



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved

ภาคผนวก ก

1. การจำแนกเชื้อ *Staphylococcus aureus* ^{36, 37}

1.1 การย้อมสีแกรมและส่องดูกล้องจุลทรรศน์

- 1.1.1 นำสไลด์มาเช็ดและลงไฟเพื่อขจัดคราบไขมัน แล้วหยดน้ำกลั่น 1 หยด ลงบนสไลด์
- 1.1.2 ทำการ smear เชื้อ โดยใช้ sterile needle แตะเชื้อมากระจายตัวในหยดน้ำ แล้วเกลี่ยเป็นแผ่นบาง ๆ ทิ้งไว้ให้แห้งเอง (อย่านำไปลงไฟ)
- 1.1.3 ทำให้เชื้อติดแน่นบนแผ่นสไลด์ (heat fix) โดยผ่านสไลด์บริเวณที่ smear เชื้อไปบนเปลวไฟ 3-4 ครั้ง
- 1.1.4 จุ่มสไลด์ลงในขวดสี crystal violet ทิ้งไว้ 10 วินาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำประปาที่เปิดให้ไหลอ่อน ๆ
- 1.1.5 เทราดด้วย Gram's iodine แชน้ทิ้งไว้ 10 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา
- 1.1.6 เอียงสไลด์ในอ่างน้ำ เทราดด้วยน้ำยา decolorizer 4-5 หยด แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา
- 1.1.7 จุ่มสไลด์ลงในขวดสี safranin ทิ้งไว้ 10 วินาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำประปา
- 1.1.8 ซับด้วยกระดาษกรองจนแห้งสนิท หรือวางเอียงบนกระดาษชำระจนแห้ง
- 1.1.9 นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตการติดสีและรูปร่างของเชื้อแบคทีเรีย

ผลบวก : เชื้อแกรมบวก : ติดสีน้ำเงิน-ม่วงของ crystal violet รูปร่างกลม เรียงตัว กันคล้ายพวงองุ่น

1.2 Coagulase test

เชื้อใน Genus *Staphylococcus* ที่พบบ่อยมี 2 species คือ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ดังนั้นการวินิจฉัยเชื้อ 2 ชนิดนี้ อาศัยคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ coagulase ของ *S. aureus* ในขณะที่ *S. epidermidis* จะไม่มีคุณสมบัติดังกล่าว

วิธีทำ : ใช้ sterile loop เขี่ยเชื้อจำนวน 2-3 โคโลนี มากระจายในพลาสมา จำนวน 0.5 ml ในหลอดทดลอง แล้วนำไป incubate ที่ 35 °C สังเกตการณ์จับกันเป็นก้อนของ พลาสมา ภายในเวลา 4-24 ชั่วโมง

ผลบวก : ถ้าเชื้อมีการสร้างเอ็นไซม์ coagulase จะพบว่าพลาสมาจับกันเป็นก้อน

1.3 การใช้น้ำตาลแมนนิทอล (Mannitol fermentation)

จุดประสงค์ในการทดสอบ คือ ใช้แยกแยะ *S. aureus* และ *S. epidermidis* โดยที่ *S. aureus* จะสามารถใช้น้ำตาล mannitol ได้

วิธีทำ : ใช้ sterile needle และเชื้อมา streak บนส่วน slant ของ mannitol agar slant จากนั้น stab ลงอาหารจนถึงก้นหลอด นำไป incubate ที่ 35 °C ข้ามคืน อ่านผลการสร้างกรด

ผลบวก : ถ้าเชื้อใช้น้ำตาลจะเกิดกรดซึ่งสามารถเปลี่ยนสีของ indicator phenol red จากสีส้มเป็นสีเหลืองทั้งหลอด

1.4 การใช้น้ำตาลกลูโคส (Glucose fermentation)

วิธีทำ : ใช้ sterile needle และเชื้อมา streak บนส่วน slant ของ glucose agar slant จากนั้น stab ลงไปเกือบถึงก้นหลอด นำไป incubate ที่ 35 °C ข้ามคืน อ่านผลการสร้างกรด

ผลบวก : ถ้าเชื้อใช้น้ำตาลจะเกิดกรดซึ่งสามารถเปลี่ยนสีของ indicator phenol red จากสีแดงเป็นสีเหลือง โดยเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้

1.5 การสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar (hemolysis)

เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดโดยเฉพาะ Gram-positive cocci จะให้โคโลนีและการสลายเม็ดเลือดแดง (β, γ hemolysis) บน blood agar plate ได้

วิธีทำ : ใช้ sterile loop เขี่ยเชื้อมา streak บน blood agar plate เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ incubate ที่ อุณหภูมิ 35 -37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนี ที่ได้ และการสลายเม็ดเลือดแดง

ผลบวก : เชื้อ *S. aureus* จะมีโคโลนีขนาดเล็ก นูน ขุ่น สีครีม สามารถสลายเม็ดเลือดแดง โดยสังเกตเห็น clear zone รอบ ๆ โคโลนี (β - hemolysis)

2. การจำแนกเชื้อ *Propionibacterium acnes* ^{36, 37}

2.1 การย้อมสีแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ทำการย้อมสีแกรมและแปลผลเช่นเดียวกันกับข้อ 1.1 โดยเชื้อ *P. acnes* จะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่งสั้น ๆ หัวท้ายขนาดไม่เท่ากัน มีการเรียงตัวคล้ายตัวอักษรจีน

2.2 Catalase test

ใช้ sterile loop เขี่ยเชื้อโดยอย่าให้มีส่วนของเม็ดเลือดในเนื้ออาหารติดมา แล้วป้ายลงบนสไลด์ หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 % บนเชื้อ สังเกตการเกิดฟอง
ผลบวก : มีฟองอากาศเกิดขึ้น

2.3 Indole test

MIL media เป็น semisolid media ใช้ในการทดสอบการสร้าง indole ของเชื้อ
วิธีทำ : ใช้ sterile needle เขี่ยเชื้อมา stab ลงไปใน MIL media จนเกือบถึงก้นหลอด นำไป incubate ที่ 35 °C สภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติม Kovac's reagent สังเกตลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น
ผลบวก : เกิดวงแหวนสีแดง เมื่อหยด Kovac's reagent

2.4 Nitrate reduction test

เป็นวิธีการที่ใช้ตรวจสอบความสามารถของเชื้อในการ reduce nitrate ไปเป็น nitrite หรือ free nitrogen gas

วิธีทำ : ใช้ sterile needle เขี่ยเชื้อมา stab ลงไปใน MNP media จนเกือบถึงก้นหลอดนำไป incubate ที่ 35 °C สภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเติม nitrate A และ B reagent ที่นำมาผสมกันก่อนในอัตราส่วนเท่า ๆ กัน ลงไปประมาณ 10 หยด

ผลบวก : เกิดสีแดงเมื่อหยดสารละลายของ nitrate A และ B ภายใน 1-2 นาที (แสดงว่า nitrate ถูก reduce ไปเป็น nitrite) กรณีไม่เกิดสีแดงให้ตรวจสอบยืนยันผลโดยการเติมผงสังกะสีประมาณ 20 มิลลิกรัม ถ้ายังไม่เกิดสีแดงภายใน 5-10 นาที แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบ ไม่ reduce nitrate ไปเป็น nitrite แต่ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อยังคงใส แสดงว่าเชื้อ reduce nitrate ไปเป็น free gas nitrogen แสดงว่าให้ผลบวก

ภาคผนวก ข

ตาราง ข.1 เกณฑ์การประเมินคะแนนอาการระคายเคืองในกระต่าย

อาการ	คะแนน
อาการแดงและการเกิดสะเก็ดแผล	
ไม่แดง	0
แดงเล็กน้อย (เกือบจะไม่แดง)	1
แดงชัดเจน	2
แดงปานกลางถึงแดงมาก	3
แดงมากถึงเริ่มมีสะเก็ดแผล(มีการบาดเจ็บลึกลงไป)	4
อาการบวม	
ไม่บวม	0
บวมเล็กน้อย	1
บวมเล็กน้อย (ขอบเริ่มนูน)	2
บวมปานกลาง (ขอบนูนมากกว่า 1 มิลลิเมตร)	3
บวมมาก (ขอบนูนมากกว่า 1 มิลลิเมตร ขยายวงกว้างกว่าบริเวณที่สัมผัสสาร)	4

หมายเหตุ ในขณะที่ทำการทดลองมีการให้น้ำและอาหารตามปกติ

ตาราง ข.2 การจัดประเภทของการก่ออาการระคายเคืองผิวหนัง

ค่า Primary Dermal Irritation Index (PDII)	ประเภทของการก่อระคายเคือง
น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1	ไม่ระคายเคือง
1.1-2.0	ระคายเคืองเล็กน้อย
2.1-3.0	ระคายเคืองปานกลาง
3.1-4.0	ระคายเคืองรุนแรง

ตาราง ข.3 เกณฑ์การประเมินคะแนนอาการระคายเคืองในอาสาสมัคร

อาการ	คะแนน
ไม่มีอาการ	0
มีอาการเล็กน้อย (แดงเล็กน้อยและ หรือ ผิวบริเวณที่สัมผัสยาแห้ง)	1
มีอาการปานกลาง (ผิวแดงหรือแห้งชัดเจน และแผ่กระจายเกินบริเวณสัมผัสยา)	2
มีอาการรุนแรง (ผิวแดงแผ่บริเวณกว้างร่วมกับอาการบวมหรือมีสะเก็ดแผล)	3

ตาราง ข.4 ช่วงคะแนนและระดับความพึงพอใจของอาสาสมัครต่อผลิตภัณฑ์รักษาสิ่วรูปแบบเจล

จาก

สารสกัดกระป๋องเจ็ดตัว

คะแนน	ระดับความพึงพอใจ
0.0-0.99	ควรปรับปรุง
1.00-1.99	พอใช้
2.00-2.99	ดี
3.00-3.99	ดีมาก

ภาคผนวก ก

การทดสอบหาเวลาในการฆ่าเชื้อ

ตาราง ค.1 จำนวนเชื้อ *S. aureus* ATCC25923 ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสภาวะบู่เจ็ดตัว ณ เวลาต่าง ๆ

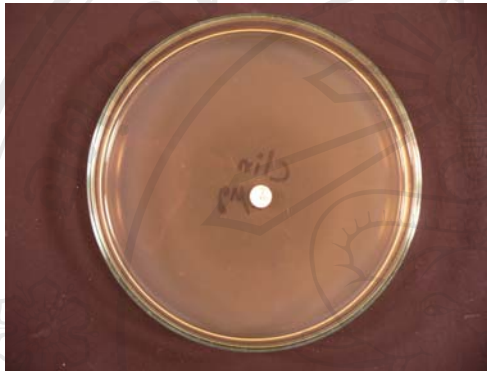
เวลา (ชม.)	จำนวนเชื้อรอดชีวิตเฉลี่ย (CFU/ml)							
	ครั้งที่ 1				ครั้งที่ 2			
	ตัวควบคุม	Log ₁₀	สารสกัด	Log ₁₀	ตัวควบคุม	Log ₁₀	สารสกัด	Log ₁₀
0	3.75×10^5	5.57	3.75×10^5	5.57	3.83×10^5	5.58	3.83×10^5	5.58
2	6.90×10^5	5.84	7.65×10^4	4.88	7.14×10^5	5.85	8.72×10^4	4.94
4	8.10×10^5	5.91	7.20×10^4	4.86	9.60×10^5	5.98	7.15×10^4	4.85
6	2.25×10^6	6.35	6.85×10^4	4.84	1.80×10^6	6.26	6.20×10^4	4.79
7	7.90×10^6	6.90	9.73×10^3	3.98	6.95×10^6	6.84	7.85×10^3	3.89
8	8.35×10^7	7.92	3.54×10^3	3.55	6.10×10^7	7.79	1.00×10^2	2.00
9	8.62×10^7	7.93	1.50×10^2	2.18	8.13×10^7	7.91	5.00×10	1.70
10	9.70×10^7	7.99	0	0	1.25×10^8	8.10	0	0
11	1.05×10^8	8.02	0	0	2.17×10^8	8.34	0	0

ตาราง ค.2 จำนวนเชื้อ *P. acnes* ที่รอดชีวิตหลังสัมผัสสารสกัดกระป๋องเจ็ดตัว ณ เวลาต่าง ๆ

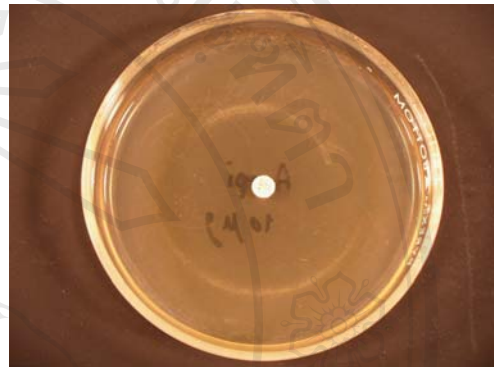
เวลา (ชม.)	จำนวนเชื้อรอดชีวิตเฉลี่ย (CFU/ml)							
	ครั้งที่ 1				ครั้งที่ 2			
	ตัวควบคุม	Log ₁₀	สารสกัด	Log ₁₀	ตัวควบคุม	Log ₁₀	สารสกัด	Log ₁₀
0	7.40×10^5	5.87	7.40×10^5	5.87	6.85×10^5	5.84	6.85×10^5	5.84
2	8.70×10^5	5.94	9.30×10^4	4.97	7.90×10^5	5.99	9.75×10^4	4.99
4	9.85×10^5	5.99	8.71×10^4	4.90	8.55×10^5	5.93	8.60×10^4	4.93
6	2.16×10^6	6.33	7.30×10^4	4.86	9.25×10^5	5.97	7.55×10^4	4.88
8	2.70×10^6	6.43	6.00×10^4	4.78	1.80×10^6	6.26	6.10×10^4	4.79
9	3.41×10^6	6.53	4.90×10^4	4.69	3.55×10^6	6.55	5.95×10^4	4.77
10	4.17×10^6	6.62	4.41×10^4	4.64	4.15×10^6	6.62	5.05×10^4	4.70
11	6.30×10^6	6.80	3.25×10^4	4.51	6.40×10^6	6.81	4.90×10^4	4.69
12	8.60×10^6	6.93	2.90×10^4	4.46	8.35×10^6	6.92	4.35×10^4	4.64
16	9.85×10^6	6.99	2.05×10^4	4.31	9.45×10^6	7.79	3.15×10^4	4.50
24	9.80×10^7	7.99	6.35×10^3	3.80	9.2×10^7	7.96	5.65×10^3	3.75

ภาคผนวก ง

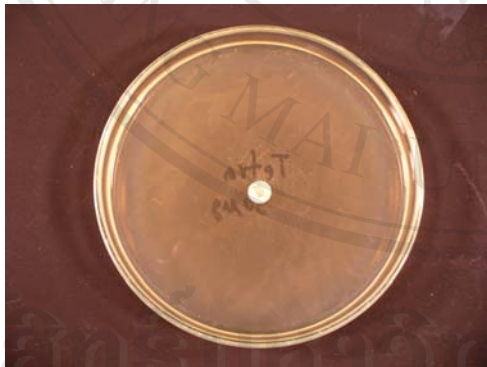
การทดสอบความไวของเชื้อ *P. acnes* ต่อยา



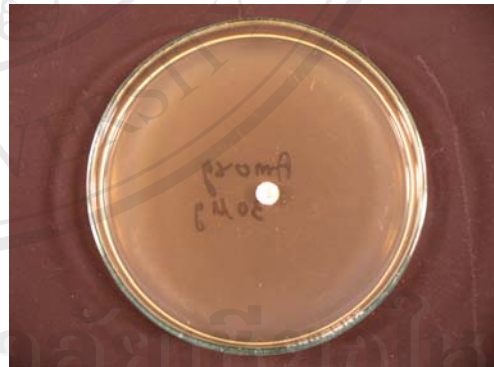
Clindamycin



Ampicillin



Tetracycline



Amoxycillin

รูป ง แสดง inhibition zone ในการทดสอบความไวของเชื้อ *P. acnes* ต่อยาต่าง ๆ

ภาคผนวก จ

การทดสอบหาค่า MIC ของเจลกระป๋องเจ็ดตัว โดยวิธี Agar Dilution

การทดสอบต่อเชื้อ *S. aureus*



การทดสอบต่อเชื้อ *P. acnes*



ภาคผนวก จ

แบบสอบถามอาสาสมัครในการทดสอบอาการระคายเคือง
ของผลิตภัณฑ์รักษาสิวจากสารสกัดกระป๋องเจ็ดตัว

ชื่ออาสาสมัคร.....นามสกุล.....อายุ.....

ปี

เพศ

☐ ชาย

☐ หญิง

1. ท่านสมัครใจเข้าร่วมการทดสอบอาการระคายเคืองผิวหนังครั้งนี้หรือไม่

☐ สมัครใจเข้าร่วม

☐ ไม่สมัครใจเข้าร่วม

2. ขณะนี้คุณเป็นโรคผิวหนังหรือไม่

☐ เป็น โปรดระบุ.....

☐ ไม่เป็น

3. คุณมีประวัติแพ้สารที่ใช้ในชีวิตประจำวัน เช่น ยา เครื่องสำอาง สบุน้ำ หรือสารเคมีต่าง ๆ

☐ มี โปรดระบุ.....

☐ ไม่มี

4. คุณมีประวัติเป็นโรคเกี่ยวกับภูมิแพ้ทางผิวหนังหรือไม่

☐ มี โปรดระบุ.....

☐ ไม่มี

5. คุณเคยได้รับการทดสอบเกี่ยวกับอาการแพ้หรือระคายเคืองสารสัมผัสบนผิวหนังหรือไม่

☐ เคย

☐ ไม่เคย (ข้ามไปข้อ 8)

6. ระยะห่างของการทดสอบเกี่ยวกับอาการแพ้หรือระคายเคืองครั้งที่ผ่านมากับครั้งนี้

☐ น้อยกว่า 2 สัปดาห์

☐ มากกว่า 2 สัปดาห์

7. ผลการทดสอบเกี่ยวกับการแพ้หรือระคายเคืองครั้งที่ผ่านมา

☐ แพ้ โปรดระบุ(อาการ).....

☐ ไม่แพ้

8. ในครอบครัวของคุณมีประวัติเป็นโรคภูมิแพ้ทางผิวหนังหรือไม่

☐ มี

☐ ไม่มี

9. ก่อนหน้านี้ 1 สัปดาห์ คุณได้ใช้ยาลดอาการแพ้หรืออาการอักเสบหรือไม่

☐ ใช่

☐ ไม่ใช่

แบบสอบถามความพึงพอใจของอาสาสมัครต่อผลิตภัณฑ์รักษาสิ่วจากสารสกัดกระป๋องเจ็ดตัว

1. ผู้ให้ข้อมูล

เพศ ☐ ชาย ☐ หญิง อายุ.....ปี

2. เจลกระป๋องเจ็ดตัวรูปแบบ I

หัวข้อประเมิน	ดีมาก	ดี	พอใช้	ควรปรับปรุง
สี				
กลิ่น				
ลักษณะของเนื้อเจล				
การซึมซาบสู่ผิว				
การกระจายตัวเมื่อทา				
ความพึงพอใจโดยรวม				

3. เจลกระป๋องเจ็ดตัวรูปแบบ II

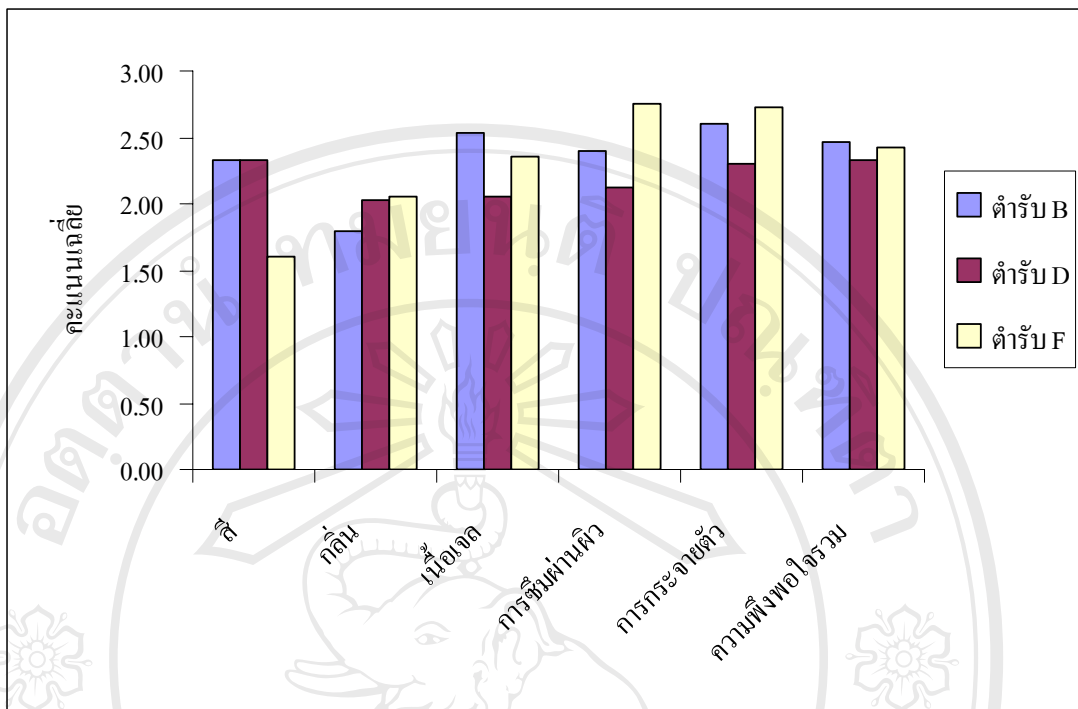
หัวข้อประเมิน	ดีมาก	ดี	พอใช้	ควรปรับปรุง
สี				
กลิ่น				
ลักษณะของเนื้อเจล				
การซึมซาบสู่ผิว				
การกระจายตัวเมื่อทา				
ความพึงพอใจโดยรวม				

4. เจลกระป๋องเจ็ดตัวรูปแบบ III

หัวข้อประเมิน	ดีมาก	ดี	พอใช้	ควรปรับปรุง
สี				
กลิ่น				
ลักษณะของเนื้อเจล				
การซึมซาบสู่ผิว				
การกระจายตัวเมื่อทา				
ความพึงพอใจโดยรวม				

5. จากคำรับทั้ง 3 รูปแบบ กรุณาจัดลำดับความชอบของท่านต่อผลิตภัณฑ์จากมากไปน้อย

ลำดับที่ 1.....ลำดับที่ 2ลำดับที่ 3.....



รูป น.1 กราฟแสดงคะแนนความพึงพอใจเฉลี่ยของอาสาสมัครต่อผลิตภัณฑ์เจลรักษาผิวจากสารสกัดกระบือเจ็ดตัว



เอกสารเลขที่ 11/2549

เอกสารรับรองโครงการศึกษาวิจัยในมนุษย์
โดย
คณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ สวัสดิภาพและป้องกันอันตรายในการวิจัยกับมนุษย์
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ขอรับรองว่า

โครงการวิจัย : การประเมินการระคายเคืองผิวหนังของเครื่องสำอางรักษาสิ่วรูปแบบเจลจากสารสกัด
กระเทียมเจ็ดตัว

ของ : นางสาววิภาวี อุนตศักดิ์, ภ.บ.

สังกัด : นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย

ได้รับการพิจารณาโครงการแล้ว เห็นว่าไม่ขัดต่อสิทธิสวัสดิภาพ และก่อให้เกิดอันตรายแก่
ผู้ถูกวิจัยแต่ประการใด

จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการวิจัยในขอบข่ายของโครงการที่เสนอได้ ณ วันที่ 20 มีนาคม 2549
เอกสารรับรองฉบับนี้ใช้ได้ถึงวันที่ 19 กันยายน 2549

(ลงชื่อ)
(ศาสตราจารย์เกียรติคุณ นายแพทย์ปิยะกุล พงษ์)

ประธานคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิสวัสดิภาพและป้องกันอันตรายในการวิจัยกับมนุษย์

(ลงชื่อ)
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ธีระ ศิริสัมพันธ์)

ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



No. 11/2006

CERTIFICATE OF ETHICAL CLEARANCE

**Human Experimentation Committee
Research Institute for Health Sciences (RIHES)
Chiang Mai University
Chiang Mai, Thailand**

Title of project or study : Evaluation of Dermal Irritation Study for
Acne Cosmetic from the Extract of
Excoecaria cochinchinensis Lour.

Principal Investigator : Miss. Wipawee Ubolsak

Participating Institution : Faculty of Pharmacy
Chiang Mai University, Thailand.

Approved by the RIHES Human Experimentation Committee (date) :
20 March 2006

Date of Expiry : 19 September 2006

Signature of the Chairman of the Committee : P. Kulapongs
(Emeritus Professor Panja Kulapongs, M.D.)

Countersigned : Thira Sirisanthana
(Thira Sirisanthana, M.D.)
Director, RIHES, Chiang Mai University

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาว วิภาวี อุบลศักดิ์ รหัส 4630016

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนห่มเกล้าพิทยาคม
จังหวัดเพชรบูรณ์ ปีการศึกษา 2535
สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาเภสัชศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยนเรศวร
จังหวัดพิษณุโลก ปีการศึกษา 2540

ประวัติการทำงาน รับราชการในตำแหน่งเภสัชกร โรงพยาบาลห่มสั๊ก จังหวัดเพชรบูรณ์
ตั้งแต่ พ.ศ.2541 จนถึงปัจจุบัน

ผลงานวิชาการ

1. วิภาวี อุบลศักดิ์ และ ญัฐกรณ์ ใบแสง. การสังเคราะห์ 5, 6-O-Isopropylidene Ascorbic Acid Acetate Ester. ปัญหาพิเศษตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยนเรศวร. 2541.
2. วิภาวี อุบลศักดิ์.ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวของสารสกัดจากสมุนไพรไทย. ปัญหาพิเศษทางเทคโนโลยีเภสัชกรรม เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2547.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved