# บทที่ 3

# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## 1. น้ำผึ้งที่ใช้ในการศึกษา

**ตาราง 5** ตัวอย่างน้ำผึ้งที่ใช้ทดสอบ

| ตัวอย่างน้ำผึ้ง | ช่วงเวลาเก็บตัวอย่าง |
|---|---|
| น้ำผึ้งลำไย -1 | 2550 |
| น้ำผึ้งลำไย -2 | 2550 |
| น้ำผึ้งลำไย -3 | 2550 |
| น้ำผึ้งลำไย -4 | 2550 |
| น้ำผึ้งสาบเสือ -1 | 2550 |
| น้ำผึ้งสาบเสือ -2 | 2550 |
| น้ำผึ้งสาบเสือ -3 | 2550 |
| น้ำผึ้งสาบเสือ -4 | 2550 |
| น้ำผึ้งสาบเสือ -5 | 2550 |
| น้ำผึ้งลิ้นจี่ -1 | 2550 |
| น้ำผึ้งลิ้นจี่ -2 | 2550 |
| น้ำผึ้งลิ้นจี่ -3 | 2550 |
| น้ำผึ้งทานตะวัน -1 | 2550 |
| น้ำผึ้งทานตะวัน -2 | 2550 |
| น้ำผึ้งทานตะวัน -3 | 2550 |
| น้ำผึ้งงา -1 | 2550 |
| น้ำผึ้งงา -2 | 2551 |
| น้ำผึ้งงา -3 | 2551 |
| น้ำผึ้งยางพารา -1 | 2550 |
| น้ำผึ้งยางพารา -2 | 2551 |
| น้ำผึ้งยางพารา -3 | 2551 |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตาราง 5 ต่อ**

| ตัวอย่างน้ำผึ้ง | ช่วงเวลาเก็บตัวอย่าง |
|---|---|
| น้ำผึ้งเงาะ -1 | 2550 |
| น้ำผึ้งเงาะ -2 | 2551 |
| น้ำผึ้งนุ่น -1 | 2550 |
| น้ำผึ้งนุ่น -2 | 2551 |
| น้ำผึ้งนุ่น -3 | 2551 |
| น้ำผึ้งดอกไม้ป่า -1 | 2550 |
| น้ำผึ้งดอกไม้ป่า -2 | 2551 |
| น้ำผึ้งดอกไม้ป่า -3 | 2551 |
| น้ำผึ้งมานูก้า | 2550 |

น้ำผึ้งได้มาจากร้านค้าในจังหวัดเชียงใหม่ และ น้ำผึ้งมานูก้า UMF 20+ จากประเทศนิวซีแลนด์

**2. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ**

2.1 *Serratia marcescens* DMST 21632

2.2 *Salmonella typhimurium* DMST 562

2.3 *Klebsiella pneumoniae* DMST 8216

2.4 *Listeria monocytogenes* DMST 17303

2.5 *Micrococcus luteus* DMST 15503

2.6 *Proteus mirabilis* DMST 8212

2.7 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

2.8 *Propionibacterium acnes* DMST 14916

2.9 *Staphylococcus epidermidis* DMST 15505

2.10 *Streptococcus pyogenes* DMST 17020

2.11 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20625

2.12 *Bacillus cereus* TISTR 687

2.13 *Escherichia coli* ATCC 25922

2.14 *Staphylococcus aureus* TISTR 517

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**3. ยีสต์ที่ใช้ในการทดสอบ**

3.1 *Candida albicans* ATCC 10231

3.2 *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5343

**หมายเหตุ** : เชื้อแบคทีเรีย 11 ชนิดแรก ได้มาจาก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ส่วนอีก 5 ชนิด ได้มาจาก สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

**4. อาหารเลี้ยงเชื้อ**

3.1 Nutrient agar (NA)

3.2 Tryptic Soy agar (TSA)

3.3 Yeast extract Malt extract agar (YMA)

3.4 Nutrient broth (NB)

3.5 Tryptic Soy broth (TSB)

3.6 Yeast extract Malt extract broth (YMB)

**5. สารเคมี**

4.1 ชุดสีย้อมแกรม (Crystalviolet, iodine, decolorizer และ eosin)

4.2 Amberlite XAD-2 resin (Supelco)

4.3 DPPH$^{\cdot}$ (Fluka, USA)

4.4 methanol (Merck)

4.5 Ethanol 70, 95%

4.6 น้ำกลั่น

4.7 Deionized water

4.8 Ascorbic acid (Ajax Finechem, Australia)

4.9 Folin-Ciocalteu reagent (Merck, Germany)

4.10 Gallic acid (Fluka, Spain)

4.11 Sugar analogue (ภาคผนวก ฉ)

4.12 Artificial honey (ภาคผนวก ฉ)

4.13 Kaempferol (Sigma)

4.14 Myricetin (Fluka)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.15 Hesperetin (Sigma)

4.16 Chrysin (Fluka)

4.17 Luteolin (Sigma)

4.18 Ellagic acid (Fluka)

4.19 Quercetin (Sigma)

4.20 Diethyl ether

4.21 Carbopol 940 (OV)

4.22 Glycerin (OV)

4.23 Vitamin E (OV)

4.24 Salicylic acid (OV)

4.25 PEG 400 (Fluka)

4.26 Paraben (OV)

4.27 EDTA (Fluka)

4.28 Gentamycin (Bio Basic INC.)

4.29 Mentholatum (ภาคผนวก ฉ)

**6. เครื่องมือ**

5.1 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Olympus รุ่น CX 31)

5.2 เครื่องชั่งสาร (Mettler Toledo รุ่น PG802-s)

5.3 ตู้ถ่าย (Holten)

5.4 ตู้เย็นเก็บสารเคมี (National)

5.5 Autoclave (Tomy รุ่น ss-325)

5.6 Autopipette (Biohit)

5.7 Anaerobic jar

5.8 Hot air oven (Binder)

5.9 Rotary evaporator (Buchi รุ่น R-200)

5.10 Spectrophotometer (Helosis)

5.11 Vortex mixer (Bibby รุ่น Genie 2)

5.12 pH meter (Metrohm)

5.14 Water bath (Julabo)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.15 brookfield viscometer

**7. อุปกรณ์**

6.1 กระบอกตวง ขนาด 10, 100, 500 ml

6.2 ขวดฝาดำขนาด 15 ml

6.3 ขวด Duran ขนาด 250, 500, 1,000 ml

6.4 ห่วงถ่ายเชื้อ

6.5 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

6.6 ช้อนตักสาร

6.7 บีกเกอร์แก้วขนาด 100, 250, 500 ml

6.8 Spreader

6.9 Pipette tip

6.10 หลอดทดลอง

6.11 บีกเกอร์สแตนเลสขนาด 500, 1,000 ml

6.12 Column ขนาด 2.5×50 cm

6.13 Stand

6.14 หลอดพลาสติกขนาด 25, 50 ml

6.15 ถ้วยพลาสติกชั่งสาร

6.16 ตะเกียงบุนเสน

**วิธีการวิจัย**

1. **การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ของน้ำผึ้ง โดยวิธี agar incorporation technique** (Cooper, 2002)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียและยีสต์จาก stock culture ใส่ลงในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแต่ละชนิด ซึ่งมี nutrient broth, tryptic soy broth และ yeast extract malt extract broth (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 ml หลังจากนั้นนำแบคทีเรียไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *P. acnes* เพาะเลี้ยงใน anaerobic jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนยีสต์นำไปบ่มที่ 25 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

นำเชื้อที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm เท่ากับ 0.5

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar, tryptic soy agar และ yeast extract malt extract agar (ภาคผนวก ก) ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า 10 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เตรียม stock น้ำผึ้งที่ 20% และ 60% (v/v) โดยนำน้ำผึ้งละลายในน้ำกลั่นไร้เชื้อ

ทำการเจือจางน้ำผึ้งในน้ำกลั่นไร้เชื้อ โดยมีความเข้มข้นที่ระหว่าง 1-30 % (v/v) ให้มีปริมาตร 10 ml

นำน้ำผึ้งผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ เทลงในอาหารแล้วทำการ pour plate และตรวจหาค่า MIC

นำ plate ไปไว้ที่ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที

นำ 0.5 µl ของเชื้อที่ใช้ทดสอบหยดลงในอาหารที่เตรียมไว้โดยใช้ autopipette

นำ plate บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำเป็นจำนวน 3 ซ้ำ แล้วสังเกตผลการยับยั้ง

**2. การวิเคราะห์ DPPH· radical scavenging activity** (Meda, 2005)

2.1 นำน้ำผึ้งมาทำเป็นสารละลาย โดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย โดยใช้น้ำผึ้งที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1-100 % (v/v)

2.2 เตรียมสารละลาย DPPH· ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.02 mg/ml

2.3 ดูดสารละลายน้ำผึ้งแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.75 ml ใส่ลงในสารละลาย DPPH· ปริมาตร 1.5 ml

2.4 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ด้วย spectrophotometer ทำเป็นจำนวน 3 ซ้ำ

2.6 ใช้ methanol เป็น blank, ascorbic acid ความเข้มข้น 1-6 (mg/l) เป็น positive control และ sugar analogue เป็น negative control

2.7 นำค่าที่ได้มาคำนวณหา % inhibition ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{517} \text{ Control} - A_{517} \text{ Sample}) / A_{517} \text{ Control}] \times 100$$

**3. การตรวจหาปริมาณของ phenolic compound** (Beretta, 2005)

นำน้ำผึ้ง 500 mg มาทำเป็นสารละลายโดยใช้น้ำกลั่นที่อุ่นปริมาตร 5 ml ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 100 mg/ml

เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu ในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 ผสมให้เข้ากัน

ดูดสารละลายน้ำผึ้ง ความเข้มข้น 100 mg/ml ปริมาตร 100 µl ใส่ลงในสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 1 ml

เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ($Na_2CO_3$) 7.5% ปริมาตร 2 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ทิ้งไว้ 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm ด้วย spectrophotometer ทำเป็นจำนวน 3 ซ้ำ

ใช้น้ำกลั่นเป็น blank และ gallic acid เป็น positive control และ sugar analogue เป็น negative control

ทำกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด โดยใช้สารละลายมาตรฐานของ gallic acid ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 µl/ml ปริมาตร 100 µl ผสมให้เข้ากันแล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้างต้น

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ ไปวาดกราฟมาตรฐานให้แกนตั้งเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm และแกนนอนเป็นความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน หน่วยเป็น µl/ml

**4. การสกัดแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยวิธี column chromatography**

**(**Baltrušaitytė, 2007)

การเตรียม column

ชั่ง Amberlite XAD-2 resin 60 g

นำมาแช่ใน methanol เป็นเวลา 10 นาที

เท methanol ออก เติมน้ำกลั่นเข้าไปแทนทิ้งไว้เป็นเวลา 5-10 นาที

แพ็คเรซินใน column แก้วขนาด 25×2 cm

เตรียมน้ำผึ้ง 50 g ละลายใน acidified water ที่มีค่า pH = 2 ปริมาตร 250 ml

นำสารละลายน้ำผึ้งกรองผ่าน column ที่เป็น Amberlite XAD-2 resin

ล้าง column ด้วย acidified water ที่มีค่า pH = 2 ปริมาตร 250 ml

ล้าง column ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 300 ml

ใช้ methanol ปริมาตร 250 ml ชะสารที่เราต้องการออกมา

ระเหย methanol ออกโดยใช้ rotary evaporator ที่ 40 $^{\circ}$C

นำผลึกสารที่ได้ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 5 ml

นำมาสกัดด้วย diethyl ether ปริมาตร 5 ml จำนวน 3 ครั้ง ทำเป็นจำนวน 2 ซ้ำ

นำไปวิเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยเทคนิค HPLC

**5. การวิเคราะห์สาร โดยเทคนิค HPLC**

ส่งตัวอย่างสารสกัดน้ำผึ้งวิเคราะห์หาสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ณ ห้องปฏิบัติการกลาง อาคารเฉลิมพระเกียรติชั้น 2 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยใช้เครื่อง HPLC รุ่น Shimadzu

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Class-VP-HPLC system และใช้คอลัมน์ C-18 (Restek, U.S., 250 × 4.6 mm, 5 μm particle size) ในการแยกองค์ประกอบ ของฟลาโวนอยด์ โดยใช้น้ำร่วมกับ formic acid ในอัตราส่วน 95:5 (solvent A) และ methanol (solvent B) เป็นเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งใช้อัตราการไหล เป็น 1 ml/min โดยมีอัตราการแยกดังตาราง 6

**ตาราง 6** อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่

| Time (min) | อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ | |
|---|---|---|
| | Solvent A (น้ำ :formic acid, 95:5) | Solvent B (methanol) |
| 0.01 | 70 | 30 |
| 15.00 | 60 | 40 |
| 20.00 | 55 | 45 |
| 30.00 | 40 | 60 |
| 50.00 | 20 | 80 |
| 60.00 | 70 | 30 |

ในการวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ใช้ multichannel photodiode-array detector (SPD-M10AVP) ที่ความยาวคลื่นแสง 190 ถึง 340 nm ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ 10 μl เทียบกับสารมาตรฐาน 7 ชนิดคือ kaempferol, myricetin, hesperetin, chrysin, luteolin, ellagic acid และ quercetin ทำเป็นจำนวน 2 ซ้ำ

**6. การพัฒนาผลิตภัณฑ์รักษาสิวจากน้ำผึ้ง**

**ทดสอบความสามารถในการละลาย**

1. ทดสอบความสามารถการละลายของน้ำผึ้งในตัวทำละลาย

1.1 ใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิดด้วยกัน คือ ethanol, propylene, glycol, glycerin และ polyethylene glycol ที่ความเข้มข้น 100%

1.2 .ใส่น้ำผึ้งลงไป 10%, 20% และ 50% ผสมให้เข้ากัน

1.3 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

1.4 สังเกตุความสามารถในการละลาย

2. ทดสอบความสามารถการละลายของน้ำผึ้งใน ethanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ

2.1 เตรียมสารละลาย ethanol ที่ความเข้มข้น 2%-10%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 ใส่น้ำผึ้งลงไป 10%, 20% และ 50% ผสมให้เข้ากัน

2.3 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

2.4 สังเกตุความสามารถในการละลาย

3. ทดสอบความสามารถการละลายในสารละลายของ salicylic acid ในตัวทำละลาย

3.1 ใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ propylene glycol และ polyethylene glycol

3.2 เตรียมสารละลายทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้น 2%-20%

3.3 ใส่ salicylic acid 0.5% ในตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมให้เข้ากัน

3.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

3.5 สังเกตุความสามารถในการละลาย

**การศึกษาความเหมาะสมของสารก่อเจลที่จะนำมาตั้งตำรับ**

1. คัดเลือกสารก่อเจลที่เหมาะสมจากสารก่อเจลซึ่งประกอบด้วย
   hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)
   hydroxyethyl cellulose (HEC)
   sodium carboxymethylcellulose (SCMC)
   carbopol 940
2. เตรียมเจลพื้นโดยนำสารก่อเจลแต่ละชนิดเติม glycerin และ Conc. paraben คนให้เข้ากัน เฉพาะ Carbopol 940 ที่เติม Triethanolamine 1.65 g และ EDTA 0.001 g
3. ปรับปริมาตรของน้ำจนครบ 100 g คนเบา ๆ จนเป็นเนื้อเดียวกัน
4. เตรียมเจลน้ำผึ้งจากเจลพื้นทั้ง 4 ชนิดมาผสมกับน้ำผึ้ง 30%
5. ทดสอบความคงตัวเบื้องต้นของเจลพื้นและเจลน้ำผึ้ง โดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน
6. คัดเลือกสูตรที่เหมาะสมเพื่อนำมาพัฒนาเจลน้ำผึ้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**การเตรียมตำรับที่ใช้ทดสอบโดยมีน้ำผึ้งลำไย -4 เป็นส่วนประกอบ**

**ตำรับที่ 1**

| | | |
|---|---|---|
| Carbopol 940 | 3 | g |
| Glycerin | 10 | g |
| EDTA | 0.001 | g |
| Conc. paraben | 1 | g |
| Purified water to | 100 | g |

**ตำรับที่ 2**

| | | |
|---|---|---|
| Carbopol 940 | 3 | g |
| Glycerin | 10 | g |
| Honey | 30 | g |
| EDTA | 0.001 | g |
| Conc. paraben | 1 | g |
| Purified water to | 100 | g |

**ตำรับที่ 3**

| | | |
|---|---|---|
| Carbopol 940 | 3 | g |
| Glycerin | 10 | g |
| Honey | 30 | g |
| Vitamin E | 2 | g |
| Salicylic acid | 0.5 | g |
| PEG 400 | 20 | g |
| EDTA | 0.001 | g |
| Conc. paraben | 1 | g |
| Purified water to | 100 | ml |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**วิธีเตรียม**

1. ชั่งองค์ประกอบของตำรับเจลตามตำรับที่ 1, 2 และ 3

2. เตรียมตำรับโดยการโปรยสารก่อเจลลงในน้ำร้อน คนตลอดเวลาจนได้สารที่ผสมเข้ากันดี
3. เติม glycerin, Conc. paraben, EDTA (vitamin E, salicylic acid และ น้ำผึ้ง) คนให้เข้ากัน
4. ปรับปริมาตรของน้ำจนครบ 100 g คนเบา ๆ จนเป็นเนื้อเดียวกัน
5. นำมาบรรจุในขวดแก้วปากกว้าง ใส ปิดฝาสนิท

**หมายเหตุ**

การเตรียม salicylic acid ทำโดยชั่ง salicylic acid 0.5 g ละลายใน PEG 400 ปริมาตร 20 g คนจนละลายหมด

**การทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์เจล**

**การทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่ง**

1. นำเจลที่ผ่านการบรรจุขวดแล้วตำรับละ 3 ขวด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำออกมาก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำเช่นนี้อีกเป็นจำนวน 6 รอบ
2. ทำการวัดค่าความเป็นกรด ด่าง ดูสี ลักษณะเนื้อเจล การแยกชั้น ความเหนอะหนะ การแพร่กระจาย คราบ ฟองอากาศ กลิ่น และ วัดความหนืด ของเจล เพื่อวิเคราะห์ความคงตัวทางกายภาพ โดยสถิติที่ใช้ทดสอบ คือ One-way ANOVA

**การทดสอบความคงตัวในระยะเวลา 3 เดือน**

1. นำเจลที่ผ่านการบรรจุขวดแล้วตำรับละ 3 ขวด เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C -30 °C) 45°C และ 4°C
2. ทำการวัดค่าความเป็นกรด ด่าง ดูสี ลักษณะเนื้อเจล การแยกชั้น ความเหนอะหนะ การแพร่กระจาย คราบ ฟองอากาศ กลิ่น และ วัดความหนืด ของเจลด้วยเครื่อง Brookfield เพื่อวิเคราะห์ความคงตัวทางกายภาพ โดยสถิติที่ใช้ทดสอบ คือ One-way ANOVA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**6.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ**

1. นำเจลตำรับ 1, 2 และ 3 ก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวทางกายภาพทั้งในสภาวะเร่งและในระยะเวลา 3 เดือนมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว 2 ชนิด คือ *S. aureus* และ *P. acnes* โดยวิธี agar well diffusion
2. นำเชื้อทั้ง 2 ชนิดที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาจากนั้นทำการ spread plate บนอาหาร nutrient agar
3. เจาะหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 cm บนจานอาหารที่ผ่านการ spread plate แล้ว
4. ใส่เจลลงในหลุม นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำเป็นจำนวน 3 ซ้ำ ส่วนเชื้อ *P. acnes* เพาะเลี้ยงใน anaerobic jar ที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved