus niger* ลงในผลิตภัณฑ์โลชั่นทาผิวที่ผสม Q10 เปรียบเทียบกับมาตรฐานการทดสอบความปลอดภัยในเครื่องสำอางด้านจุลชีววิทยาอื่นๆ ได้แก่

Pharmacopoeia methods, CTFA Microbiology Guidelines, ASEAN Cosmetic Harmonized Testing Method Association of Southeast Asian Nations และ In-house test protocols (KoKo test) ซึ่งผลการทดสอบได้ระบุว่า การทดสอบของ Challenge test นั้นเป็นการทดสอบประสิทธิภาพของสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีความง่ายต่อการทดสอบ แต่ยังคงข้อดีของเรื่องความเข้มงวดในการตรวจสอบที่มีความเข้มงวดน้อยกว่าการทดสอบประสิทธิภาพการเก็บรักษาตามมาตรฐาน GMP ทางเภสัชกรรม (Pharmaceutical Good Manufacturing Practice) ซึ่งถือได้ว่าการตรวจสอบด้วยเทคนิค Challenge test ตามมาตรฐาน ISO 11930 เป็นการตรวจสอบประสิทธิภาพของสารกันเสียขั้นพื้นฐานที่สามารถยืนยันประสิทธิภาพของการต้านทานการเจริญของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ระหว่างการผลิตได้ แต่หากต้องการทดสอบความสามารถในการคงตัวของสารกันเสียในระยะเวลาที่ยาวนานกว่า 28-32 วันนั้นสามารถ ใช้การทดสอบอื่นๆมายืนยันผลของประสิทธิภาพได้

ลลิตา และคณะ (2559) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนในห้องน้ำสาธารณะด้วยน้ำมันหอมระเหยจากพลูผสม ซึ่งมีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรชนิดอื่นๆ ได้แก่ กานพลู ยูคาลิปตัส ทีทรี และลาเวนเดอร์ กับเชื้อจุลินทรีย์ทั้งชนิดแบคทีเรีย 9 สายพันธุ์, รา 7 สายพันธุ์ และยีสต์อีก 1 สายพันธุ์ โดยพบว่า น้ำมันหอมระเหยสูตรผสมน้ำมันกานพลูกับน้ำมันหอมระเหยอีก 4 ชนิดนั้น มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้ดี ยกเว้นการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Vibrio cholera* ที่พบว่ามีความไวต่อน้ำมันหอมระเหยจากพลูชนิดเดียวมากกว่า โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มีค่าเท่ากับ 4,096 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Zhang S. *et al.* (2016) ได้มีการศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากพลู น้ำมันหอมระเหยอบเชย และน้ำมันหอมระเหยจากพลูผสมอบเชย โดยทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ *E. coli*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* และ *S. aureus* ด้วยวิธี Oxford cup บนอาหารแข็ง พบว่า น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 3 ชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด ต่างกัน ทำให้เกิด inhibition zone ขนาดต่างกัน inhibition zone ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า นั้นแสดงถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้มากกว่า ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากพลูผสมอบเชยนั้น มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีถึงแม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นที่น้อยกว่าน้ำมันหอมระเหยจากพลูและน้ำมันหอมระเหยอบเชยบริสุทธิ์ก็ตาม

Svarc-Gajic J. *et al.* (2017) ได้มีการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากขิงด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน ได้แก่ การสกัดด้วยการใช้น้ำที่ต้มภายใต้ความดันบรรยากาศ และการสกัดด้วยน้ำที่ต้มภายใต้สภาวะความดันสูง ในการทดสอบจะใช้จุลินทรีย์ทั้งหมด 9 ชนิด ด้วยวิธี MIC พบว่า มีค่า MIC อยู่ในช่วง 9.76 -156.25 µg/mL เมื่อนำค่า MIC ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ Amricin, Nystatine, standard anti-bacterial and anti-fungal compounds พบว่าสารที่สกัดโดยน้ำที่ต้มภายใต้สภาวะความดันสูง แสดงผลการต้านจุลินทรีย์ได้ดีเท่ากับ anti-fungal เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยน้ำที่ต้มภายใต้ความดันบรรยากาศ

Lobo-Sánchez M. *et al.* (2018) ได้นำน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัสบริสุทธิ์มาทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus* sp. และ *Pseudomonas aeruginosa* บนอาหาร Mueller-Hinton agar ด้วยวิธี well diffusion เกิด inhibition zone ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 22 มิลลิเมตรและ 10 มิลลิเมตรตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหยยูคาลิ

ปดัสปริสุทธีนั้นสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิดนี้ได้ และเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัสมาเจือจางโดยใช้เอทานอลและอะซิโตน เพื่อทดสอบ MIC และ MBC กับเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญและสามารถฆ่าเชื้อ *Staphylococcus* sp. ได้โดยแสดงผลออกมาในค่า MIC เท่ากับ 2-4 mg/mL และ ค่า MBC เท่ากับ 4-14 mg/mL นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยที่ทำการเจือจางยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ *Pseudomonas aeruginosa* ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 14 mg/mL แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

Khayyat S. (2017) น้ำมันหอมระเหยลาเวนเดอร์ สกัดได้จาก ต้นลาเวนเดอร์ด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ ซึ่งน้ำมันหอมระเหยลาเวนเดอร์นั้นมีองค์ประกอบหลัก คือ linalyl acetate ที่จะนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 2 ชนิด ได้แก่ *Microsporium canis* และ *Microsporium gallinna* โดยเปรียบเทียบกับ epoxide 3, epoxide 4, hedroperoxide 5 และ hedroperoxide 6 ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญนั้นจะใช้วิธี well diffusion ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า ทั้ง linalyl acetate, epoxide 3, epoxide 4, hedroperoxide 5 และ hedroperoxide 6 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดได้ดี ยกเว้น epoxide 3 สำหรับ *M.gallinna*

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์เครื่องมือ

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- แท่งแก้วคนสาร
- แท่งแก้วรูปตัวแอล
- ข้อนตักสาร
- ปีกเกอร์
- จานเพาะเชื้อชนิดแก้ว
- จานเพาะเชื้อชนิดพลาสติก
- หลอดทดลอง
- ฝาเกลียว
- Rack
- ลูกยาง
- ปิเปตแก้ว
- ขวด Duran
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- Autopipette
- Tip
- Incubator
- Hot air oven
- Laminar air flow
- Autoclave
- Vortex
- Stomacher
- Homogenizer

3.1.2 สารเคมีที่ใช้

- น้ำมันหอมระเหยกานพลู
- น้ำมันหอมระเหยขิง
- น้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส
- น้ำมันหอมระเหยลาเวนเดอร์
- น้ำมันหอมระเหยอบเชย
- Cetyl alcohol (Wax)
- Coconut oil

- Cremophor A6
- Cremophor A25
- Finsolv TN
- Glyceryl Monostearate (GMS)
- Propylene glycol
- Deionized water
- Phenoxyethanol
- Ethylhexylglycerin
- Vanillin

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

- Mueller-Hinton Agar (MHA)
- Nutrient Broth (NB)
- Potato Dextrose Agar (PDA)

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 วิธีการเตรียมเชื้อ

นำเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี Simple streak โดยแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* จะใช้อาหาร MHA ส่วนยีสต์ 1 ชนิด ได้แก่ *Candida albicans* จะใช้อาหาร PDA จากนั้นนำแบคทีเรียและยีสต์ไปบ่มที่ 37°C และ 30°C ตามลำดับ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.2 วิธีการเตรียมโลชันกันยุง

โลชันกันยุงประกอบด้วย 4 องค์ประกอบ ดังนี้

องค์ประกอบ A คือ ส่วนน้ำมัน (Oil phase) ซึ่งส่วนผสมของส่วนน้ำมันให้ได้ดังตารางที่ 3.1 แล้วนำไปละลายที่อุณหภูมิ 70°C

ส่วนประกอบ	น้ำหนัก (g.)
Cetyl alcohol	5
Coconut oil	7.5
Cremophor A6	5
Cremophor A25	2.5
Finsolv TN	12.5
Glyceryl Monostearate (GMS)	7.5

ตารางที่ 3.1 น้ำหนักของส่วนผสมในส่วนน้ำมัน

องค์ประกอบ B คือ ส่วนน้ำ (water phase) ซึ่งส่วนน้ำให้ได้ปริมาตรตามตารางที่ 3.2 แล้วนำไปละลายที่อุณหภูมิ 70°C

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (mL.)
Deionized water	250
Propylene glycol	3.75

ตารางที่ 3.2 ปริมาตรของส่วนผสมในส่วนน้ำ

องค์ประกอบ C คือ ส่วนสารกันเสีย (preservative) ประกอบไปด้วยสารกันเสีย 2 ชนิด ดังตารางที่ 3.3

สารกันเสีย	ปริมาตร (mL.)
Phenoxyethanol	0.5
Ethylhexylglycerin	0.5

ตารางที่ 3.3 ปริมาตรของสารกันเสีย

องค์ประกอบ D คือ ส่วนน้ำมันหอมระเหย (essential oil) เตรียมน้ำมันหอมระเหยให้ได้ปริมาตรดังตารางที่ 3.4 จากนั้นจึงนำไปผสมกับ Vanillin 2.5 กรัม จากนั้นจึงนำมา 12.5 ml เติมลงในโลชั่นกันยุง 250 กรัม

น้ำมันหอมระเหย	ปริมาตร (mL.)
น้ำมันหอมระเหยกานพลู	5
น้ำมันหอมระเหยขิง	50
น้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส	10
น้ำมันหอมระเหยลาเวนเดอร์	10
น้ำมันหอมระเหยอบเชย	10

ตารางที่ 3.4 ปริมาตรของส่วนน้ำมันหอมระเหย

หลังจากที่เตรียมองค์ประกอบของโลชั่นกันยุงทั้ง 4 ส่วนได้ดังตารางที่ 3.1, 3.2, 3.3 และ 3.4 แล้ว จะได้โลชั่นกันยุง 250 กรัม ที่มีองค์ประกอบของสารกันเสีย Phenoxyethanol และ Ethylhexylglycerin คิดเป็น 0.4% และองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย คิดเป็น 5%

3.2.3 การศึกษาสูตรของโลชั่นกันยุงสำหรับการทดสอบ Challenge Test โลชั่นกันยุงที่มีสูตรที่ต่างกันทั้งหมด 4 สูตร ประกอบด้วย

สูตรที่ 1 โลชันกันยุงที่ไม่เติมสารกันเสียและน้ำมันหอมระเหย มีวิธีทำดังต่อไปนี้

- นำส่วนประกอบของส่วนน้ำมันที่ชั่งไว้แล้วใส่ลงในบีกเกอร์แล้วนำไปละลายโดยให้ความร้อนจนได้สารที่เป็นเนื้อเดียวกันลักษณะใส ไม่มีสี
- นำส่วนน้ำเหลวไปผสมกับส่วนน้ำมันที่ได้มีการละลายเรียบร้อยแล้ว จากนั้นจึงนำไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ จนมีลักษณะที่ได้เป็นโลชัน มีสีขาว จะได้เป็นโลชันสูตรที่ 1

สูตรที่ 2 โลชันกันยุงที่เติมสารกันเสีย 0.4% เพียงอย่างเดียว มีวิธีทำดังต่อไปนี้

- ทำเช่นเดียวกับโลชันกันยุงสูตรที่ 1
- นำโลชันที่ได้ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมสารกันเสียได้แก่สารกันเสียชนิด Phenoxyethanol และ Ethylhexylglycerin ลงไปตามปริมาตรที่เตรียมไว้ชนิดละ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ จะได้เป็นโลชันสูตรที่ 2

สูตรที่ 3 โลชันกันยุงที่เติมน้ำมันหอมระเหย 5% เพียงอย่างเดียว มีวิธีทำดังต่อไปนี้

- ทำเช่นเดียวกับโลชันกันยุงสูตรที่ 1
- นำน้ำมันหอมระเหยที่เตรียมไว้มา 12.5 มิลลิลิตรมาเติมลงไปในโลชัน จากนั้นจึงนำไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ จะได้เป็นโลชันสูตรที่ 3

สูตรที่ 4 โลชันกันยุงที่เติมสารกันเสียและน้ำมันหอมระเหย มีวิธีทำดังต่อไปนี้

- ทำเช่นเดียวกับโลชันกันยุงสูตรที่ 1
- นำโลชันที่ได้ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมสารกันเสียลงไปตามปริมาตรที่เตรียมไว้ จากนั้นจึงนำไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์
- นำน้ำมันหอมระเหยที่เตรียมไว้มา 12.5 มิลลิลิตรมาเติมลงไปในโลชัน จากนั้นจึงนำไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ จะได้เป็นโลชันสูตรที่ 4

3.2.4 วิธีการทำ Challenge test

1. เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด ให้ได้เท่ากับ 0.5 Mcfarland standard จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ 1.5×10^6 CFU/ml

2. นำโลชันกันยุงแต่ละสูตรมาแบ่งใส่ขวดแก้วใส ขนาด 20 กรัม สูตรละ 5 ขวด แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่เติมเชื้อจุลินทรีย์ 4 ขวด และไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์ 1 ขวด

3. นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ชนิดละ 1 มิลลิลิตร เติมลงไปในขวดโลชันส่วนที่เติมเชื้อจุลินทรีย์ขวดละ 1 ชนิด ใช้แท่งแก้วคนสารคนให้เข้ากันจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ $22.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ และนำออกมา นับจำนวนจุลินทรีย์ที่เวลา 7 วัน, 14 วัน, 21 วัน และ 28 วันการนับจำนวนจุลินทรีย์จะใช้วิธีการ pour plate โดยใช้อาหาร MHA สำหรับแบคทีเรียและอาหาร PDA สำหรับยีสต์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C และ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4. เมื่อบ่มตัวอย่างจนครบ 48 ชั่วโมงแล้วให้นำออกมา นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.2.5 วิธีการทำ Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

วิธีการ Minimum Inhibitory Concentration (MIC) เป็นวิธีการหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ มีวิธีการทดสอบดังนี้

1. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

- เพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์โดยใช้วิธี Simple streak บนอาหาร MHA สำหรับแบคทีเรีย และอาหาร PDA สำหรับยีสต์ แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C และ 30°C ตามลำดับ
- เมื่อบ่มจนครบ 18-24 ชั่วโมงแล้วนำไปเตรียม 0.5 Mcfarland standard แล้วนำไปเจือจางให้ความเจือจางอยู่ที่ 1.5×10^6 CFU/ml

2. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) สำหรับการทำให้ MIC

3. เตรียมน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบ โดยนำไปละลายกับเมทานอลให้มีความเข้มข้น 4%

4. การทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC)

- เตรียมหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 10 หลอด
- ในหลอดที่ 1 เติมน้ำมันหอมระเหยที่ไม่เจือจางสำหรับ negative control (100%)
- เติมน้ำมันหอมระเหย 4% ลงในหลอดที่ 2 และ 3 หลอดละ 1 ml
- เติมน้ำอาหาร NB ปริมาตร 1 ml ลงในหลอดที่ 3 แล้วนำไป vortex จะได้น้ำมันหอมระเหยความเข้มข้นเท่ากับ 2%
- ดูดน้ำมันหอมระเหย 2% จากหลอดที่ 3 ไปยังหลอดที่ 4
- เติมน้ำอาหาร NB ปริมาตร 1 ml ลงในหลอดที่ 4 แล้วนำไป vortex จะได้น้ำมันหอมระเหยความเข้มข้นเท่ากับ 1%
- ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆจนถึงหลอดที่ 9 จะได้ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 4%, 2%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.13%, 0.063% และ 0.031%
- ในหลอดที่ 10 เติมน้ำอาหาร NB สำหรับ positive control (0%)
- เติมน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 1.5×10^6 CFU/ml ปริมาตร 1 ml ลงในหลอดที่ 2-10
- จะทำให้ได้ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ต้องการศึกษา ได้แก่ 100%, 2%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.13%, 0.063%, 0.031%, 0.015% และ 0% ตามลำดับ
- ทำตามขั้นตอนดังกล่าวสำหรับจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ
- นำไปบ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C สำหรับแบคทีเรีย และ 30°C สำหรับยีสต์
- หลังจากบ่มจนครบ 18-24 ชั่วโมงแล้วจึงนำออกมาสังเกตหลอดอาหารไม่มีความขุ่น บันทึกค่า MIC ที่ได้ แล้วนำหลอดที่มีความใสไปทดสอบด้วยขั้นตอน MBC ต่อไป

3.2.6 วิธีการทำ Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

วิธี Minimum Bactericidal Concentration (MBC) เป็นวิธีที่หาความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ต่ำที่สุดในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ มีวิธีการทดสอบดังนี้

- นำหลอดอาหารที่มีความใสจากขั้นตอน MIC มาทำการ Spread plate ลงบนอาหาร MHA สำหรับแบคทีเรีย และอาหาร PDA สำหรับยีสต์ จากนั้นจึงนำไปบ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงที่ อุณหภูมิ 37°C สำหรับแบคทีเรียและ 30°C สำหรับยีสต์
- เมื่อบ่มจนครบกำหนดจึงตรวจสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละจานเพาะเชื้อแล้ว บันทึกผลค่า MBC ที่ได้ โดยค่า MBC คือ ค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ต่ำที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกันเสียในโลชั่นกันยุง

จากการทดสอบเพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารกันเสียทางจุลชีววิทยาในผลิตภัณฑ์โลชั่นกันยุงที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหย ด้วยเทคนิค Challenge test ซึ่งเป็นวิธีที่ถูกกำหนดไว้ในมาตรฐาน ISO 11930 โดยเป็นวิธีการจำลองการเปิดใช้งานผลิตภัณฑ์ของผู้บริโภคซึ่งก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ โดยทำการเติมเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และยีสต์อีก 1 ชนิด ได้แก่ *Candida albicans* ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ลงไปในตัวอย่างโลชั่นแต่ละสูตร สูตรละ 20 กรัม และทำการบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ $22.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ ตามระยะเวลาที่กำหนด คือ 7 วัน (T7), 14 วัน (T14), 21 วัน (T21) และ 28 วัน (T28) จากนั้นทำการสุ่มตรวจตัวอย่างโลชั่นที่ผสมเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดตามวันที่กำหนดตัวอย่างละ 1 กรัม โดยใช้วิธีการ pour plate เพื่อตรวจวัดความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารกันเสียในโลชั่นกันยุงว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดได้ในระยะเวลาที่วัน

4.1.1 ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในวันที่ 7 (T7)

โลชั่นสูตรที่ 1 โลชั่นที่ไม่เติมสารกันเสียและน้ำมันหอมระเหย พบว่าตัวอย่างโลชั่นที่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* พบการเจริญของจุลินทรีย์ในปริมาณมากจนไม่สามารถนับได้ดังตารางที่ 4.1

โลชั่นสูตรที่ 2 โลชั่นที่มีการเติมสารกันเสีย 0.4% เพียงอย่างเดียว พบว่าตัวอย่างโลชั่นที่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ *C. albicans*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* พบการเจริญของจุลินทรีย์ในปริมาณมากจนไม่สามารถนับได้ แต่โลชั่นที่เติม *S. aureus* พบการเจริญของจุลินทรีย์เฉลี่ย 2×10^3 CFU/mL ดังตารางที่ 4.1

โลชั่นสูตรที่ 3 โลชั่นที่มีการเติมน้ำมันหอมระเหย 5% เพียงอย่างเดียว พบว่าตัวอย่างโลชั่นที่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ *C. albicans*, *E. coli* และ *S. aureus* ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ ส่วนโลชั่นที่เติม *P. aeruginosa* พบการเจริญ 10 CFU/mL ดังตารางที่ 4.1

โลชั่นสูตรที่ 4 โลชั่นที่มีการเติมทั้งสารกันเสียและน้ำมันหอมระเหย พบว่าตัวอย่างโลชั่นที่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ *C. albicans*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ แต่โลชั่นที่เติม *E. coli* พบการเจริญ 10 CFU/mL ดังตารางที่ 4.1

ในส่วนของโลชั่นตัวอย่างที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าในโลชั่นสูตรที่ 1 คือ สูตรที่ไม่เติมสารกันเสียและน้ำมันหอมระเหยมีการเจริญของจุลินทรีย์ บนอาหาร MHA และ PDA ในปริมาณมากจนไม่สามารถนับได้ ในส่วนของโลชั่นสูตรที่ 2 คือ สูตรที่ผสมสารกันเสีย 0.4% นั้นพบการเจริญบนอาหาร MHA และ PDA จำนวน 5.8×10^2 CFU/mL และ 4.6×10^2 CFU/mL ตามลำดับแต่ในโลชั่นสูตรที่ 3 คือ สูตรที่มีการผสมน้ำมันหอมระเหย 5% และโลชั่นสูตรที่ 4 คือ สูตรที่มีการผสมทั้งสารกันเสียและน้ำมันหอมระเหยนั้น ไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหาร MHA และ PDA ดังแสดงในตารางที่ 4.5

สูตรที่ผสมสารกันเสีย 0.4% บนอาหาร MHA พบการเจริญของจุลินทรีย์ในปริมาณมากจนไม่สามารถนับได้ และบนอาหาร PDA พบการเจริญ 6.9×10^2 CFU/mL แต่ในโลชั่นสูตรที่ 3 คือ สูตรที่มีการผสมน้ำมันหอมระเหย 5% และโลชั่นสูตรที่ 4 คือ สูตรที่มีการผสมทั้งสารกันเสียและน้ำมันหอมระเหยนั้น ไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหาร MHA และ PDA ดังแสดงในตารางที่ 4.7

4.1.4 ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในวันที่ 28 (T28)

โลชั่นสูตรที่ 1 โลชั่นที่ไม่เติมสารกันเสียและน้ำมันหอมระเหย พบว่าตัวอย่างโลชั่นที่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* พบการเจริญของจุลินทรีย์ในปริมาณมากจนไม่สามารถนับได้ดังตารางที่ 4.4

โลชั่นสูตรที่ 2 โลชั่นที่มีการเติมสารกันเสีย 0.4% เพียงอย่างเดียว พบว่าตัวอย่างโลชั่นที่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* พบการเจริญของจุลินทรีย์ในปริมาณมากจนไม่สามารถนับได้ดังตารางที่ 4.4

โลชั่นสูตรที่ 3 โลชั่นที่มีการเติมน้ำมันหอมระเหย 5% เพียงอย่างเดียว พบว่าตัวอย่างโลชั่นที่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ดังตารางที่ 4.4

โลชั่นสูตรที่ 4 โลชั่นที่มีการเติมทั้งสารกันเสียและน้ำมันหอมระเหย พบว่าตัวอย่างของโลชั่นที่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ดังตารางที่ 4.4

ในส่วนของโลชั่นตัวอย่างที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์พบว่าในโลชั่นสูตรที่ 1 คือ สูตรที่ไม่เติมสารกันเสียและน้ำมันหอมระเหยนั้น บนอาหาร MHA พบการเจริญของจุลินทรีย์ในปริมาณมากจนไม่สามารถนับได้ และไม่พบการเจริญบนอาหาร PDA ในส่วนของโลชั่นสูตรที่ 2 คือ สูตรที่ผสมสารกันเสีย 0.4% นั้น บนอาหาร MHA และ PDA พบการเจริญของจุลินทรีย์ในปริมาณมากจนไม่สามารถนับได้ แต่ในโลชั่นสูตรที่ 3 คือ สูตรที่มีการผสมน้ำมันหอมระเหย 5% และโลชั่นสูตรที่ 4 คือ สูตรที่มีการผสมทั้งสารกันเสียและน้ำมันหอมระเหยนั้นไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหาร MHA และ PDA ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.1 จำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารกันเสียในโลชั่นกันยุงในวันที่ 7

		จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (CFU/mL)											
		<i>C.albicans</i>			<i>E.coli</i>			<i>P.aeruginosa</i>			<i>S.aureus</i>		
		1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย
สูตร โลชั่น	สูตรที่ 1	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
	สูตรที่ 2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	2×10^3	TNTC	TNTC	2.1×10^3	2.1×10^3	2.1×10^3
	สูตรที่ 3	0	0	0	0	0	0	10	0	5	0	0	0
	สูตรที่ 4	0	0	0	10	0	5	0	0	0	0	0	0

หมายเหตุ โลชั่นสูตรที่ 1 หมายถึง โลชั่นที่ไม่เติมสารกันเสียและน้ำมันหอมระเหย
 โลชั่นสูตรที่ 2 หมายถึง โลชั่นที่มีการเติมสารกันเสีย 0.4% เพียงอย่างเดียว
 โลชั่นสูตรที่ 3 หมายถึง โลชั่นที่มีการเติมน้ำมันหอมระเหย 5% เพียงอย่างเดียว
 โลชั่นสูตรที่ 4 หมายถึง โลชั่นที่มีการเติมทั้งสารกันเสีย 0.4% และน้ำมันหอมระเหย 5%
 TNTC (too numerous to count) หมายถึง มีการเจริญของจุลินทรีย์มากจนไม่สามารถนับได้

ตารางที่ 4.2 จำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารกันเสียในโลชั่นกันยุงในวันที่ 14

		จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (CFU/mL)											
		<i>C.albicans</i>			<i>E.coli</i>			<i>P.aeruginosa</i>			<i>S.aureus</i>		
		1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย
สูตร โลชั่น	สูตรที่ 1	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
	สูตรที่ 2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
	สูตรที่ 3	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	สูตรที่ 4	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0

หมายเหตุ

โลชั่นสูตรที่ 1 หมายถึง โลชั่นที่ไม่เติมสารกันเสียและน้ำมันหอมระเหย

โลชั่นสูตรที่ 2 หมายถึง โลชั่นที่มีการเติมสารกันเสีย 0.4% เพียงอย่างเดียว

โลชั่นสูตรที่ 3 หมายถึง โลชั่นที่มีการเติมน้ำมันหอมระเหย 5% เพียงอย่างเดียว

โลชั่นสูตรที่ 4 หมายถึง โลชั่นที่มีการเติมทั้งสารกันเสีย 0.4% และน้ำมันหอมระเหย 5%

TNTC (too numerous to count) หมายถึง มีการเจริญของจุลินทรีย์มากจนไม่สามารถนับได้

ตารางที่ 4.3 จำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารกันเสียในโลชั่นกันยุงในวันที่ 21

		จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (CFU/mL)											
		<i>C.albicans</i>			<i>E.coli</i>			<i>P.aeruginosa</i>			<i>S.aureus</i>		
		1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย
สูตร โลชั่น	สูตรที่ 1	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
	สูตรที่ 2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
	สูตรที่ 3	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
	สูตรที่ 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

หมายเหตุ

โลชั่นสูตรที่ 1 หมายถึง โลชั่นที่ไม่เติมสารกันเสียและน้ำมันหอมระเหย

โลชั่นสูตรที่ 2 หมายถึง โลชั่นที่มีการเติมสารกันเสีย 0.4% เพียงอย่างเดียว

โลชั่นสูตรที่ 3 หมายถึง โลชั่นที่มีการเติมน้ำมันหอมระเหย 5% เพียงอย่างเดียว

โลชั่นสูตรที่ 4 หมายถึง โลชั่นที่มีการเติมทั้งสารกันเสีย 0.4% และน้ำมันหอมระเหย 5%

TNTC (too numerous to count) หมายถึง มีการเจริญของจุลินทรีย์มากจนไม่สามารถนับได้

ตารางที่ 4.4 จำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารกันเสียในโลชั่นกันยุงในวันที่ 28

		จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (CFU/mL)											
		<i>C.albicans</i>			<i>E.coli</i>			<i>P.aeruginosa</i>			<i>S.aureus</i>		
		1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย
สูตร โลชั่น	สูตรที่ 1	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
	สูตรที่ 2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
	สูตรที่ 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	สูตรที่ 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

หมายเหตุ

โลชั่นสูตรที่ 1 หมายถึง โลชั่นที่ไม่เติมสารกันเสียและน้ำมันหอมระเหย

โลชั่นสูตรที่ 2 หมายถึง โลชั่นที่มีการเติมสารกันเสีย 0.4% เพียงอย่างเดียว

โลชั่นสูตรที่ 3 หมายถึง โลชั่นที่มีการเติมน้ำมันหอมระเหย 5% เพียงอย่างเดียว

โลชั่นสูตรที่ 4 หมายถึง โลชั่นที่มีการเติมทั้งสารกันเสีย 0.4% และน้ำมันหอมระเหย 5%

TNTC (too numerous to count) หมายถึง มีการเจริญของจุลินทรีย์มากจนไม่สามารถนับได้

ตารางที่ 4.5 จำนวนจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในโลชั่นกันยุงที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ในวันที่ 7

สูตรโลชั่น	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU/ml)	
	อาหาร MHA	อาหาร PDA
สูตรที่ 1	TNTC	TNTC
สูตรที่ 2	5.8×10^2	4.6×10^2
สูตรที่ 3	0	0
สูตรที่ 4	0	0

ตารางที่ 4.6 จำนวนจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในโลชั่นกันยุงที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ในวันที่ 14

สูตรโลชั่น	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU/ml)	
	อาหาร MHA	อาหาร PDA
สูตรที่ 1	TNTC	8×10^2
สูตรที่ 2	TNTC	80
สูตรที่ 3	0	10
สูตรที่ 4	0	10

ตารางที่ 4.7 จำนวนจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในโลชั่นกันยุงที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ในวันที่ 21

สูตรโลชั่น	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU/ml)	
	อาหาร MHA	อาหาร PDA
สูตรที่ 1	TNTC	10
สูตรที่ 2	TNTC	6.9×10^2
สูตรที่ 3	0	0
สูตรที่ 4	0	0

ตารางที่ 4.8 จำนวนจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในโลชั่นกันยุงที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ในวันที่ 28

สูตรโลชั่น	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU/ml)	
	อาหาร MHA	อาหาร PDA
สูตรที่ 1	TNTC	0
สูตรที่ 2	TNTC	TNTC
สูตรที่ 3	0	0
สูตรที่ 4	0	0

หมายเหตุ

โลชั่นสูตรที่ 1 หมายถึง โลชั่นที่ไม่มีการเติมสารกันเสียและน้ำมันหอมระเหย

โลชั่นสูตรที่ 2 หมายถึง โลชั่นที่เติมสารกันเสีย 0.4% เพียงอย่างเดียว

โลชั่นสูตรที่ 3 หมายถึง โลชั่นที่เติมน้ำมันหอมระเหย 5% เพียงอย่างเดียว

โลชั่นสูตรที่ 4 หมายถึง โลชั่นที่เติมสารกันเสีย 0.4% และน้ำมันหอมระเหย 5%

TNTC (too numerous to count) หมายถึง มีการเจริญของจุลินทรีย์มากจนไม่สามารถนับได้

4.2 การหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) และการหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Bactericidal Concentration : MBC)

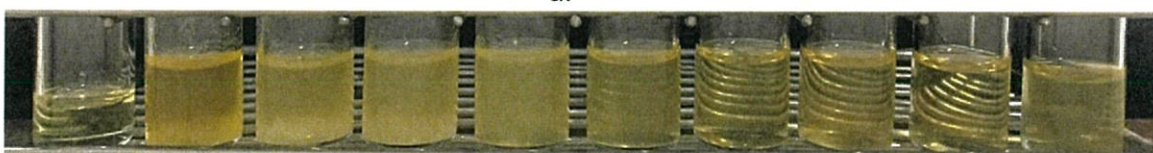
4.2.1 การทดสอบหา MIC และ MBC ของ *Candida albicans*

เมื่อทำการเติมเชื้อ *C.albicans* ปริมาตรที่เท่ากันลงในสารละลายน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่างๆและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาสังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้น จะสามารถสังเกตเห็นได้ว่าความขุ่นนั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงในทุกๆความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนนำไปบ่ม แสดงให้เห็นว่าในหลอดที่มีน้ำมันหอมระเหยในทุกๆความเข้มข้นนั้นไม่มีการเจริญของ *C.albicans* เกิดขึ้นดังแสดงในรูปที่ 4.1 จึงนำหลอดที่มีความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไม่มีการเจริญของ *C.albicans* คือ 0.015% และความเข้มข้นที่มากกว่า 2 ความเข้มข้น คือ 0.031% และ 0.063% ทดสอบด้วยวิธี MBC โดยการ spread plate บนอาหาร PDA จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้น 0.015% ,0.031% และ 0.063% ไม่มีการเจริญของ *C.albicans* เกิดขึ้นดังแสดงในรูปที่ 4.2 จึงสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญและความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการฆ่าเชื้อ *C.albicans* คือ 0.015% หรือคิดเป็น 0.15 mg/ml เนื่องจากในการทดสอบ MIC ที่ความเข้มข้น 0.015% นั้นเป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ และในการทดสอบ MBC ที่ความเข้มข้น 0.015% นั้นก็เป็นความเข้มข้นที่ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์เช่นเดียวกัน



100.000%, 2.000%, 1.000%, 0.500%, 0.250%, 0.125%, 0.063%, 0.031%, 0.015%, 0.000%

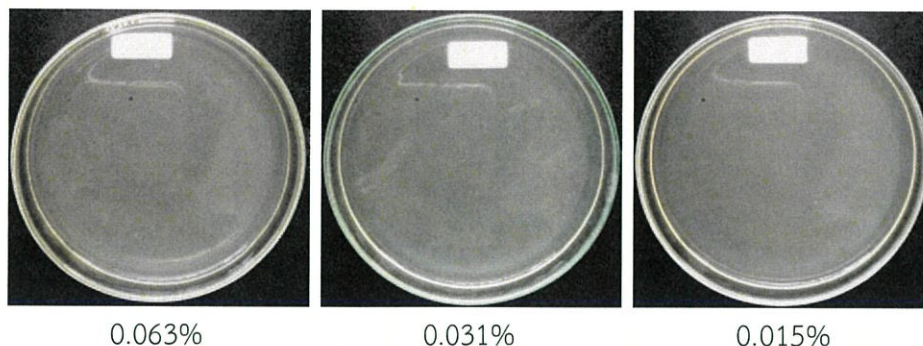
a.



100.000%, 2.000%, 1.000%, 0.500%, 0.250%, 0.125%, 0.063%, 0.031%, 0.015%, 0.000%

b.

รูปที่ 4.1 อาหาร NB ที่เติมน้ำมันหอมระเหยในความเข้มข้นที่แตกต่างกันและเติมเชื้อ *C.albicans* ก่อนนำไปบ่ม (a.) และหลังนำไปบ่ม (b.)



รูปที่ 4.2 การทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถฆ่าเชื้อ *C.albicans*

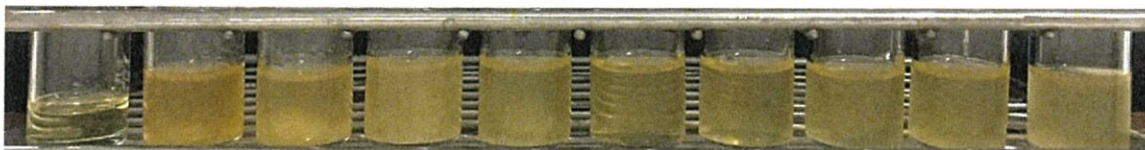
4.2.2 การทดสอบหา MIC และ MBC ของ *Escherichia coli*

เมื่อทำการเติมเชื้อ *E.coli* ปริมาตรที่เท่ากันลงในสารละลายน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่างๆและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาสังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้นจะสามารถสังเกตได้ว่าความขุ่นนั้นมีการเปลี่ยนแปลงในทุกๆความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนนำไปบ่ม นอกจากนี้หลังการนำไปบ่มยังพบการเกิดตะกอนที่ความเข้มข้น 2.000% และ 1.000% แสดงให้เห็นว่าในหลอดที่มีน้ำมันหอมระเหยทุกๆความเข้มข้นนั้นมีการเจริญของ *E.coli* เกิดขึ้นดังแสดงในรูปที่ 4.3 จึงนำหลอดที่มีความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่มีการเจริญของ *E.coli* คือ 2.000% และความเข้มข้นที่น้อยกว่า 2 ความเข้มข้น คือ 1.000% และ 0.500% ทดสอบด้วยวิธี MBC โดยการ spread plate บนอาหาร MHA จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้น 2.000% ,1.000% และ 0.500% มีการเจริญของ *E.coli* เกิดขึ้นดังแสดงในรูปที่ 4.3 จึงสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญและการฆ่าเชื้อ *E.coli* คือ มากกว่า 2.000% หรือคิดเป็น มากกว่า 20.00 mg/ml เนื่องจากการทดสอบ MIC ที่ความเข้มข้น 2.000% นั้นมีการเจริญของจุลินทรีย์ และในการทดสอบ MBC ที่ความเข้มข้น 2.000% นั้นก็มีการเจริญของจุลินทรีย์เช่นเดียวกัน



100.000%, 2.000%, 1.000%, 0.500%, 0.250%, 0.125%, 0.063%, 0.031%, 0.015%, 0.000%

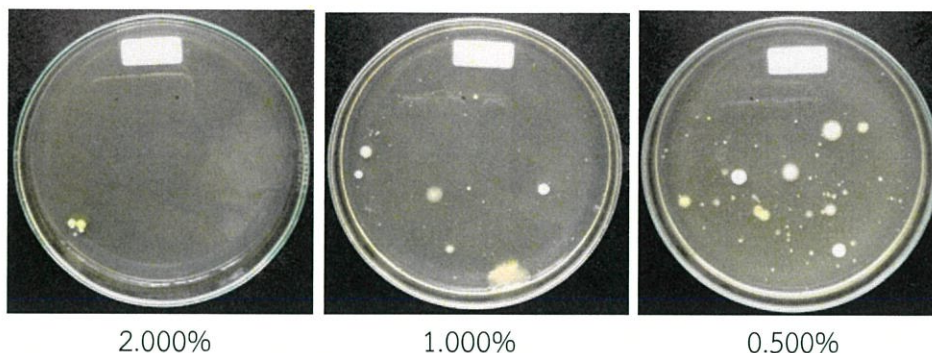
a.



100.000%, 2.000%, 1.000%, 0.500%, 0.250%, 0.125%, 0.063%, 0.031%, 0.015%, 0.000%

b.

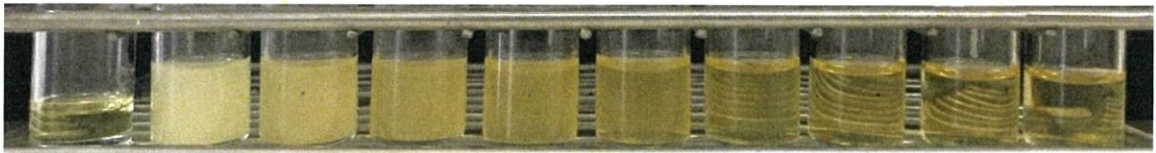
รูปที่ 4.3 อาหาร NB ที่เติมน้ำมันหอมระเหยในความเข้มข้นที่แตกต่างกันและเติมเชื้อ *E.coli* ก่อนนำไปบ่ม (a.) และหลังนำไปบ่ม (b.)



รูปที่ 4.4 การทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถฆ่าเชื้อ *E.coli*

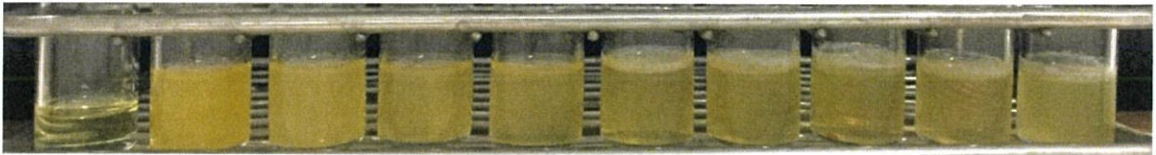
4.2.3 การทดสอบหา MIC และ MBC ของ *Pseudomonas aeruginosa*

เมื่อทำการเติมเชื้อ *P.aeruginosa* ลงในสารละลายน้ำมันหอมระเหยที่มีความเข้มข้นต่างๆ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาสังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้น จะสามารถสังเกตได้ว่าความขุ่นนั้นมีการเปลี่ยนแปลงในหลอดที่มีความเข้มข้น 0.125% ,0.063% ,0.031% และ 0.015% เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนนำไปบ่ม นอกจากนี้ยังพบฟองแก๊สเกิดขึ้นในหลอดที่มีความเข้มข้น 0.125% ,0.063% ,0.031% และ 0.015% แสดงให้เห็นว่าในหลอดที่มีความเข้มข้น 0.125% ,0.063% ,0.031% และ 0.015% ของน้ำมันหอมระเหยนั้นมีการเจริญของ *P.aeruginosa* เกิดขึ้นดังแสดงในรูปที่ 4.5 จึงนำหลอดที่มีความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไม่มีการเจริญของ *P.aeruginosa* คือ 0.250% และความเข้มข้นที่มากกว่า 2 ความเข้มข้น คือ 0.500% และ 1.000% ทดสอบด้วยวิธี MBC โดยการ spread plate บนอาหาร MHA จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงพบว่าที่ความเข้มข้น 0.250% มีการเจริญของ *P.aeruginosa* แต่ที่ความเข้มข้น 0.500% และ 1.000% ไม่มีการเจริญของ *P.aeruginosa* ดังแสดงในรูปที่ 4.6 จึงสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.aeruginosa* คือ 0.250% หรือคิดเป็น 2.590 mg/ml เนื่องจากในการทดสอบ MIC ที่ความเข้มข้น 0.250% นั้นไม่มีการเจริญเชื้อเกิดขึ้นโดยสังเกตจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงของความขุ่นและไม่เกิดฟองแก๊ส ส่วนความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการฆ่าเชื้อ *P.aeruginosa* คือ 0.500% หรือคิดเป็น 5.00 mg/ml เนื่องจากในการทดสอบ MBC ที่ความเข้มข้น 0.500% เป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ *P.aeruginosa*



100.000%, 2.000%, 1.000%, 0.500%, 0.250%, 0.125%, 0.063%, 0.031%, 0.015%, 0.000%

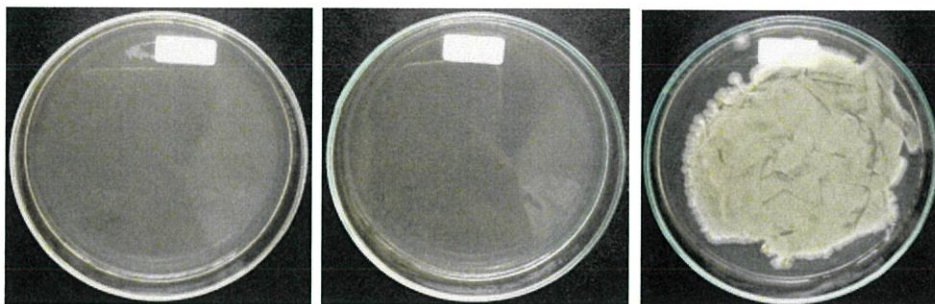
a.



100.000%, 2.000%, 1.000%, 0.500%, 0.250%, 0.125%, 0.063%, 0.031%, 0.015%, 0.000%

b.

รูปที่ 4.5 อาหาร NB ที่เติมน้ำมันหอมระเหยในความเข้มข้นที่แตกต่างกันและเติมเชื้อ *P.aeruginosa* ก่อนนำไปป่ม (a.) และหลังนำไปป่ม (b.)



1.000%

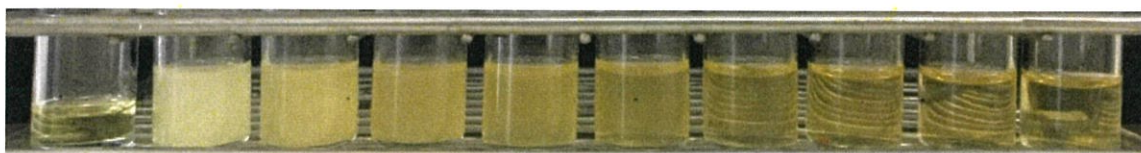
0.500%

0.250%

รูปที่ 4.6 การทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถฆ่าเชื้อ *P.aeruginosa*

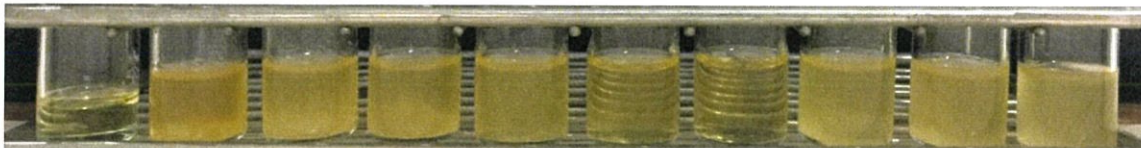
4.2.4 การ ทดสอบหา MIC และ MBC ของ *Staphylococcus aureus*

เมื่อทำการเติมเชื้อ *S.aureus* ลงในสารละลายน้ำมันหอมระเหยที่มีความเข้มข้นต่างๆ และนำไปป่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาสังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้น จะสามารถสังเกตเห็นได้ว่าความขุ่นนั้นมีการเปลี่ยนแปลงในหลอดที่มีความเข้มข้น 0.031% และ 0.015% เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนนำไปป่ม แสดงให้เห็นว่าในหลอดที่มีความเข้มข้น 0.031% และ 0.015% ของน้ำมันหอมระเหยมีการเจริญของ *S.aureus* เกิดขึ้นดังแสดงในรูปที่ 4.7 จึงนำหลอดที่มีความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่มีการเจริญของ *S.aureus* คือ 0.062% และความเข้มข้นที่มากกว่า 2 ความเข้มข้น คือ 0.125% และ 0.250% ทดสอบด้วยวิธี MBC โดยการ spread plate บนอาหาร MHA จากนั้นจึงนำไปป่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้น 0.063% มีการเจริญของ *S.aureus* แต่ที่ความเข้มข้น 0.125% และ 0.250% ไม่มีการเจริญของ *S.aureus* ดังแสดงในรูปที่ 4.8 จึงสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.aureus* คือ 0.063% หรือคิดเป็น 0.63 mg/ml เนื่องจากการทดสอบ MIC ที่ความเข้มข้น 0.063% นั้นไม่มีการเจริญของเชื้อเกิดขึ้นโดยการสังเกตจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงของความขุ่น ส่วนความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการฆ่าเชื้อ *S.aureus* คือ 0.125% หรือคิดเป็น 1.25 mg/ml เนื่องจากการทดสอบ MBC ที่ความเข้มข้น 0.125% เป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ *S.aureus*



100.000%, 2.000%, 1.000%, 0.500%, 0.250%, 0.125%, 0.063%, 0.031%, 0.015%, 0.000%

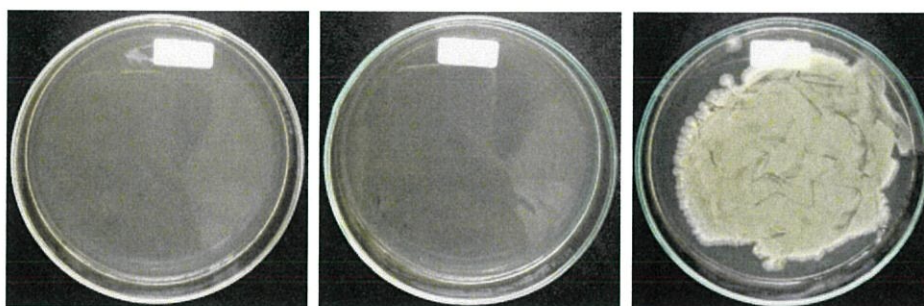
a.



100.000%, 2.000%, 1.000%, 0.500%, 0.250%, 0.125%, 0.063%, 0.031%, 0.015%, 0.000%

b.

รูปที่ 4.7 อาหาร NB ที่เติมน้ำมันหอมระเหยในความเข้มข้นที่แตกต่างกันและเติมเชื้อ *S.aureus* ก่อนนำไปปั๊ม (a.) และหลังนำไปปั๊ม (b.)



0.25%

0.125%

0.063%

รูปที่ 4.8 การทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถฆ่าเชื้อ *S.aureus*

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

5.1 สรุปผลการวิจัย

การประเมินประสิทธิภาพของสารกันเสียในผลิตภัณฑ์โลชั่นกันยุงในการศึกษานี้ได้ทำการผลิตโลชั่นขึ้น มาทั้งหมด 4 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 โลชั่นที่ไม่เติมสารกันเสียและน้ำมันหอมระเหย, สูตรที่ 2 โลชั่นกันยุงที่เติมสารกันเสีย 0.4% เพียงอย่างเดียว, สูตรที่ 3 โลชั่นกันยุงที่เติมน้ำมันหอมระเหย 5% เพียงอย่างเดียว และสูตรที่ 4 โลชั่นกันยุงที่เติมสารกันเสีย 0.4% และน้ำมันหอมระเหย 5% และนำมาทดสอบเพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารกันเสียในผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการทางด้านจุลชีววิทยา โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* ในการทดสอบ พบว่าโลชั่นสูตรที่ 1 และ 2 พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิดในทุกๆระยะการบ่ม และจำนวนเชื้อที่เจริญขึ้น มีจำนวนมากจนไม่สามารถนับได้ แต่ในส่วนของโลชั่นสูตรที่ 3 และ 4 นั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ทุกชนิด แต่ยังพบการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* จำนวน 10-20 CFU/ml ในระยะการบ่มที่ T7, T14 และ T21 แต่เมื่อครบกำหนดที่ระยะ T28 นั้นไม่พบการเจริญของเชื้อทุกๆชนิดในการทดสอบ

จากการประเมินประสิทธิภาพของสารกันเสียในผลิตภัณฑ์โลชั่นกันยุงนั้นทำให้ทราบว่าน้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติในการต้านทานการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิดนั้น จึงเกิดการทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) และความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MBC) ของน้ำมันหอมระเหยขึ้น พบว่าน้ำมันหอมระเหยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ *C.albicans* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *S.aureus*, *P. aeruginosa* และ *E.coli* โดยมีค่า MIC คือ 0.15, 0.63, 2.50 และ >20.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และมีค่า MBC คือ 0.15, 1.25, 5.00 และ >20.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 5.1

เชื้อจุลินทรีย์	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	
	MIC	MBC
<i>Candida albicans</i>	0.15	0.15
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.63	1.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.50	5.00
<i>Escherichia coli</i>	>20.00	>20.00

ตารางที่ 5.1 ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเชิงผสมที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml)

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

จากการประเมินประสิทธิภาพของสารกันเสียในโลชั่นกันยุงที่มีเติมของสารกันเสีย 2 ชนิด ได้แก่ Phenoxyethanol และ Ethylhexylglycerine ความเข้มข้น 0.4% ซึ่งพบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิดมากจนไม่สามารถนับจำนวนได้ อันเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารกันเสียทั้ง Phenoxyethanol และ Ethylhexylglycerine ได้มีการแนะนำระดับความเข้มข้นที่ใช้สำหรับเติมลงไปในการผลิตว่า ควรมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5-1% ในผลิตภัณฑ์ชนิดโลชั่น ซึ่งผลิตภัณฑ์บำรุงผิวและเครื่องสำอางนั้นมีโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งในขั้นตอนการผลิต และหลังจากการเปิดใช้งาน ซึ่งเป็นผลทำให้อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์นั้นสั้นลง และยังเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เนื้อสัมผัสและความคงตัวของผลิตภัณฑ์นั้นเปลี่ยนไป เช่น เกิดการตกตะกอน ความหนืด สี และกลิ่นของผลิตภัณฑ์ที่เปลี่ยนไป โดยการทดสอบ Challenge test นั้นเป็นการทดสอบประสิทธิภาพของสารกันเสียและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยา ซึ่งเป็นการทดสอบตามมาตรฐาน ISO 11930 ที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์บำรุงผิวและเครื่องสำอางในประเทศไทย เพื่อเป็นการประเมินและยืนยันประสิทธิภาพของสารกันเสียในผลิตภัณฑ์ในการต้านทานการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้จากงานวิจัยของ Brannan D.K. *et al.* (1987) ที่ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของการประเมินประสิทธิภาพของสารกันเสียด้วยวิธี Challenge test โดยจำลองการทดสอบการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์หลังการเปิดใช้งาน ได้กล่าวไว้ว่าผลิตภัณฑ์โลชั่นทาผิวนั้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการสัมผัสกับผิวของผู้บริโภคมาก ซึ่งในการตรวจสอบเชื้อ จุลินทรีย์ที่พบได้บนผิวนั้นพบว่าจุลินทรีย์มีความไวต่อสารกันเสีย ดังนั้นโลชั่นที่มีการใส่สารกันเสียก็จะพบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในปริมาณน้อยหรือกล่าวคือไม่พบการเจริญของเชื้อเลย โลชั่นที่เติมสารกันเสียจึงมีความทนทานต่อเชื้อหลังจากการเปิดใช้งานแล้ว

ในปัจจุบันพบผู้บริโภคที่มีอาการแพ้สารกันเสียเพิ่มมากขึ้น สารกันเสียนั้นถูกใช้เป็นส่วนประกอบที่ใช้ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยสารกันเสียบางชนิดสามารถกระตุ้นอาการแพ้ ซึ่งผู้ที่มีอาการแพ้ อาจเกิดอาการผื่นแดงตามบริเวณที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์ชนิดนั้นๆ หรืออาจมีอาการบวมร่วมด้วย ทางผู้ผลิตผลิตภัณฑ์บำรุงผิวและเครื่องสำอางหลายๆกลุ่มได้มีการคิดค้น วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางเลือกมากขึ้น โดยได้มีการคิดค้นสารกันเสียที่มาจากธรรมชาติ หรือแม้แต่การใช้ไขมันหอมระเหย ที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญจุลินทรีย์และสามารถเพิ่มกลิ่นหอมให้แก่ผลิตภัณฑ์ได้ จากการศึกษาพบว่าโลชั่นกันยุงที่ใช้ไขมันหอมระเหยเป็นส่วนกันเสียนั้น มีความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และใช้ไขมันหอมระเหยในปริมาณไม่มาก อีกทั้งยังสามารถลดปริมาณการใช้ไขมันหอมระเหยได้จากการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิตผลิตภัณฑ์จากการใช้สารกันเสียและน้ำหอมในอีกทางหนึ่ง

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของสารกันเสียในผลิตภัณฑ์นั้น ควรเริ่มทดสอบตั้งแต่วิธีการบ่มวันที่ 0 (T0) เพื่อให้สามารถทราบถึงปริมาณจุลินทรีย์ที่แท้จริงในผลิตภัณฑ์ได้
2. เมื่อพบว่าในตัวอย่างของโลชั่นนั้นมีปริมาณของเชื้อที่เจริญมากจนไม่สามารถนับได้ ควรทำการเจือจางตัวอย่างจนทำให้สามารถนับปริมาณเชื้อที่อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี

3. ในการทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้นั้นควรใช้สารที่เป็นตัวทำละลายชนิด Dimethyl Sulfoxide (DMSO) แทน methanol เนื่องจากตัวทำละลายชนิดนี้ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อจุลินทรีย์ และเมื่อเจือจางกับน้ำมันหอมระเหย จะไม่ทำให้น้ำมันหอมระเหยเกิดความขุ่นเมื่อผสมกับน้ำ ทำให้สะดวกต่อการสังเกตผลการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในขณะการทดสอบ
4. ในการทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญและความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการฆ่าเชื้อ *Escherichia coli* ควรใช้ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยมากกว่า 2% ในการทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

- จิราภรณ์ สุวรรณชาติ, นัฐพล คำธร, วีรวรรณ หนูแดง และมณฑล เลิศคณาวนิชกุล. 2554. ฤทธิ์ต้าน *Candida albicans* ของสารสำคัญจากผลยอ. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
- ชนาพร สันตะวาฬิม และณัฐญาภรณ์ ทับทิม. 2557. การตรวจสอบประสิทธิภาพสารกันเสีย (Challenge test) ในโลชั่นบำรุงผิวจากสารสกัดบัวบกและแตงกวา. สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ฐาปณีย์ หงส์รัตนารกิจ. 2550. น้ำมันหอมระเหยและการใช้ในสுகนธบำบัด. นครนายก : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- ธนาภ ใสรัดวม, เกศรินทร์ เพ็ชรรัตน์, นพพร สุกุลยนิยงสุข, ดวงกมล ตั้งสฤติพร, ดวงรัตน์ แซ่ตั้ง และกิตติ ช้องประเสริฐ. 2558. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.* ของสารสกัดจากหอมหัวใหญ่. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร
- นิติพงษ์ ศิริวงศ์ และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์. 2552. การดื้อยาปฏิชีวนะของ *Staphylococcus aureus* และแนวทางการควบคุม. สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
- พินิจ กล้าคลองตัน. 2553. การแพร่กระจายของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในสถานพยาบาล. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
- พิมพ์ร ลีลาพิสิทธิ์. 2532. ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับอิมัลชัน. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์
- ลลิตา คชารัตน์ม ประภัสสร รักถาวรม อุดมลักษณ์ สุขอัดถะ และเกสรี่ กลิ่นสุคนธ์. 2559. การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนในห้องน้ำสาธารณะด้วยน้ำมันหอมระเหยพลู น้ำมันหอมระเหยพลูผสมกับน้ำมันหอมระเหยสมุนไพรร และสูตรผสมน้ำมันหอมระเหยที่มีน้ำมันหอมระเหยพลูเป็นองค์ประกอบหลัก. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 54
- วฤชณี ปรีชานฤชิตกุล. 2554. สิ่งเล็กๆที่เรียกว่าอีโคโล. หนังสือพิมพ์กสิกร, หน้า 77-82.
- ศิริเพ็ญ จริเกษม, ศรินันท์ ทับทิมเทศ, ธัญวรรณ์ กางสงคราม และอุบล ฤกษ์อำ. 2548. น้ำมันหอมระเหยไทย. ปทุมธานี : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.
- สุนทรี สิงหนุตตรา. 2536. สรรพคุณสมุนไพรร 200 ชนิด. กรุงเทพฯ : โอ.เอส.พรีนติ้งเฮ้าส์
- Brannan D.K., Dille C.J., Kaufman D.J. 1987. Correlation of In Vitro Challenge Testing with Consumer Use Testing for Cosmetics Products. Applied and environmental microbiology. Aug. 1987, 1827-1832.
- Ferreira M.R.S., Lourenco F.R., Ohara M.T., Bou-Chacra N.A. and Pinto T.J.A. 2014. An innovative challenge for solid cosmetics using freeze-dried microorganisms and electrical methods. Journal of Microbiological Methoda 106, 104-109.

- Khayyat S. 2017. **Thermal, photo-oxidation and antimicrobial studies of linalyl acetate as a major ingredient of lavender essential oil.** Jeddah : Arabian Journal of Chemistry.
- Lobo-Sánchez M., Nájera-Meléndez G., Luna G., Segura-Pérez V., Rivera J.A. and Fetter G. 2018. **ZnAl layered double hydroxides impregnated with eucalyptus oil as efficient hybrid materials against multi-resistant bacteria.** Puebla : Applied Clay Science, 61-69.
- Pasquet J., Chevalier Y., Coural E., Bovier D. and Bolzinger M.A. 2015. **Zinc oxide as a new antimicrobial preservative of topical products Interaction with common formulation ingredients.** International Journal of Pharmaceutic 479, 88-95.
- Riffell J. 2018, **If you swat mosquitoes, they may learn to avoid your scent.** UW NEWS University of Washington
แหล่งข้อมูล: <https://www.washington.edu/news/2018/01/25/if-you-swat-mosquitoes-they-may-learn-to-avoid-your-scent/> (สืบค้นเมื่อ 7 เมษายน 2561)
- Siegert W. 2013. **Comparison of microbial challenge testing methods for cosmetics.** Household and Personal Care today, Vol.8(2), 32-38.
- Svarc-Gajic J., Cvetanovic A., Segura-Carretero A., Linares I.B., Maskovic P. 2017. **Characterisation of Ginger Extract Obtained by subcritical water.** Bulevar Cara Lazara : The Journal of Supercritical Fluids, 92-100.
- Zhang S., Zhang M., Fang Z., Liu Y. 2016. **Preparation and characterization of blended cloves/cinnamon essential oil nanoemulsions.** Wuxi : LWT-Food science and Technology, 316-322.

