รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การใช้สารสกัดจากใบมะยมและสาร Nisin A ต่อคุณภาพด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรลดขนาด

The combination of *Phyllanthus acidus* leaf extract and Nisin A on physical, chemical and microbiological qualities in comminuted pork products

โดย

ผศ.ดร. คมแข พิลาสมบัติ

ผศ.ดร.ผุสดี ตังวัชรินทร์

รศ.ดร.จำรูญ เล้าสินวัฒนา

นางอังคณา ทุมดี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย

จากงบประมาณเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การใช้สารสกัดจากใบมะยมและสาร Nisin A ต่อคุณภาพด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรลดขนาด

The combination of *Phyllanthus acidus* leaf extract and Nisin A on physical, chemical and microbiological qualities in comminuted pork products

โดย

ผศ.ดร. คมแข พิลาสมบัติ

ผศ.ดร.ผุสดี ตังวัชรินทร์

รศ.ดร.จำรูญ เล้าสินวัฒนา

นางอังคณา ทุมดี

RCH
ก449
2559

b.12862971X
i.

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 147852
วันเดือน.ปี 15 ก.ค. 2560

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย

จากงบประมาณเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

การทดลองที่ 1 ศึกษาเพื่อศึกษาหาสัดส่วนของสารสกัด (เอทานอล:น้ำ) ที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบมะยม และศึกษาผลของการใช้สารสกัดหยาบต่อคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ ของเนื้อสุกรบดที่ผสมสารสกัดและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 วัน และ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ การศึกษาประสิทธิภาพของการใช้สารสกัดเอทานอลต่อน้ำ ในอัตราส่วนผสมที่แตกต่างกัน (0%, 25%, 50%, 75% และ 100%) ที่มีผลต่อปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้ ปริมาณสารฟีโนลิคทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ผลจากการทดลองพบว่า น้ำบริสุทธิ์สามารถสกัดสารสกัดหยาบจากใบมะยม ได้ปริมาณสารสกัดหยาบสูงสุด โดยปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้จะลดลงตามสัดส่วนของเอทานอลที่เพิ่มขึ้น ปริมาณสารสกัดหยาบจากใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำบริสุทธิ์ได้ 2.80 กรัมต่อ 100 กรัมใบแห้งในขณะที่สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ได้ 0.53 กรัมต่อ 100 กรัมใบแห้ง ปริมาณสารฟีโนลิคทั้งหมดจากการสกัดใบมะยม มีค่าอยู่ในช่วง 48.04 ถึง 49.87 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิคต่อสารสกัดหยาบ 1 กรัม ส่วนปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากการสกัดใบมะยมและผลมะนาวโห่ อยู่ในช่วง 0.51 ถึง 0.70 มิลลิกรัมสมมูลย์เคอร์ซิตินต่อสารสกัดหยาบ 1 กรัม และ 0.11 ถึง 0.17 มิลลิกรัมสมมูลย์เคอร์ซิตินต่อสารสกัดหยาบ 1 กรัม ตามลำดับ ไม่พบการต้านจุลินทรีย์ในสารสกัดที่ได้จากใบมะยม

พิจารณาความชอบของผู้บริโภคผลผลิตของสารสกัดความคุ้มค่าและความปลอดภัยของผู้บริโภค การใช้สารสกัดน้ำจากใบมะยม (PWCE) ผสมในเนื้อสุกรบด แบ่งการทดลองเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม (เนื้อสุกรบดไม่เติมสารสกัด) เนื้อสุกรบดที่เติมสาร BHT (0.2 g/kg meat) เนื้อสุกรที่เติม PWCE (2.5 g/kg meat) และเนื้อสุกรที่เติม PWCE (5 g/kg meat) เก็บข้อมูลค่า DPPH scavenging radical activity, ABTS radical cation decolorization, reducing power, TBARS, pH, ค่าสี (CIE L*, a*, b*), จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์/รา แบคทีเรียที่เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ โคลิฟอร์ม ในเนื้อสุกรบด ที่เก็บอุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส นาน 0, 2, 4, 6 และ 8 วัน ผลการทดลองพบว่าค่า DPPH, ABTS และ reducing power ในเนื้อสุกรบดที่เติมสารสกัดทั้งในเนื้อทั้งที่ไม่สุกและเนื้อที่สุก มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติม BHT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าการออกซิเดชั่นของไขมันในไม่แตกต่างกันในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมสารสกัด อย่างไรก็ตามพบว่าค่าการออกซิเดชั่นของไขมันในเนื้อสุกที่เติมสารสกัดทั้งสองชนิดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติม BHT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อสุกรบดกลุ่มที่เติมสารสกัดมีค่าสีแดงสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดลองที่ 2 ศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบ ร่วมกับสารแบคเทอริโอซิน Nisin A และสารแบคเทอริโอซิน KL-1 ในการยับยั้งเชื้อ *S.*

aureus และ *S.* Typhimurium ผลการศึกษาพบว่าการใช้สารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ร่วมกับสารแบคเทอริโอซิน Nisin A และสารแบคเทอริโอซิน KL-1 มีคุณสมบัติเสริมฤทธิ์กันบางส่วนในการทำลายเชื้อก่อโรคทั้งสองชนิดที่ทดสอบในทำนองเดียวกันกับสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงร่วมกับสารแบคเทอริโอซินพบว่ามีคุณสมบัติเสริมฤทธิ์กันในการทำลายเชื้อก่อโรคทั้งสองชนิดที่ใช้ทดสอบ

การทดลองที่ 3 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด ทำการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพสำหรับเนื้อสุกรแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส พบว่าทุกกลุ่มการทดลองที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซินสามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์รา และ Coliform แต่ไม่สามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำได้ ค่าสีพบว่ากลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่าความสว่างต่ำที่สุด ค่าสีแดงทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และค่าสีเหลืองกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่าสีเหลืองต่ำที่สุด และกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน 640 AU/ml มีค่าสีเหลืองสูงที่สุด สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันในทางสถิติตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา($P<0.05$) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในเนื้อสุกรบดแช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เก็บรักษานาน 4 เดือน พบว่าทุกกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติม โดยกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่าการกำจัดอนุมูลอิสระสูงที่สุดร้อยละ 92-97 แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ABSTRACT

The first experiment, the aim of this study was to investigate the antioxidant and antimicrobial activities of *Phyllanthus acidus* L. leaf extracts using various solvent ratios of ethanol in water and their effect on physical, chemical and biological qualities in ground pork during period of storage time for 8 days at 4°C and 12 weeks at -20°C in refrigerator. The effect of various solvent ratios of ethanol (0%, 25%, 50%, 75% and 100%) in water on crude yield, total phenolic content and total flavonoid content was determined. The results showed that the highest crude yield was obtained from water solvent for both *P. acidus* leaf extracts. It could be seen that the extraction yield of water was the highest (2.80 g/100 g DW) and the extraction yield of 100% ethanol was the lowest (0.53 g/100 g DW). Moreover, the highest recovery yield of total phenolic content from *P. acidus* leaf extracts was ranged from 48.04 to 49.87 mg GAE/g crude, while total flavonoid content from *P. acidus* leaf extracts was ranged from 0.51 to 0.70 mg QE/g crude. The *in vitro* antioxidant and antibacterial activities of *P. acidus* leaf of various crude extracts were determined. The results indicated that water extract from *P. acidus* leaves had the highest antioxidant activities. However, antimicrobial activity of the extract was not observed. Thus, the water crude extract from *P. acidus* leaves (PWCE) was selected as optimal extract for further studies based on the higher antioxidant activities and preliminary sensory evaluation.

The ground pork samples were subjected to four treatments such as control (non-treated), 0.2 g BHT/kg meat, 2.5 g PWCE/kg meat and 5 g PWCE/kg meat. The effect of PWCE on DPPH scavenging radical activity, ABTS radical cation decolonization, reducing power, TBARS, pH, instrumental color (CIE L*, a*, b*), total plate count, yeasts/molds, psychrophilic bacteria and coliforms in ground pork during period of storage time for 0, 2, 4, 6 and 8 days at 4°C and 0, 4, 8 and 12 weeks at -20°C were studied. According to the DPPH, ABTS and reducing power assays, the ground pork samples containing PWCE showed significantly higher activity in both raw and cooked samples compared to the control and BHT samples. Moreover, the lower level of lipid peroxidation compared to control and BHT treatments was found in the samples containing PWCE. The lightness (L*) and yellowness (b*) values of meat samples contained PWCE were lower significantly while the redness (a*) values higher than the control samples at the end of the storage time. The sensory properties of the cooked ground pork mixed with 2.5 and 5 g CE/kg meat were also determined. The results indicated that the addition of PWCE had no significantly affected the sensory scores of ground

pork samples on overall appearance such as color, odor, texture, flavor and overall quality compared to the control. These results demonstrated that the extracts from *P. acidus* leaves and *C. carandas* fruits are high potential to be used as natural ingredients to maintain the quality, antioxidant and antimicrobial activities and prolong the shelflife of ground pork as well as develop new functional food safety to satisfy consumers.

The second experiment, study the synergistic effect of carandas fruit extract, roselle flower extract and bacteriocin (Nisin A, KL-1) against *S. aureus* and *S.* Typhimurium. The results found that the combination of carandas fruit extract and bacteriocin showed a synergistic activity against *S. aureus* and *S.* Typhimurium. Similarly, the synergistic effect of roselle extract and bacteriocin against tested bacteria was also observed.

The third experiment, the effects of roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract and bacteriocin KL-1 on microbial and physical qualities of ground pork (treatment groups were the same as in second experiment). For microbial qualities, all chilled ground pork mixed with roselle extract store at 4 °C could control total plate count, yeast and mold and coliform except psychrophilic bacteria. The lowest lightness in ground pork was found in roselle extract at 50 mg/ml. Meanwhile, there was no significant differences ($P>0.05$) on treatment. However, the yellowness of treatment was lowest in in roselle extract at 50 mg/ml but highest in bacteriocin 640 AU/ml. There were no significant differences in pH ($P>0.05$) at all treatments. Nevertheless, all frozen ground pork mixed with roselle flower extract store at -20 °C for 4 months had the highest % inhibition of DPPH value at 92-97% compared to all treatments.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ค
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 มะยม *Phyllanthus acidus* (L.)	4
2.1.1 ลักษณะทั่วไป	4
2.1.2 คุณสมบัติของมะยมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและการต้านจุลินทรีย์	4
2.2 กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.)	5
2.2.1 ลักษณะทั่วไปของกระเจี๊ยบแดง	5
2.2.2 คุณสมบัติของกระเจี๊ยบแดงในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์	5
2.2.3 คุณสมบัติของกระเจี๊ยบแดงในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	6
2.3 มะม่วงหาวมะนาวโห่ (*Carissa carandas* L.)	7
2.3.1 ลักษณะทั่วไปของมะม่วงหาวมะนาวโห่	7
2.3.2 คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	7
2.3.3 คุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์	9
2.4 สารแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)	10
2.4.1 ลักษณะทั่วไปของสารแบคเทอริโอซิน	10
2.4.2 กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคเทอริโอซิน	10
2.4.3 สารแบคเทอริโอซิน Nisin A ที่สร้างจาก Lactococcus lactis sb lactis Sb2	11
2.4.4 แบคเทอริโอซิน KL-1	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	13
3.1 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากพืช	13
3.2 วิธีการเตรียมแบคเทอริโอซิน	14
3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	14
3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	16
3.6 แผนการทดลอง	17
3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ	30
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	32
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	87
บรรณานุกรม	89
ภาคผนวก	96

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง	13
3.2 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่	14
3.3 แบคทีเรียทดสอบ ชนิดแบคทีเรีย อาหารที่ใช้เลี้ยง และอุณหภูมิสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย	15
4.1 สัดส่วนของสารสกัด (เอทานอล : น้ำ) ที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ ต่อปริมาณปริมาณสารกัดหยาบ ปริมาณสารฟีโนลิคทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	33
4.2 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสารสกัดจากใบมะยม โดยการสกัดด้วยสัดส่วนสารที่ใช้สกัด (เอทานอลต่อน้ำ) แตกต่างกัน	33
4.3 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย	34
4.4 ผลของค่าสีของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในสุกรบดต่ออายุการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสก่อนการทำให้สุกและภายหลังการทำให้สุก	37
4.5 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในหมูบดต่ออายุการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส	38
4.6 ผลของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในหมูบดต่ออายุการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการทำให้สุกและภายหลังการทำให้สุก โดยศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity	39
4.7 ผลของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในหมูบดต่ออายุการเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการทำให้สุกและภายหลังการทำให้สุก โดยศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity	40
4.8 ผลของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในหมูบดต่ออายุการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการทำให้สุกและภายหลังการทำให้สุก โดยศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระฟอกสี ABTS radical cation decolorization	41
4.9 ผลของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในหมูบดต่ออายุการเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการทำให้สุกและภายหลังการทำให้สุก โดยศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระฟอกสี ABTS radical cation decolorization	42
4.10 ผลของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในหมูบดต่ออายุการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการทำให้สุกและหลังทำให้สุก โดยศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระความสามารถในการรีดิวซ์สาร	43

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.11 ผลของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในหมูบดต่ออายุการเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการทำให้สุกและหลังทำให้สุก โดยศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระความสามารถในการรีดิวซ์สาร 44

4.12 ผลของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในหมูบดต่ออายุการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการทำให้สุกและภายหลังการทำให้สุก โดยศึกษาการออกซิเดชันของไขมันด้วยวิธี 2-Thiobar bituric Acid Reactive Substance (TBARS) 46

4.13 ผลของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในหมูบดต่ออายุการเก็บรักษาที่ –20 องศาเซลเซียส ก่อนการทำให้สุกและภายหลังการทำให้สุก โดยศึกษาการออกซิเดชันของไขมันด้วยวิธี 2-Thiobar bituric Acid Reactive Substance (TBARS) 47

4.14 ผลของการประเมินด้านประสาทสัมผัสของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในหมูบด 48

4.15 ค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย (FICI) และค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อทำลายแบคทีเรีย (FBCI) ของการใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ร่วมกับแบคเทอริโรซิน Nisin A 50

4.16 ค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย (FICI) และค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อทำลายแบคทีเรีย (FBCI) ของการใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 51

4.17 ค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย (FICI) และค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อทำลายแบคทีเรีย (FBCI) ของการใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง ร่วมกับแบคเทอริโอซิน Nisin A 60

4.18 ค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย (FICI) และค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อทำลายแบคทีเรีย (FBCI) ของการใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับ แบคเทอริโอซิน KL-1 61

4.19 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) (log cfu/g) ของเนื้อ สุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 73

4.20 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophilic) (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 74

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.21 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวนยีสต์และรา (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 75

4.22 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวน Coliform (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 76

4.23 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวน *E. coli* (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 77

4.24 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อค่าความสว่าง (Lightness, L*) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 80

4.25 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อค่าสีแดง (Redness, a*) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 81

4.26 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อค่าสีเหลือง (Yellowness, b*) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 82

4.27 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 83

4.28 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของเนื้อสุกรบดแช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน 86

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเกิดจากโมเลกุลแบคเทอริโอซินรวมตัวกัน	10
4.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells ของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ แบคเทอริโอซิน Nisin A และการใช้ร่วมกัน	53
4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable ของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ แบคเทอริโอซิน Nisin A และการใช้ร่วมกัน	55
4.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells ของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกัน	57
4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells ของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกัน	59
4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน Nisin A และการใช้ร่วมกัน	63
4.6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells 292 ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน Nisin A และการใช้ร่วมกัน	65
4.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกัน	67
4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกัน	69

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มา

เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์เป็นอาหารประเภทโปรตีนที่สำคัญสำหรับมนุษย์ โดยเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่นำมาบริโภคควรปราศจากจุลินทรีย์ จุลินทรีย์จัดเป็นอันตรายทางชีวภาพที่สำคัญที่มีการปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ เนื่องจากเนื้อสัตว์เป็นอาหารที่มีโปรตีนสูง และมีค่าความชื้น (Water activity) เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์เป็นปัญหาสำคัญและมีบทบาทอย่างยิ่งต่อชีวิตมนุษย์ จุลินทรีย์แปลกปลอมที่ปนเปื้อนเข้ามาในเนื้อสัตว์นั้นเป็นสิ่งที่ไม่พึงปรารถนา เพราะการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์เป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของเนื้อสัตว์และยังทำให้ผู้บริโภคเกิดการเจ็บป่วยจากโรคอาหารเป็นพิษ (Peason and Dutson. 1986) ในอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์และการแปรรูปเนื้อสัตว์ได้มีความพยายามในการควบคุมกระบวนการผลิตให้มีความปลอดภัย โดยการนำระบบประกันคุณภาพของอาหารมาใช้ในการผลิต เช่น Good Manufacturing practice (GMP) และ Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) แต่ก็ยังพบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งกลุ่มก่อโรคและกลุ่มที่ทำให้เน่าเสีย อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงทางเคมีก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย เพราะสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดเวลา นั่นคือการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมันที่จัดเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเสื่อมเสียของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ทำให้มีสีที่เปลี่ยนไป สูญเสียกลิ่นรส คุณค่าทางอาหาร ทำให้เกิดการหืน และมีอายุการเก็บรักษาสั้นลง ซึ่งทำให้เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค จากปัญหาดังกล่าวจึงได้มีการศึกษา การควบคุมจุลินทรีย์เหล่านี้ เช่น การใช้กรดอินทรีย์และการใช้สารเคมีกันเสียชนิดต่างๆใช้ในอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ เช่น การนำวัตถุกันเสีย (Food preservative) ที่ได้จากสารเคมีสังเคราะห์ มาใช้เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ เช่น sodium acetate, potassium proprionate, sodium benzoate และ potassium sorbate เป็นต้น อย่างไรก็ตามถ้าหากร่างกายได้รับสารเหล่านี้ในปริมาณมาก จะส่งผลเสียต่อร่างการของผู้บริโภค นอกจากนี้ ได้มีการนำสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ หรือสารกันหืน เช่น เกลือไนไตรท์ (Nitrite) บิวทิลเลเทตไฮดรอกซีอะนิซอล หรือบีเอชเอ (Butylated hydroxyanisole, BHA) บิวทิลเลเทตไฮดรอกซีโทลูอีน หรือบีเอชที (Butylated hydroxytoluene, BHT) และเบนโซเอท (Benzoate) (Soubra *et al.* 2007; Sebranek *et al.* 2005) โดยนำมาใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและลดการสูญเสีย โดยสารเคมีดังกล่าวมีผลในด้านลบต่อสุขภาพของผู้บริโภคหากบริโภคต่อเนื่องเป็นเวลานาน เช่น เบนโซเอท ส่งผลทำให้เกิดโรคภูมิแพ้ (allergic) หอบหืด (asthma) เป็นแผลในกระเพาะ (local gastric irritation) ส่วน BHT ส่งผลทำให้เกิดโรคไทรอยด์ พบการไหลออกของเลือด (haematological) (Soubra *et al.* 2007)

ปัจจุบันผู้บริโภคได้ให้ความสำคัญในการบริโภคอาหารที่ดีต่อสุขภาพ ลดการใช้สารเคมี และนำสารที่ได้จากธรรมชาติมาทดแทนการใช้สารเคมี แม้ว่าราคาอาหารเพื่อสุขภาพจะมีราคาที่สูงกว่าราคาอาหารปกติแต่ผู้บริโภคยังเต็มใจที่จะใช้จ่าย (Karre *et al.* 2013) ทำให้ในปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารได้มีความพยายามคัดเลือกสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติเพื่อมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนอกจากจะได้ประโยชน์ต่อสุขภาพในแง่ของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแล้วยังมีประโยชน์ทางด้านคุณภาพอาหารเช่น ชะลอการเหม็นหืน และยืดอายุการเก็บรักษาอีกด้วย (Naveena *et al.* 2008) นอกจากนี้ยังสามารถทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ ซึ่งสารเคมี (Soubra *et al.* 2007) โดยสารเคมีดังกล่าวมีผลในด้านลบต่อสุขภาพของผู้บริโภคหากบริโภคต่อเนื่องเป็นเวลานาน และยังพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติบางชนิดมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ โดยมีการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าคุณสมบัติของสารสกัดจากมะยม มะม่วงหาวมะนาวโห่ และกระเจี๊ยบแดงมีคุณสมบัติเป็นสารแบคเทอริโอซิน

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำคุณสมบัติของสารสามชนิด คือสารสกัดจากใบมะยม มะม่วงหาวมะนาวโห่ กระเจี๊ยบแดง และสารแบคเทอริโอซินมาใช้ร่วมกันเพื่อเพิ่มคุณสมบัติทั้งในด้านการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และคุณสมบัติในการการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารทั้งสามชนิดมีคุณสมบัติคล้ายกันคือเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ ไม่เป็นอันตรายในการบริโภค และสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์รวมทั้งเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ หากนำสารทั้งสองชนิดมาใช้ร่วมกันจึงมีความเป็นไปได้ในการเสริมฤทธิ์กัน และเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบมะยม

1.2.2 ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากใบมะยมต่อคุณภาพทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรลดขนาด

1.2.3 ศึกษาคุณสมบัติของการเสริมฤทธิ์กันของใช้สารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ และกระเจี๊ยบแดงร่วมกับสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

1.2.4 ศึกษาผลของการใช้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงร่วมกับสารแบคเทอริโอซินต่อความปลอดภัยและคุณภาพเนื้อสุกรบด

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

1.3.1 ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.3.2 ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมงคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.3.3 ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.4 ขั้นตอนการศึกษา

1.4.1 ศึกษาสัดส่วนของสารสกัด (เอทานอล: น้ำ) ต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบมะยม

1.4.2 ศึกษาการใช้สารสกัดจากใบมะยมต่อคุณภาพด้านต่างๆ ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรบดลดขนาด

1.4.3 ศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดจากพืชและสารแบคเทอริโอซิน (ดอกกระเจี๊ยบแดงและผลมะม่วงหาวมะนาวโห่) และสารแบคเทอริโอซิน

1.4.4 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับสารแบคเทอริโอซิน KL-1 ต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรบดลดขนาด

1.5 ระยะเวลาการศึกษา

ใช้เวลาในการศึกษาทั้งสิ้น 1 ปี

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ทราบถึงคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบมะยม

1.6.2 ทราบถึงคุณสมบัติของสารสกัดจากใบมะยมต่อคุณภาพทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรลดขนาด

1.6.3 ทราบถึงคุณสมบัติของการเสริมฤทธิ์กันของใช้สารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ และกระเจี๊ยบแดงร่วมกับสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

1.6.4 ทราบถึงผลของการใช้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงร่วมกับสารแบคเทอริโอซินต่อความปลอดภัยและคุณภาพเนื้อสุกรบด

บทที่ 2
ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะยม *Phyllanthus acidus* (L.)

2.1.1 ลักษณะทั่วไป

มะยมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Phyllanthus acidus* (L.) skeels (*P. acidus*) เป็นพืชที่อยู่ในตระกูล Family Euphobiraceae มีชื่อสามัญคือ gooseberry หรือ star gooseberry หรือภาษาไทยเรียกมะยม ลักษณะลำต้นสูงประมาณ 4-6 เมตร ลักษณะใบเรียงสลับเป็นสองแถว ใบรูปขอบค่อนข้างเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน ปลายใบแหลม ติดผลเป็นพวง เมื่อผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือขาวแกมเหลือง เนื้อผลมีลักษณะฉ่ำน้ำ มะยมมีต้นกำเนิดใน Madagascar และพบว่าปลูกทั่วไปในแถบอินโดนีเซีย เวียดนามใต้ลาว และประเทศไทย โดยส่วนใหญ่มักปลูกไว้ในสวนหลังบ้านหรือปลูกไว้ในบริเวณบ้าน ใบอ่อนนิยมนำมาปรุงอาหาร หรือรับประทานเหมือนผักทั่วไป (Jain and Singhai. 2011 ; Chongsa *et al.* 2014 ; Talubmook and Buddhakala. 2013)นอกจากนี้มะยมยังนิยมนำมาเป็นยาสมุนไพรพื้นบ้าน โดยในส่วนของใบและผลใช้บรรเทาอาการอักเสบ ปวดตามข้อ ปวดตามกล้ามเนื้อ รักษาโรคหลอดลมอักเสบ โรคหอบหืด โรคเบาหวานและโรคตับ มะยมยังมีคุณสมบัติช่วยทำให้สายตาดีขึ้น ความจำดีขึ้น รักษาอาการไอ รักษาโรคผิวหนัง และโรคสะเก็ดเงิน ในส่วนของรากและเมล็ดใช้เป็นยาระบาย ใบใช้เป็นยาลดพิษของงูเมื่อถูกงูกัด และใช้ลดอาการไข้ (Chakraborty *et al.* 2012)

2.1.2 คุณสมบัติของมะยมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและการต้านจุลินทรีย์

ได้มีการศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลมะยมที่ได้จากการสกัดด้วยเมทานอลโดยทำการศึกษา ค่า Total flavonoid content, DPPH free radical assay, reducing power assessment, cupric ion reducing capacity assay ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากผลมะยมมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระดับปานกลางถึงดี แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่า ascorbic acid โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสาร flavonoid พบว่ามีปริมาณ 24.8 mg/g และ 551.97 mg/g ในผลมะยมและ ascorbic acid ตามลำดับ จากการศึกษาพบสารกลุ่ม Phenolic compounds เช่น flavonoid, polyphenol, tannin และ phenolic terpene (Rahman *et al.* 2011) นอกจากนี้ Chakraborty *et al.* (2012) ได้ทำการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากใบมะยมที่สกัดด้วยเมทานอล พบสารในกลุ่ม Phenolic compounds เช่น flavonoid ซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ Rahman *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาสารสกัดจากผลมะยม โดยสกัดด้วยเมทานอล ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method ผลการศึกษาพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อ แผ่นดิสก์ สามารถยับยั้งเชื้อ *Shigella dysenteriae*, *Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Salmonella typhi* และ*S.*

aureaus (อัฐญาพร ชัยชมภู และนฤมล ทองไว. 2554) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรหลายชนิด รวมทั้งสารสกัดจากใบมะยม ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคบนผิวหนัง 6 ชนิดได้แก่ *Escherichia coli* O157:H7, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* โดยนำสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรดังกล่าวที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลมาทดสอบกับเชื้อก่อโรคด้วยวิธี agar disc diffusion และ broth dilution พบว่ามะยมที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์ดังกล่าวข้างต้น ในขณะที่สารสกัดน้ำสามารถยับยั้งเชื้อเพียง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ*Staphylococcus epidermidis*เท่านั้น โดยสารสกัดจากมะยมให้ค่า MIC ต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของ*E. coli* O157:H7 โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.)

2.2.1 ลักษณะทั่วไปของกระเจี๊ยบแดง

กระเจี๊ยบแดง ชื่อสามัญ roselle, red sorrel, Jamaica sorrel หรือ karkade ชื่อวิทยาศาสตร์ *Hibiscus sabdariffa* Linn. อยู่ในวงศ์ *Malvaceae* กระเจี๊ยบแดงเริ่มนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอาหารและเภสัชวิทยา ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1658 (ศุภร อังศุจินดา. 2549) โดยนำมาทำเป็นเครื่องดื่มที่ให้ความสดชื่นที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคเนื่องจากไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic effects) ตับและไต หรือสกัดเป็นสารให้สีแดงเนื่องจากเป็นแหล่งของแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ในปริมาณสูง ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงคุณสมบัติของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยน้ำและเมทานอลว่ามีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงมากเมื่อเทียบกับ butylated hydroxyl anisole (BHA) และ α-tocopherol อีกทั้งยังสามารถป้องกันโรคหัวใจและมะเร็งบางชนิดได้ (Awe *et al.* 2013) สำหรับคุณสมบัติทางยาของกระเจี๊ยบคือ ช่วยขับพยาธิตัวจี๊ด ช่วยรักษาโรคกระเพาะ เป็นยาระบาย และขับปัสสาวะ (สารานุกรมสมุนไพร. 2543) องค์ประกอบของกระเจี๊ยบแดง ส่วนใหญ่เป็นกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น กรดฮิบิสซิค (hibisic acid) ร้อยละ 23 กรดซิตริก (citric acid) ร้อยละ 12-17 นอกจากนี้ยังมีกรดมาลิค (malic acid) กรดทาร์ทาลิค (tartaric) กรดออกซาลิค (oxalic acid) เนื่องจากองค์ประกอบส่วนมากเป็นกรดจึงทำให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 2-3 (วีรสิงห์ เมืองมั่น. 2552)

2.2.2 คุณสมบัติของกระเจี๊ยบแดงในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์

Tolulope (2007) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษและการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของกลีบดอกกระเจี๊ยบที่สกัดด้วยเมทานอล โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยวิธี Disc diffusion method พบว่าที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus, B. tearothermophilus, M. luteus, S. erratia marcences, Cl. sporogenes, E. coli, Klebsiella pneumoniae, B. cereus* และ *P. fluorescence* ได้ Fullerton *et al.* (2011) ศึกษาคุณสมบัติของกลีบดอกกระเจี๊ยบที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 80 % ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5,

5 และ 10 ด้วยวิธี Agar disk diffusion พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ10 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้สูงที่สุด เนื่องจากสารประกอบฟลาโวนอยด์ในกระเจี๊ยบที่มีโครงสร้างที่สามารถรวมกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้และการเพิ่มขึ้นของจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลในวงแหวนของโครงสร้างที่เพิ่มขึ้น จะทำให้ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ Khalaphallah and Soliman (2014) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดเฮนน่าและกลีบดอกกระเจี๊ยบเพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยสกัดด้วยน้ำและเอทานอล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5 และ 10 ด้วยวิธี Agar disk diffusion พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลให้ผลยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดีกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ เนื่องจากฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพฤกษเคมี และที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 พบว่ากระเจี๊ยบที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ได้ เนื่องจากไอออนไฮดรอกซิลอิสระที่มีอยู่ในสารละลายที่มีความสามารถในการรวมตัวกับคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้ไปเกาะติดอยู่กับเอนไซม์ เอนไซม์ที่เร่งการเจริญเติบโตไม่สามารถทำงานได้ จึงชี้ให้เห็นได้ว่ากระเจี๊ยบที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถนำไปใช้เพื่อยืดอายุในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้

เนื่องจากคุณสมบัติของกระเจี๊ยบที่มีปริมาณสารแอนโทไซยานิน และสารแอนโทไซยานินนี้จะมีความคงตัวมากเมื่ออยู่ในสภาวะเป็นกรด (สุภาพ นนทะสันต์. 2556) โดยค่าความเป็นกรด-ด่างของกลีบกระเจี๊ยบสายพันธุ์นี้ยังมีค่าอยู่ในช่วง 1.5-2.4 ซึ่งสอดคล้องกับ วีรสิงห์ เมืองมั่น (2522) ได้อธิบายว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบประกอบไปด้วยกรดอินทรีย์นิดต่างๆ จำนวนมาก เช่น กรดฮิบิสซิค (hibisic acid) ร้อยละ 23 กรดซิตริก (citric acid) ร้อยละ 12-17 ซึ่งกรดเหล่านี้มีผลไปลดค่าความเป็นกรด-ด่าง ทำให้รบกวนการผ่านเข้าออกของผนังเซลล์และไปทำลายเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน ทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ (ศุภร อังศุจินดา. 2549) นอกจากนี้ยังพบว่าในกลีบกระเจี๊ยบมีสารแอนโธไซยานิน ซึ่งเป็นรงควัตถุในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบมากในกระเจี๊ยบ มีสมบัติในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้นั้นเนื่องจากโครงสร้างที่เป็น double-ring benzopyran มีประจุบวกทำให้ว่องไวต่อการเกิดคีเลท (chelate) ของโลหะไอออนไปรวมกับหมู่ซัลไฟดริล (sulfydryl) ของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสร้างพลังงานของแบคทีเรียเมื่อเอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตทำให้เกิดการยับยั้งและตายไปในที่สุด (Sommaatmadja *et al.* 1964)

2.2.3 คุณสมบัติของกระเจี๊ยบแดงในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ฟลาโวนอยด์ เป็นสารที่ออกฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด ซึ่งจะไปยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ เนื่องจากดอกไม้ในกลุ่มสีแดงมีรงควัตถุในกลุ่มฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และเบต้าแคโรทีน กระเจี๊ยบแดงก็เป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีรงควัตถุในกลุ่มแอนโทไซยานินเช่นกัน จึงทำให้มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Nanjo *et al.* 1996) Yang *et al.* (2012) ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกลีบดอกกระเจี๊ยบที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลที่แตกต่างกัน โดยสกัดด้วยน้ำและเอทานอลร้อยละ 30, 60 และ 95 เทียบกับกรดแอสคอบิก ศึกษาการต้านอนุมูล

อิสระด้วยวิธี DPPH ผลแสดงให้เห็นว่าสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 30 กระเจี๊ยบแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี ผลแสดงให้เห็นว่าสารสกัดนี้สามารถใช้เป็นแหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัย เนื่องจากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลมากที่สุด (20.25 mg GAE /g) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ

Ahmed and Abozed (2014) ศึกษาการเติมผงกลีบดอกกระเจี๊ยบในแครกเกอร์เพื่อเพิ่มใยอาหารและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 1.25, 2.5, 3.75 และ 5 โดยศึกษาปริมาณใยอาหารทั้งหมด ค่า DPPH (ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ) และคุณภาพทางประสาทสัมผัส พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-5 มีใยอาหารเพิ่มขึ้นร้อยละ 3.36-8.17 ค่า DPPH สูงที่สุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 เนื่องจากมีปริมาณสารประกอบฟีโนลิกสูงที่สุดคือร้อยละ 17.57 แสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด แต่จะส่งผลทางด้านคะแนนทางประสาทสัมผัสที่ไม่ยอมรับที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 แต่จะยอมรับได้ที่ร้อยละ 3.75 ผลโดยรวมแสดงให้เห็นว่าผงกลีบดอกกระเจี๊ยบมีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารจะให้ปริมาณเส้นใยและสารต้านอนุมูลอิสระกิจกรรมที่ดีที่ต้องการนำไปใช้ในแป้งและอาหาร เช่น ขนมอบ

2.3 มะม่วงหาวมะนาวโห่ (*Carissa carandas* L.)

2.3.1 ลักษณะทั่วไปของมะม่วงหาวมะนาวโห่

มะม่วงหาวมะนาวโห่ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Carissa carandas* Linn. อยู่ในวงศ์ Apocynaceae (Kumar *et al.* 2013 ; Singh and Uppal. 2015) มีชื่อสามัญคือ Karanda, Carunda และ Christ's thorn หรือชื่อพื้นเมืองอื่น ๆ เช่น มะนาวไม่รู้โห่ หนามแดง และหนามขี้แฮด (วชิราภรณ์ ผิวล่อง และคณะ. 2556 ; Maheshwari *et al.* 2012) มะม่วงหาวมะนาวโห่มีทั้งหมดประมาณ 32 สายพันธุ์ เป็นพืชที่เติบโตได้ดีในเขตอบอุ่น (Mishra *et al.* 2013) สามารถเก็บเกี่ยวผลได้ตลอดทั้งปี แต่จะมีมากในช่วงประมาณเดือนพฤษภาคม-กรกฎาคม มะม่วงหาวมะนาวโห่เป็นไม้พุ่มสูงประมาณ 2-5 เมตร เป็นพืชที่มีความอดทน ทนความแห้งแล้ง แม้ขาดน้ำบ้าง สามารถปลูกได้ดีในสภาพดินหลายแบบ ตามลำต้นและกิ่งก้านหากเด็ดหรือหักจะมียางสีขาว และมีหนามแหลมยาว ใบเป็นใบเดี่ยวรูปรีเกือบกลม ปลายใบเว้าเล็กน้อย โคนใบมนเว้าเข้าหาก้านใบ หลังใบ และท้องใบเรียบ ใบอ่อนมีสีแดง ก้านใบสั้น ดอกเล็กสีขาวออกเป็นช่อออกตามซอกใบใกล้ปลายยอด ผลเป็นผลเดี่ยวออกรวมกันเป็นช่อ เป็นรูปทรงกลมรี ผิวเรียบ ผลอ่อนจะมีสีชมพูอ่อน ๆ และค่อย ๆ เข้มขึ้นเป็นสีแดงจนกระทั่งสุกจึงกลายเป็นสีดำจึงจัดเป็นแหล่งของแอนโทไซยานิน (anthocyanin) รสชาติเปรี้ยวแต่พอแก่จะมีรสกลมกล่อมขึ้น (สกุนกานต์ สิมลา. 2556 ; อดิศักดิ์ จูมวงษ์. 2557 ; Maheshwari *et al.* 2012)

2.3.2 คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

วชิราภรณ์ ผิวล่อง และคณะ (2556) ได้ศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาการสุกต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของมะม่วงหาวมะนาวโห่โดยตัวอย่างจะแบ่งเป็น 3 ระยะ คือ ดิบ กึ่งสุก และสุก นำไปสกัดด้วย

เอทานอลร้อยละ 40 ทำการวิเคราะห์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก ด้วยวิธี FRAP ปริมาณฟีโนลิกทั้งหมดวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-ciocateau reagent assay ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดวิเคราะห์ด้วยวิธี pH differential ปริมาณของวิตามินซีและแอนโธไซยานินวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าผลสุกมีปริมาณฟีโนลิกทั้งหมด ปริมาณแอนโธไซยานิน และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด รองลงมาคือ ระยะกึ่งสุก ส่วนระยะดิบมีปริมาณน้อยที่สุด โดยผลสุกมีปริมาณฟีนอลิก แอนโทไซยานิน DPPH และ FRAP มากกว่าผลดิบ 3.7, 2.8, 1.5, และ 1.66 เท่าตามลำดับ ปริมาณแอนโทไซยานินที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับระยะการสุกโดยแอนโธไซยานินเป็นรงควัตถุในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ทำให้เกิดสีแดง ส่วนปริมาณวิตามินซีพบว่าในผลดิบมีค่ามากกว่าในผลสุกเกือบ 2 เท่า อาจเกิดจากการถูกนำไปใช้เป็นสารประกอบการหายใจ และการนำไปเป็นโครงสร้างคาร์บอนของการสังเคราะห์สารชนิดใหม่ในระหว่างการสุก

Salar and Dhall (2010) ได้ศึกษาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในอินเดีย ได้แก่ *Prosopis cinraria, Capparis decidua, Tinospora cordifolia, C. carandas* และ Cordia dichotoma พืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดสกัดด้วยน้ำ เอทานอล และอะซิโตน วิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี NBT superoxide radical scavenging พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้นทำให้ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอะซิโตนของพืชที่แตกต่างกันพบว่า *C. carandas* (ร้อยละ 63.5) > *T. cordifolia* (ร้อยละ 60.0) > *C. decidua* (ร้อยละ 58.5) > *C. dichotoma* (ร้อยละ 55.5) > *P. cineraria* (ร้อยละ 52.5) ที่ความเข้มข้น 175 μg/ml เท่ากัน ในทำนองเดียวกันประสิทธิภาพของสารสกัดจากเอทานอล *C. carandas* (ร้อยละ 61.0) > *T. cordifolia* (ร้อยละ 59.0) > *C. decidua* (ร้อยละ 56.5) > *C. dichotoma* (ร้อยละ 54.5) > *P. cineraria* (ร้อยละ 53.0) ที่ความเข้มข้น 175 μg/ml ความสามารถของกรด L-ascorbic ซึ่งใช้เป็นสารสกัดสังเคราะห์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ความเข้มข้น 150 μg/ml และกิจกรรมไม่เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นถึง 175 μg/ml ผลของประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดอาจเป็นเพราะการถ่ายโอนอิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมที่แตกต่างในพืชแต่ละชนิดต่างกัน นอกจากนี้ทำการวิเคราะห์ค่า IC_{50} ของสารสกัดจากพืชพบว่ามีค่าแตกต่างกันไปตั้งแต่ 93.0-143.0 μg/ml ในสารสกัดที่สกัดจากอะซิโตน และ 107.0-162.0 μg/ml ในสารสกัดจากเอทานอล แสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่สกัดจากอะซิโตนจะดักจับอนุมูลอิสระได้ดีกว่าและอาจทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังพบว่า มะม่วงหาวมะนาวโห่ที่สกัดด้วยอะซิโตน และเอทานอลให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงร้อยละ 63.5 และ 61.0 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (L-ascorbic acid) ที่ค่า IC_{50} มะม่วงหาวมะนาวโห่ที่สกัดด้วยอะซิโตนมีค่า 93 μg/ml ซึ่งใกล้เคียงกับ L-ascorbic acid (81 μg/ml) อาจเนื่องมาจากลักษณะทางพฤษเคมีของพืช

Bint-e-Sadek *et al.* (2013) ได้ทำการตรวจสอบสารพฤกษเคมีที่แตกต่างกันของสารสกัดจากใบมะม่วงหาวมะนาวโห่ โดยศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่สกัดด้วยเอทานอล และเฮกเซนของใบ

ของมะม่วงหาวมะนาวโห่ผลการศึกษาพบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของมะม่วงหาวมะนาวโห่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยพืชที่สกัดจากเอทานอลและเฮกเซน ที่ IC_{50} เท่ากับ 1.292 และ 1.824 μg/ml ตามลำดับเมื่อเทียบกับ ASA (acscorbic acid) และ BHT ซึ่งมีค่าต่ำกว่า ส่วนกิจกรรมการต้าน H_2O_2 ที่ค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเอทานอล และเฮกเซน เท่ากับ 2.038 และ 1.802 μg/ml ตามลำดับซึ่งดีกว่า ASA นอกจากนี้ศึกษากิจกรรมทางพิษของสารสกัดโดยใช้วิธี brine shrimp lethality bioassay พบว่าที่ IC_{50} มีค่าเท่ากับ 2.818 และ 1.995 ของสารสกัดเอทานอล และเฮกเซนตามลำดับ ผลการทดลองที่พบทำให้ทราบว่าสารพฤกษเคมีของมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่สกัดด้วยเอทานอลให้ผลดีกว่าอาจเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเคมีของพืชจึงทำให้ผลที่แตกต่างกันถึงแม้ว่าจะศึกษาในส่วนใบเหมือนกัน

2.3.3 คุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์

Siddiqi *et al.* (2011) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของโพลีฟีนอลแต่ละชนิดจาก *Grewia aisiatica, Eugenia jambolana* and *Carissa carandas* โดยศึกษาสารประกอบ 4 ชนิด คือ phenolic acid, flavanols, flavonols และ anthocyanin โดยพืชแต่ละชนิดสกัดด้วยเมทานอลร้อยละ 80 พบว่าในผลไม้แต่ละชนิดมีค่าฟีนอลิก flavonoids และค่าสีแตกต่างกันคือ *E. jambolana* > *G. asiatica* > *C. carandas* ตามลำดับ ผลของค่าสีที่แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากการกระจายตัวของสีในหมู่ monomeric และขนาดของพอลิเมอในพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน นอกจากนี้นำสารสกัดหยาบทดสอบกับเชื้อทดสอบได้แก่ *B. subtilis, S. aureus, S. epidermidis,* และ *K. pneumonia* พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญแต่เชื้อ *S. aureus* และ *B. subtilis* ทนต่อการยับยั้งมากกว่าเชื้ออื่นๆ โดยทั่วไปแบคทีเรียแกรมบวกจะไวต่อสิ่งกระตุ้นมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบเพราะความแตกต่างในโครงสร้างของผนังเซลล์ที่แตกต่างกันและฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดใน *G.asiatica* > *E. jambolana* > *C. carandas* และพบว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยกเว้น anthocyanin ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และ flavonols มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมากที่สุด (MIC อยู่ในช่วง 15.625-62.5 $\mu g/mL^{-1}$) เนื่องจากค่าฟีนอลิก และ flavonols ใน *E. jambolana* สูงกว่า *G. asiatica* แต่ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียใน *G. asiatica* สูงกว่าอาจเนื่องมาจากลักษณะโครงสร้างทางเคมีของ polyphenolics และ/หรือ flavonols ในสารสกัดมีผลต่อจุลินทรีย์มากกว่าฟีนอลิก

Gupta *et al.* (2012) ได้ทำการวิเคราะห์ผลการต้านจุลินทรีย์ของผลไม้ 6 ชนิดในอินเดียที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคกับมนุษย์ พืชทั้ง 6 ชนิดจะสกัดด้วยสารละลาย น้ำ : อะซิโตน น้ำ : เมทานอล และ เอทานอล : เฮกเซน : น้ำ ประเมินผลการต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar well diffusion โดยมีเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis* และแกรมลบ *E. coli*, *L. monocytogeneses*, *S.* Typhimurium, *S. flexneri* and *P. aeroginosa* ฤทธิ์การต้านจุลชีพของสารสกัดทดสอบ พบว่า *A. lachoocha* > *Ananas comous* > *Carrasia carandas* > *Beta vulgaris* > *Grewia asiatica* > *Litchi sinensis* โดยเชื้อที่ถูกยับยั้งมากที่สุดคือ *L. monocytogenes, S. aureus* และ *S.* Typhimurium (เคลียร์โซนมากกว่า 20 มม.) (เคลียร์โซนน้อยกว่า 7 มม.) พบใน *B. subtilis* และ *B. cereus* ฤทธิ์ต้านจุลชีพที่แตกต่างกันอาจเนื่องจากความแตกต่างของพฤกษเคมีต่างๆ เช่น อัลคาลอยด์

แทนนิน ซาโปนินและ flavonoids ค่า MIC ของสารสกัดที่ทดสอบกับแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 4.1-6.9 mg/ml^{-1} โดยเชื้อ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* พบว่ามีความเสี่ยงมาก โดยสารสกัดจากน้ำเมทานอล และสารผสมมีประสิทธิภาพการเป็นยาต้านจุลชีพมากที่สุด ผลแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจะไวต่อปฏิกิริยามากกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบอาจจะเป็นเพราะความแตกต่างของโครงสร้างในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งผนังเซลล์แกรมลบเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนซึ่งจะทำให้เป็นอุปสรรคต่อการซึมผ่านของสารสกัดส่วนในแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังเซลล์ชั้นเดียวทำให้สารสกัดซึมผ่านได้ง่ายกว่า

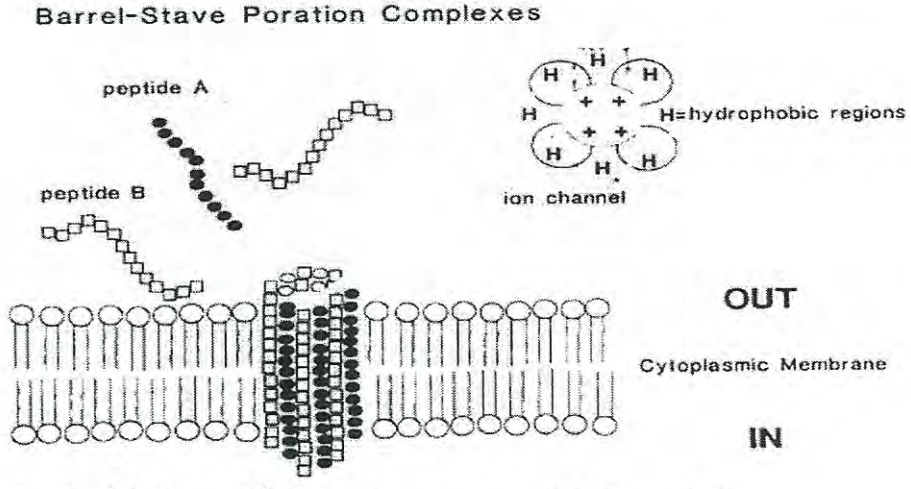
2.4 สารแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

2.4.1 ลักษณะทั่วไปของสารแบคเทอริโอซิน

แบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและการถนอมอาหาร แบคเทอริโอซินจะมีขนาดเล็ก ทนต่อความร้อน(Rodríguez *et al.* 2003) Muyanja *et al.* (2002) กล่าวว่า แบคเทอริโอซินเป็นสารโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิดรวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร โมเลกุลของ แบคเทอริโอซินประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายร้อยตัวต่อกันแบบ linear chain เนื่องจากไม่มีพันธะโฮโดรเจนและ disulphide bridges (-s-s-) สารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อต่างชนิดกันจะมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกันและสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้แตกต่างกัน

2.4.2 กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคเทอริโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคเทอริโอซินเกิดจากการที่แบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุลมาอยู่ร่วมกันทำให้เกิดเป็นช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายชิ้นไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้านข้างของถังไม้ (barrel-stave) แสดงดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 ช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเกิดจากโมเลกุลแบคเทอริโอซินรวมตัวกัน

ที่มา : Klaenhammer. (1993)

ช่องว่างดังกล่าวทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออนสูญเสียกรดอะมิโน และสารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินจึงสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรก แบคเทอริโอซินจะยึดจับกับผิวของเซลล์เป้าหมาย และขั้นต่อไป คือ แบคเทอริโอซินจะสร้างช่องว่างในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ (Ennahar *et al.* 1999) ซึ่งในกลุ่มของ lantibiotic แบคเทอริโอซิน กลุ่มนี้ไม่ต้องการตำแหน่งจำเพาะสำหรับการดูดซับที่ผิวเซลล์ การออกฤทธิ์ต้องอาศัยพลังงานจากเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมายเพื่อทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดช่อง (Bruno and Montville. 1993) แบคเทอริโอซิน เช่นไนซินซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic ที่สร้างจาก *Lc. lactis* subsp. *lactis* พบว่าเป็นสายเพปไทด์ที่มีประจุสุทธิเป็นบวกและมีขั้นตอนในการเข้าทำลายเซลล์เป้าหมาย คือการเข้าจับกับเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวนส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์เช่นกรดอะมิโน สารให้พลังงานและไอออนของสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (Davidson and Hoover. 1993) ส่วนแบคเทอริโอซินในกลุ่มของ non lantibiotic จะเป็นกลุ่มที่ต้องการตำแหน่งที่มีความจำเพาะสำหรับการดูดซับที่ผิวเซลล์และการออกฤทธิ์ไม่จำเป็นต้องใช้พลังงาน (Ennahar *et al.* 1999) นอกจากนี้ในแบคเทอริโอซิน class II ที่มีขนาดเล็ก และทนความร้อนพบว่าในขั้นตอนแรกปลายด้าน N ของโมเลกุลแบคเทอริโอซินซึ่งมีประจุบวกจะเข้าจับส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มของแบคทีเรียเป้าหมายซึ่งมีประจุลบโดยจับเข้าคู่กัน (Abee. 1995) หลังจากนั้นปลายด้าน C ในโมเลกุลแบคเทอริโอซินซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอซิล (acyl group) ของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดเป็นช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการสูญเสียความสมดุลของไอออนและสารประกอบฟอสเฟตภายในเซลล์ (Ennahar *et al.* 2000)

2.4.3 สารแบคเทอริโอซิน Nisin A ที่สร้างจาก *Lactococcus lactis* sb *lactis* Sb2

แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Sb2 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพง สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่ยับยั้งเชื้อได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^{T}, *Lb. sakei* TISTR 890, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344, *Leuconostocmesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^{T}, *Leu. mesenteroides* TISTR 942, *Bacillus coagulans* JCM 257^{T}, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Brochotrix campestris* NBRC 11547, *Pseudomonas fluorescens* JCM 5693^{T}, *Ps. fluorescens* TISTR 358, *Enterococcus faecalis* JCM 5803^{T}, *E. faecalis* TISTR 888, *Staphylococcus aureus* TISTR118 และ*Streptococcus*sp. TISTR1030 ไอโซเลท Sb2 สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินมากที่สุดเมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (12,800 AU/ml) เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของไอโซเลท Sb2 ด้วยวิธีทางกายภาพ ชีวภาพ และวิธี 16s rDNA พบว่า เป็นแบคทีเรียชนิด *Lactococcus lactis* spp. *lactis* ดังนั้นจึงตั้งชื่อว่า *Lc. lactis* spp. *lactis*Sb2 แบ

คเทอริโอซินที่ผลิตจากสายพันธุ์ดังกล่าว ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ α–chymotrypsin,trypsin และ proteinase K สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และมีความเสถียรต่อความเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน เมื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb2 พบว่า สามารถเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซิน เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะความเป็นกรดและด่าง 2-10 โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ และในน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อสามารถเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซินได้มากที่สุดในสภาวะที่ความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 6 (12,800 AU/ml) และโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (12,800 AU/ml) นอกจากนี้ *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb2 ยังมีคุณสมบัติในการต้านทานยา gentamycin, kanamycin, naldixic acid, neomycin, norfloxacin, oxolinic acid และ sulfamethoxazole/trime thoprim และเมื่อทำการศึกษายีนของแบคเทอริโอซิน พบว่าเป็นยีนชนิด nisin A

2.4.4 แบคเทอริโอซิน KL-1

Pilasombut *et al.* (2015) ศึกษาการคัดแยกเชื้อที่สร้างสารแบคเทอริโอซินและคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลกติกจากแหนมจากประเทศเวียตนามเรียกว่า เนมชัว (Nem Chua) จากผลการทดลองสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน ตั้งชื่อว่า *L. plantarum* KL-1 โดยแบคเทอริโอซินที่พบสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบ ได้แก่ *L. plantarum* ATCC14917^{T} (6,400 AU/ml), (12,800 AU/ml), *L. sakei* subsp. *sakei* JCM1157^{T} (12,800 AU/ml), *L. sakei* TISTR 890 (12,800 AU/ml), *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM6124^{T} (1,600 AU/ml), *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR942 (400 AU/ml), *E. faecalis* JCM5803^{T}(6,400 AU/ml) และ *E. faecalis* TISTR 888 (6,400 AU/ml) นอกจากนี้ทำการศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินโดยศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมของเชื้อในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน และจำแนกชนิดของเชื้อที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้มากที่สุด (12,800 AU/ml) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อเดียวกัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สามารถสร้างสารได้ 6,400 AU/ml สารแบคเทอริโอซินสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสและความเย็นที่ 4 องศาเซลเซียส นานสองวัน อย่างไรก็ตามการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาที่นานขึ้น พบว่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อลดลง

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากพืช

พืชที่ใช้ทดสอบได้แก่ ใบมะยม ดอกกระเจี๊ยบ และผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ซื้อจากตลาดสดในกรุงเทพมหานครนำอบแห้งเพื่อรอสกัดต่อไป สารสกัดกระเจี๊ยบแดงและสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ในรูปแบบสกัดด้วยเอทานอล ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. มณทินี ธีรารักษ์ และ รศ.ดร.จำรูญ เล้าสินวัฒนา ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.1.1 สารสกัดจากใบมะยมทำการศึกษาสัดส่วนร้อยละของเอทานอลในการสกัด 0, 25, 50, 75 และ 100%

3.1.2 สารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่และสารสกัดดอกกระเจี๊ยบแดงได้มีการศึกษามาแล้วถึงคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และสรุปว่าการสกัดโดยใช้เอทานอล 100% มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและต้านจุลินทรีย์สูงสุดจึงทำการศึกษาต่อไป

การเตรียมสารสกัดดอกกระเจี๊ยบแดง โดยการนำกลีบดอกกระเจี๊ยบแดงนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำกระเจี๊ยบแดงมาสกัดโดยแช่ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วนของกระเจี๊ยบแดงต่อตัวทำละลาย 1:9 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สกัดโดยการแช่ตัวอย่างในตัวทำละลายเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองสารสกัดผ่านกระดาษกรอง whatman No.1 แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บสารสกัดที่ได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป ซึ่งคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง

สิ่งที่ตรวจวิเคราะห์	ค่าที่ได้
1. ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/น้ำหนักแห้ง 100 g)	675.80
2. ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH: IC_{50} (ppm)	932.25
3. ความสามารถในการรีดิวซ์: EC_{50} (ppm)	937.20
4. ความสามารถในการยับยั้ง lipid peroxidation: IC_{50} (ppm)	217.07

ที่มา : คมแข พิลาสมบัติ และมณทินี ธีรารักษ์ (2557)

การเตรียมสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ เตรียมโดยการนำผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ระยะสุกแกะเมล็ดออกแล้วนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมะม่วงหาวมะนาวโห่มาสกัดโดยแช่ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วนของมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อตัวทำละลาย 1:9 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการแช่ตัวอย่างในตัวทำละลายเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองสารสกัดผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บสารสกัดที่ได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป แสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่

สิ่งที่ตรวจวิเคราะห์	ค่าที่ได้
1. ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/น้ำหนักแห้ง 100 g)	1756.23
2. ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH: IC_{50} (ppm)	422.73
3. ความสามารถในการรีดิวซ์: EC_{50} (ppm)	4786.30
4. ความสามารถในการยับยั้ง lipid peroxidation: IC_{50} (ppm)	858.77

ที่มา : คมแข พิลาสมบัติ และมณทินี ธีรารักษ์ (2557)

3.2 วิธีการเตรียมแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินที่ใช้ในการทดสอบได้จากเชื้อ *lactococcus lactis* subsp.*lactis* sb2 มีชื่อว่า Nisin A มีชื่อว่า KL-1 และ *L. plantarum* KL-1 วิธีการเตรียมแบคเทอริโอซินดังกล่าว นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร MRS broth ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำเฉพาะส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อไปต้มเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเตรียมความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินโดยทำการเจือจางแบบ two fold dilution จากนั้นปรับค่า pH ของส่วนใสและทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยแผ่นกรองจุลินทรีย์

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและ แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย ซึ่งแสดงการติดสีแกรมของแบคทีเรีย อาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แบคทีเรียทดสอบ ชนิดแบคทีเรีย อาหารที่ใช้เลี้ยง และอุณหภูมิสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย

เชื้อทดสอบ	การติดสีแกรม	อาหาร	อุณหภูมิ (°C)
แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค			
Salmonella Typhimurium TISTR 292	-	TSB-YE	37
Staphylococcus aureus TISTR 118	+	TSB-YE	37
Escherichia coli TISTR 780	-	TSB-YE	37
Listeria innocua ATCC 33090^{T}	+	TSB-YE	37
Aeromonas hydrophila TISTR 1321	-	TSB-YE	30
แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย			
Pseudomonas fluorescens JCM 5963^{T}	-	TSB-YE	26
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	-	TSB-YE	26
Lactobacillus plantarum 1149	+	MRS	30
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JCM1157^{T}	+	MRS	30
Lactobacillus sakei TISTR 890	+	MRS	37
Lactobacillus plantarum ATCC 14947	+	MRS	30
Lactococcus cremoris TISTR 1344	+	MRS	30
Lactococcus lactis 19435	+	MRS	30
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* JCM 6124^{T}	+	MRS	30
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* TISTR 942	+	MRS	30
Enterococcus faecalis TISTR 888	+	MRS	37
Streptococcus sp. TISTR 1030	+	MRS	30
Bacillus coagulans TISTR 1447	+	TSB-YE	37
Bacillus subtilis JCM 1465	+	TSB-YE	37

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Md

JCM = Japanese Culture of Microorganism, Wako, Japan

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Thailand

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) เครื่องสับผสม (K41RaS, Seydelmann, Seydelmann, Germany)

2) เครื่องชั่งชนิดหยาบ (Tanita model 1144, Tanita Corporation, Japan)

3) เครื่องชั่งชนิดละเอียด (Sartorius, Basic, Sartorius Stedim Biotech GmbH , Germany)

4) ตู้เขี่ยเชื้อ Laminar Flow (Dwyer model merk II, Corporate HQ Michigan city , USA)

5) ตู้บ่มเพาะเชื้อจุลินทรีย์ (WTB Binder model BD, BINDER GmbH , Germany)

6) ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot-air oven, Memmert model CM500, Memmert GmbH , Germany)

7) หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Auto clave, Hirayama model HVE 50, Hariyama manufacturing corporation , Japan)

8) อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath, Memmert, Memmert GmbH ,Germany)

9) เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer KMC-1300V, Vision Sciencyific co. ltd., Korea)

10) เครื่องตีป่นไฟฟ้า (Stomacher Bag Mixer 400 model VW, Vision Scientific , France)

11) ไมโครเวฟ (Toshiba model ER-G8C, Toshiba Thailand, Thailand)

12) Multipipette (CappAero96 Multichanel pipette C20-8, Capp, Capp Brand, Denmark)

13) Autopipette (Capp Aid pipette controller PA-100, Capp, Capp Brand, Denmark)

14) ไมโครปิเปต ขนาด 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Finnpipette F3, Thermo Scientific, USA)

15) เครื่องวัดค่าสี (Hunterlab Mini Scan EZ LAV, Hunter Associates Laboratory, Inc , USA)

16) เครื่อง Homogenizer (Ultra tarrax model IKA T25 digital, IKA group, Germany)

17) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Shimadzu model UV–1601, Shimadzu Corparation , Japan)

18) เครื่องวัดค่า กรด-ด่าง (Mettler Toledo model SG-2, Mettler Toledo International Inc., Switzerland)

19) เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) (Beckman Coulter model Avanti J-E, Beckman coulter company , USA)

20) เครื่องปิดผนึกด้วยความร้อน (SK-310, Dako, Impulse sealer , Korea)

21) กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman, SIGMA-ALDRICH, England)

3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) Agar (Criterion, USA)

2) Baird-Parker agar (Merck, Germany)

3) Chromocult (Merck, Germany)

4) Hekoten-Entero-Agar (Merck, Germany)

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

5) Malt extract (Merck, Germany)
6) Lysine-Indole-Motility (LIM) medium (Difco, USA)
7) MRS broth (Merck, Germany)
8) Plate count agar (Merck, Germany)
9) Simmons citrate agar (Merck, Germany)
10) Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Germany)
11) Triple sugar iron (TSI) agar (Merck, Germany)
12) Yeast extract granulated (Merck, Germany)
13) Mueller Hinton Broth (MHB) (Merck, Germany)
14) Potassium tellurite-hydrate (Merck, Germany)
15) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma, Germany)
16) 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman- 2-carboxylic acid (Trolox) (Sigma, Germany)
17) Ethanol 99% (Merck, Germany)
18) Methanol (Merck, Germany)

3.6 แผนการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

วัตถุประสงค์	กิจกรรม
<u>การทดลองที่ 1</u> ศึกษาสัดส่วนของสารสกัด (เอทานอล:น้ำ)ต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบมะยม 1. ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากใบมะยมในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียที่มักพบในอาหาร 2. การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxincity) ของสารสกัดจากใบมะยม 3. ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบมะยมใน	1.ศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบมะยม 1.1.1 Crude Yield 1.1.2 Total phenolic content 1.1.3 Total flavonoid content 1.1.4 lipid peroxidation 1.1.5 Reducing power 1.1.6 DPPH 1.1.7 Metal chelating 2. ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียของสารสกัดจากสารสกัดใบมะยม โดยวิธี Agar well diffusion method 3.การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxincity) ของ

147852

เนื้อสุกรบด	สารสกัดจากใบมะยม 4.ใช้สารสกัดจากใบมะยมในเนื้อสุกรบดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ศึกษาคุณภาพเนื้อด้านกายภาพและเคมี ศึกษาคุณภาพด้านกายภาพ ได้แก่ ค่าสี ค่า pH ศึกษาด้านเคมีได้แก่คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่อุณหภูมิ 4 และ –20 องศาเซลเซียส เช่น DPPH, ABTS, Reducing power และ TBARS และคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส
<u>การทดลองที่ 2</u> ศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดจากพืชและสารแบคเทอริโอซิน 2.1 สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ร่วมกับสารแบคเทอริโอซิน Nisin A 2.2 สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ร่วมกับสารแบคเทอริโอซิน KL-1 2.3 สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับสารแบคเทอริโอซินไนซิน Nisin A 2.4 สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับสารแบคเทอริโอซิน KL-1	1. ศึกษาการทำงานเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic testing) ของสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1, Nisin A ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อเป้าหมาย โดยวิธี Checker board broth 2. ศึกษาระยะเวลาที่สารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่และแบคเทอริโอซิน KL-1, Nisin A สัมผัสเชื้อต่อการลดลงของจำนวนเชื้อ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium โดยศึกษาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดและจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ (Cell stress) ของเชื้อบริสุทธิ์ (*In vitro*) 3.ศึกษาการทำงานเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic testing) ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อเป้าหมาย โดยวิธี Checker board broth 4. ศึกษาระยะเวลาที่สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1, Nisin A สัมผัสเชื้อต่อการลดลงของจำนวนเชื้อ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium โดยศึกษาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดและจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ (Cell stress) ของเชื้อบริสุทธิ์ (*In vitro*)
<u>การทดลองที่ 3</u> ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับสารแบคเทอริโอซิน	1. ศึกษาผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 ต่อคุณภาพทาง

KL-1 ต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและต้านจุลินทรีย์ได้ดีจึงนำไปศึกษาต่อในการทดลองที่ 3	จุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส บรรจุใส่ถาดโฟมเก็บรักษานาน 10 วัน ดังนี้ 1.1 คุณภาพด้านจุลินทรีย์ ได้แก่ - จุลินทรีย์ทั้งหมด - จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophilic) - ยีสต์และรา - Coliforms และ *E. coli* 1.2 คุณภาพด้านกายภาพ ได้แก่ - ค่าสี (L*a*b*) - ค่าความเป็นกรด-ด่าง 2. ศึกษาผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อเนื้อสุกรบดแช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส บรรจุใส่ถุงเย็น ปิดผนึกด้วยความร้อน เก็บรักษานาน 4 เดือน ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (1,1-Diphenyl-2 picrylhydrazyl)

3.6.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบมะยม

3.6.1.1 การสกัดสารจากใบมะยม

นำใบมะยมไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ทำการแยกสารสกัดจากพืชด้วยน้ำและเอทธานอลโดยศึกษาสัดส่วนของเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัด ที่เหมาะสมในการสกัดที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100% โดยการกรองผ่านกรวยโดยการใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 แยกส่วนกากเอาแต่ส่วนที่เป็นของเหลว กรองซ้ำ 2 รอบเพื่อลดการตกค้างของเศษพืช

3.6.1.2 การวิเคราะห์ความสามารถต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดจากพืชทดสอบ

(1) การศึกษาความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอม (DPPH radical-scavenging activity)

นำสารสกัดจากพืชที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 2 มิลลิลิตรทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 100μM จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 517

นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Miliauskas *et al.* 2004) ทำการทดสอบอย่างละ 3 ซ้ำ บันทึกค่าการดูดกลืนแสง และนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging capacity) คำนวณค่า IC_{50}จากกราฟระหว่างค่า log ของความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อหาความสัมพันธ์และสมการเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและค่า regression

(2) การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล Hydroxyl ($OH^{\bullet}$) (Hydroxyl (OH) radical scavenging activity) ของสารสกัดจากพืชทดสอบ

นำสารสกัดจากพืชที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำปฏิกิริยากับ deoxyribose เข้มข้น 3.75 mM H_2O_2เข้มข้น 1 mM potassium phosphate buffer เข้มข้น 20 mM ที่ pH 7.4 $FeCl_3$เข้มข้น 0.1 mM EDTA เข้มข้น 0.1 mM และวิตามินซี เข้มข้น 0.1 mM ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงหลังจากนั้นเติม 1% thiobarbituric acid จำนวน 1 มิลลิลิตรและ 2.8% (w/v) trichloroacetic acid จำนวน 1 มิลลิลิตรนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 20 นาที ทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำแข็ง จึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรทำการทดสอบอย่างละ 3 ซ้ำบันทึกค่าการดูดกลืนแสงและนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านการกำจัดอนุมูล hydroxyl (Halliwell *et al.* 1987)

(3) การวิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะ Fe^{2+} (metal chelating activity) ของสารสกัดจากพืชทดสอบ

นำสารสกัดจากพืชที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 1 มิลลิลิตรทำปฏิกิริยากับสารละลายเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเติมสารละลาย Ferrozine ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Singh and Rajini 2004) ทำการทดสอบอย่างละ 3 ซ้ำบันทึกค่าการดูดกลืนแสงและนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะ Fe^{2+}

(4) การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing power) ของสารสกัดจากพืชทดสอบ

นำสารสกัดจากพืชที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 M ที่ pH 6.6 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรและสารละลาย $K_3Fe(CN)_6$ 1% ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 10% TCA ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงนาน10 นาทีเก็บสารละลายส่วนบนปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.1% $FeCl_3$ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรด้วย

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง นำไปคำนวณความสามารถในการรีดิวซ์ในรูปมิลลิกรัมของกรดแกลลิก (Gallic acid: GAE) ต่อกรัมของสารสกัดโดยคำนวณจากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Chan *et al.* 2007)

(5) การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง lipid peroxidation ของสารสกัดจากพืชทดสอบ

เติมสารละลายไข่แดงเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตรในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารสกัดจากพืชทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 1 มิลลิลิตรแล้วตามด้วยสาร $FeSO_4$เข้มข้น 1000 µM จำนวน 100 ไมโครลิตรนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นแบ่งสารละลายที่ได้จำนวน 1 มิลลิลิตร เติมสาร Thiobarbituric acid (ละลายใน trichloracetic acid 20%) เข้มข้น 0.5% จำนวน 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาแช่ในน้ำแข็งทันที นำไปหมุนเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm ส่วนหลอดควบคุมเติมสารละลายไข่แดงและสาร $FeSO_4$นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิด lipid peroxidation (Kuppusamy *et al.*2002)

(6) การวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) ในสารสกัดจากพืชทดสอบ

นำสารสกัดจากใบมะยมที่ความเข้มข้น 5000 ppm จำนวน 1 มิลลิลิตรทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5%ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นจึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Kahkonen *et al.* 1999) ทำการทดสอบอย่างละ 3 ซ้ำ และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยเปรียบเทียบจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

3.6.1.3 การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรลดขนาด

(1) ค่าการออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์ (Lipid oxidation) โดยวิธี 2-Thiobar bituric Acid Reactive Substance (TBARS) ตามวิธีดัดแปลงจาก Buege and Aust. (1987)

โดยชั่งตัวอย่างเนื้อสุกรลดขนาดจำนวน 2 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง 50 มิลลิลิตร centrifugal tube และบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นใส่สารละลาย TBA ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำไป Homogenize ที่ความเร็วรอบ 9,500 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นให้ความร้อนในน้ำเดือด (95-100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นโดยการเปิดน้ำไหลผ่าน และนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง ด้วยความเร็วรอบ 5,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใสไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank

จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของ TBARS ที่ได้โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร 1,1,3,3 trtra-ethoxypropane และคำนวณค่า TBARS ที่แสดงในหน่วย mg MDA/kg meat

(2) การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดักจับอนุมูลอิสระโดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอม (1,1-Diphenyl-2 picryhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) ตามวิธีการดัดแปลงจาก Tongnuanchan *et al.* (2012); Qwele *et al.* (2013)

โดยชั่งตัวอย่างเนื้อสุกรลดขนาดจำนวน 0.5 กรัม ละลายในเอทานอลความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ml นำไป Homogenize ที่ความเร็วรอบ 9,500 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บสารละลายส่วนใส (ตัวอย่าง) โดยดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.2 มิลลิโมล DPPH ที่ละลายด้วยเมทานอล ผสมให้เข้ากันด้วย เครื่องผสมสารละลาย ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นอกจากนี้เตรียมหลอดควบคุมโดยใช้เมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และเตรียมหลอด Blank ดูดสารละลายใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับเมทานอล 1 มิลลิลิตรวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Shimadzu model UV-1601, japan) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระจากสูตร

$$\%\text{Inhibition of DPPH} = 1 - \frac{(\text{absorbance of sample} - \text{absorbance of blank}) \times 100}{\text{Absorbance of control}}$$

(3) ค่าการวิเคราะห์หาความสามารถของสารสกัดในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส $ABTS^{+}$ assay ตามวิธีการของ Re *et al.* (1999)

เตรียมสารละลาย potassium persulfate ($K_2O_8S_2$) ความเข้มข้น 2.45 mM กระตุ้น ABTS (2,2–azion–bis-3–ethylbenzothiazoline–6-sulphonic acid) ความเข้มข้น 7 mM ให้เปลี่ยนเป็น $ABTS^{++}$ cation radical ซึ่งมีสีเขียวอมฟ้า และสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยทำปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลานาน 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเอบีทีเอสที่ได้มาเจือจางในเอทานอล และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.70 ± 0.02 ก่อนใช้งานทุกครั้ง จากนั้นเจือจางสารสกัดแต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทดลองปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย $ABTS^{+}$ 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 6 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และนำไปคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยเปรียบกับค่าดูดกลืนแสงของ $ABTS^{+}$ ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับสารสกัดและคำนวณจากสูตร

$$\%\text{Inhibition of ABTS}^{+} = [(A-B) - (C-D) / (A-B)] \times 100$$

(4) ค่าการวิเคราะห์หาความสามารถของสารสกัดในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี Reducing power ตามวิธีการของ Vijayalakshmi and Ruckmani (2016)

เจือจางสารสกัดแต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม 200 mM ของ phosphate buffer pH 6.6 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และสารละลาย 1% ของ potassium ferriccyanide ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 20 นาที เติม 10% ของ TCA ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3000 rpm อุณหภูมิ 25°C นาน 10 นาที ดูดสารละลายใส 2.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร และ 0.1% ของ ferric chloride ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 nm ใช้ BHT เป็นสารมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบ

3.6.1.4 ทดสอบสารสกัดจากใบมะยมในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่ทำให้อาหารเน่าเสีย กลุ่มก่อโรค และกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติก โดยวิธี Agar Well Diffusion Method

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ Perez (1990)โดยนำโคโลนีของเชื้อที่ได้จากการเตรียมเชื้อทดสอบทำการเจือจางใน 0.85% NaCl 9 มิลลิลิตรนำไปเปรียบเทียบความขุ่นกับ 0.5 McFalandstandard จะได้ความเข้มข้นที่ 10^8 cfu/ml ทำการเจือจางที่ความเข้มข้นจาก 10^8cfu/ml ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^5cfu/ml โดยนำเชื้อผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวลงใน plate ปล่อยให้แห้ง เจาะหลุมด้วย cork-borer (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) หยดสารสกัดที่ได้ลงในหลุม 50 ไมโครลิตร นำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิด (ตารางที่ 2) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ในหน่วยมิลลิเมตร (รวมกับเส้นผ่าศูนย์กลางของหลุมด้วย)

3.6.1.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) ในหลอดทดลอง (*In vitro*) ของสารสกัดน้ำจากใบมะยมและผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

เนื่องจากต้องการนำสารสกัดน้ำจากพืชทั้งสองชนิดเพื่อการบริโภค ดังนั้นจึงทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดน้ำจากใบมะยมและผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ทำการวิเคราะห์โดยส่งตัวอย่างตรวจที่สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงการณ์มหาวิทยาลัย เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ 1) เซลล์มะเร็งลำไส้ ใช้เซลล์มาตรฐาน SW620 (ATCC® CCL-227™) และ 2) เซลล์ปกติจากปอด WI-38 (ATCC® CCL-75™)

ซึ่งมีวิธีการทดสอบดังนี้

1) เตรียมเซลล์ใน 96 well plate ใช้เซลล์ wi-38 และ SW620 จำนวน $1x10^4$ และ $1x10^5$ ต่อ well ปริมาตร 200 µl/well เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 นาน 1 วัน

2) เตรียมสารสกัดจากพืชทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.391, 0.195 และ 0 mg/ml

3) เติมสารตัวอย่าง 2 µl/well ดังนั้นจะได้ความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.91, 1.95 และ 0 µg/ml เลี้ยงเซลล์นาน 3 วัน

4) เติม Methyl tetrazolium 3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) เข้มข้น 5 mg/ml ปริมาตร 10 µl/well บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง

5) เติม DMSO ปริมาตร 150 µl/well เขย่าให้ผลึกละลาย วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm

6) คำนวณเปอร์การรอดชีวิตของเซลล์ (PS)

PS = (OD ตัวอย่าง / OD ตัวควบคุม) x 100

7) รายงานผลเป็นค่า IC_{50}

3.6.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาการทำงานเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic testing) ของสารสกัดจากพืชร่วมกับแบคเทอริโอซิน

3.6.2.1 ศึกษาการทำงานเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic testing) ของสารสกัดจากพืชร่วมกับแบคเทอริโอซิน

โดยวิเคราะห์แบบ Checker board broth dilution แบบ two fold dilution ของ MIC ของสารแต่ละชนิดในสัดส่วน 1:1 จำนวน 7 ระดับ ได้แก่ สารสกัดจากพืชความเข้มข้น 100 ถึง 0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคเทอริโอซิน Nisin A KL-1 พบว่ามีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อ *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 เท่ากับ 6400 AU/ml และทำการเจือจางแบบ two fold dilution จะได้ความเข้มข้น 6400 ถึง 50 AU/ml ตามวิธีของ Turgis *et al.* (2012) ทำการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันตามวิธีของ Bharadwaj *et al.* (2003) ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ทำการเตรียมสารปิเปตลงในหลุมของ micro plate ลำดับการใส่ ดังนี้

- ใส่สารสกัดความเข้มข้นแต่ละระดับลงในหลุมปริมาตร 20 ไมโครลิตร
- ใส่แบคเทอริโอซินความเข้มข้นแต่ละระดับปริมาตร 50 ไมโครลิตร
- ใส่อาหาร 2x TSB ปริมาตร 110
- ใส่เชื้อ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ให้มีระดับความเข้มข้นสุดท้ายใน microplate 5 x 10^5 cfu/มิลลิลิตร โดยเตรียมกลุ่มควบคุมตัวอย่างละ 3 แบบ ดังนี้

1) growth control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + แบคทีเรีย

2) negative control คือ ตัวทำละลาย + อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + แบคทีเรีย

3) sterile control คือใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ

ปิดฝา microplate เขย่าเบาๆ ให้อาหารและเชื้อผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการวัดความขุ่น จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปประมวลผลค่า MIC, MIC_{90} และ MBC ของการใช้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซินร่วมกันและวิเคราะห์ค่า Fractional inhibitory concentration index (FICI) และ Fractional bactericidal concentration index

(FBCI) ตามลำดับ โดยมีสูตรในการคำนวณหาค่าดัชนีเพื่อใช้พิจารณาการออกฤทธิ์เสริมกัน (Lorian. 2005) ดังนี้

ค่า FICI = FIC(A) + FIC(B)

= [A]/MIC(A) + [B]/MIC(B)

[A] คือ ค่า MIC ของสาร A ในสารผสมระหว่างสาร A และสาร B

[B] คือ ค่า MIC ของสาร B ในสารผสมระหว่างสาร A และสาร B

MIC(A) คือ ค่า MIC ของสาร A

MIC(B) คือ ค่า MIC ของสาร B

ค่า FBCI = FBC(A) + FBC(B)

= [A]/MBC(A) + [B]/MBC(B)

[A] คือ ค่า MBC ของสาร A ในสารผสมระหว่างสาร A และสาร B

[B] คือ ค่า MBC ของสาร B ในสารผสมระหว่างสาร A และสาร B

MBC(A) คือ ค่า MBC ของสาร A

MBC(B) คือ ค่า MBC ของสาร B

เมื่อคำนวณตามสูตรข้างต้นจะนำค่าดัชนีมาแปลผลเพื่อพิจารณาการออก-ฤทธิ์เสริมกัน ดังนี้

- FICI หรือ FBCI $\leq$ 0.5 คือ ออกฤทธิ์เสริมกัน
- FICI หรือ FBCI > 0.5 to 1.0 คือ ออกฤทธิ์เสริมกันบางส่วน
- FICI หรือ FBCI > 1.0 to <2.0 คือ ไม่ออกฤทธิ์เสริมกันหรือขัดขวางกัน
- FICI หรือ FBCI $\geq$ 2.0 คือ ออกฤทธิ์ขัดขวางกัน

3.6.2.2 ศึกษาระยะเวลาที่สารสกัดจากพืชและแบคเทอริโอซินต่อจำนวนเชื้อ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium

โดยศึกษาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดและจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ (Cell stress) ของเชื้อบริสุทธิ์ (*In vitro*) ตามวิธีของ Tangwatcharin *et. al.* (2006) โดยเลือกระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำลายแบคทีเรียได้ (MBC) (จากการศึกษาก่อนหน้านี้) โดยค่า MBC ของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ และดอกกระเจี๊ยบมีค่า 25 และ 50 ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่เหลืออยู่ภายหลังสัมผัสสารสกัดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ระยะเวลาต่างๆ สำหรับเชื้อ (1) *S. aureus* TISTR 118 และ (2) *S.* Typhimurium TISTR 292 เพื่อหาปริมาณ total culturable cells ของแบคทีเรียทุกชนิดและจุลินทรีย์ทั้งหมด และเพาะเลี้ยงบนอาหารที่จำเพาะกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนั้น เพื่อหาปริมาณ culturable cells โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกปริมาณ

แบคทีเรียที่เหลืออยู่ภายหลังสัมผัสสารสกัด นำข้อมูลที่ได้ไปประมวลผล และนำเสนอเป็นค่า log cfu โดยนำข้อมูลไปประมวลผล Population density estimate หาค่า non-stressed และ stressed cells ของแบคทีเรียแต่ละชนิด ดังสมการ

stressed cells = total culturable – culturable

non-stressed cells = culturable

3.6.2.3 ศึกษาผลของสารสกัดจากพืชร่วมกับแบคเทอริโอซินในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในเนื้อสุกรบด

(1) วิธีการเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างเนื้อสุกรบดโดยใช้เนื้อส่วนสะโพกต่อไขมันในอัตราส่วนร้อยละ 90 : 10 ที่ซื้อจากโรงฆ่าที่ได้มาตรฐาน จังหวัดนครปฐม ทำการตัดแต่งไขมันที่ติดอยู่ในส่วนสะโพกออก จากนั้นหั่นเนื้อและไขมันเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องสับผสม บดให้เข้ากัน ดังนั้นในการศึกษาต่อไปนี้จะใช้เนื้อสุกรบดที่มีองค์ประกอบของไขมันเป็นตัวแทนในการศึกษา จากนั้นนำไปคลุกกับสารสกัดกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซินที่เตรียมไว้ โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มการทดลอง (ความเข้มข้นสุดท้ายในเนื้อสุกรบด) คือ

1. กลุ่มควบคุม (ไม่เติมสารสกัด)
2. กลุ่มที่เติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
3. กลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน 640 AU/ml
4. กลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน 320 AU/ml
5. กลุ่มที่เติมสารสกัด 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 640 AU/ml
6. กลุ่มที่เติมสารสกัด 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 40 AU/ml

นำเนื้อสุกรบดแบ่งบรรจุถาดโฟมชนิดโพลีสเตรียรีน (Polystyrene, PS) ถาดละ 50 กรัม ใช้ฟิล์มพลาสติกชนิด PVC ปิดทับ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

(2) ศึกษาความสามารถของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันในการยับยั้ง *S. aureus* ในเนื้อสุกรบด

โดยการเติมเชื้อก่อโรค *S. aureus* เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในเนื้อสุกรบด เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อดังกล่าวตามวิธีของ BAM (2001) โดยทำการเติมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 10^3 cfu/g ในเนื้อสุกรบดทั้ง 6 กลุ่มการทดลอง นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน วิเคราะห์หาจำนวนการมีชีวิตรอดของ *S. aureus* ในเนื้อสุกรบดที่เติมสารสกัดหลังเติมเชื้อ โดยสุ่มตัวอย่างเนื้อสุกรบด น้ำหนัก 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในถุงพลาสติก

ละลายในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง Stomacher จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 จากนั้นเจือจางตัวอย่าง จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นดูดสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Baird-Parker agar (BP) ที่ผสมไข่แดง ปริมาตร 15 - 20 มิลลิลิตร โดยวิธี Spread plate รอจนอาหารแข็งแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะกลมนูน สีดำเป็นมัน ผิวเรียบ ขอบขาว มีตะกอนขุ่นรอบ ๆ โคโลนี รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30–300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g จากนั้นสุ่มเลือกโคโลนีที่สงสัยมาวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ Couagulase test โดยดูด Rabbit plasma ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงบนสไลด์ที่ทำความสะอาดแล้ว ถ่ายเชื้อลงบนสไลด์ที่มีการหยด Rabbit plasma แล้ว ทำการ smear สังเกตการเกิดเส้นใยบนสไลด์

(3) ศึกษาความสามารถของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วม แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันในการยับยั้ง *Salmonella* spp ในเนื้อสุกรบด

โดยการเติมเชื้อก่อโรค *S.* Typhimurium ในเนื้อสุกรบด เก็บรักษาอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน จากนั้นตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อดังกล่าวตามวิธีของ BAM (2014) โดยทำการเติมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 10^3 cfu/g ในเนื้อสุกรบดทั้ง 6 กลุ่มการทดลอง นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน วิเคราะห์หาจำนวนการมีชีวิตรอดของ *S.* Typhimurium ในเนื้อสุกรบดที่เติมสารสกัดแล้วก่อนเติมเชื้อและหลังเติมเชื้อ โดยสุ่มตัวอย่างเนื้อสุกรบดน้ำหนัก 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในถุงพลาสติก ละลายในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง Stomacher จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 จากนั้นเจือจางตัวอย่าง จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นดูดสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Hektoen enteric agar (HE) ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Novomyocin โดยวิธี Spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีสีน้ำเงินเขียวและตรงกลางมีสีดำ กลม นูน ผิวเรียบเป็นมัน อาจพบหรือไม่พบจุดตรงกลาง นำโคโลนีไปทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อโคโลนีที่สงสัยไปเพาะลงในอาหาร lysine iron agar (LIA) และ triple sugar iron agar slant (TSI) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูผลปฏิกิริยาทางชีวเคมีในหลอด TSI agar slant และ LIA agar เชื้อ *Salmonella* spp

3.6.3 การทดลองที่ 3 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด

3.6.3.1 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพด้านจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส

วิธีเตรียมตัวอย่างดังแสดงในการทดลองที่ 2 ข้อ (1) เก็บรักษาอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน ทำการวิเคราะห์ ดังนี้

(1) คุณภาพทางจุลินทรีย์ ดังนี้

- จุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count)

การวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมดในเนื้อสุกบด ตามวิธีของ AOAC (2006) โดยสุ่มตัวอย่าง 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นนำมาเจือจางจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นปิเปตตัวอย่างและ dilution ที่เตรียมไว้จำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยวิธี Pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar หลังจากนั้นนำจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานอาหารเพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่มีจำนวนระหว่าง 30–300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g

- จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophilic)

การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำในเนื้อสุกรบด ตามวิธีการของ Diliello (1982) โดยสุ่มตัวอย่างน้ำหนัก 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในถุงพลาสติกละลายในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง Stomacher จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 จากนั้นเจือจางตัวอย่าง จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นดูดสารละลายเจือจาง 1 มิลลิลิตร ลงจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Plate Count Agar โดยวิธี Pour plate ที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ รอจนอาหารแข็งแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน จากนั้นนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30–300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g

- ยีสต์ และรา

การวิเคราะห์หายีสต์ และราในเนื้อสุกรบด ตามวิธีของ AOAC (2005) โดยสุ่มตัวอย่าง 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นนำมาเจือจางจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นปิเปตตัวอย่างและ dilution ที่เตรียมไว้จำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยวิธี Pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt agar ที่มีการเติมกรดแลกติค หลังจากนั้นนำจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนับจำนวนเชื้อยีสต์และราทั้งหมด รายงานผล

จำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานอาหารเพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่มีจำนวนระหว่าง 30–300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g

- Coliforms และ *E. coli*

การวิเคราะห์หา Coliform และ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์ ตามวิธีของ AOAC (2006) โดยสุ่มตัวอย่างเนื้อสุกรบดน้ำหนัก 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นนำมาเจือจางจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นปิเปตตัวอย่างและ dilution ที่เตรียมไว้จำนวน 0.1 มิลลิลิตร เพื่อการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดบนจานอาหารเพาะเชื้อ รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g

(2) คุณภาพด้านกายภาพ ดังนี้

- การวัดค่าสี (L*a*b*)

วัดค่าสี (CIE L*a*b*) โดยนำตัวอย่างเนื้อสุกรบดทุกกลุ่มการทดลอง โดยมีขนาด 5 x 5 x 2 เซนติเมตร กลุ่มทดลองละ 3 ชิ้น มาวัดค่าสีในรูปแบบ CIE (L*a*b*) ชิ้นละ 3 จุด ด้วยเครื่องวัดสี Hunter Lab Mini Scan EZ (Hunter Lab Inc., Reston, USA) เมื่อ L* คือค่าความสว่าง a* คือสีแดง และ b* คือสีเหลือง

- การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ตามวิธีของ Carpenter *et al.* (2007) โดยชั่งตัวอย่างเนื้อสุกรบด 2 กรัม ใส่น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องโฮโมจีไนซ์ จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่องวัด pH meter บันทึกผล กลุ่มการทดลองละ 3 ซ้ำ

3.6.3.2 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกัน เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (1,1-Diphenyl-2 picrylhydrazyl) ของเนื้อสุกรบดแช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

วิธีเตรียมตัวอย่างดังแสดงในการทดลองที่ 1 ข้อ (1.3.1) เก็บรักษาอุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส โดยเก็บใส่ถุงสำหรับแช่แข็งชนิด PE (polyethylene) และปิดผนึกด้วยความร้อน เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (1,1-Diphenyl-2 picrylhydrazyl) ตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Qwele *et al.* (2013) และ Tongnuanchan *et al.* (2012) โดยชั่งตัวอย่างเนื้อสุกรบดจำนวน 2 กรัม ละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99 ปริมาตร20 มิลลิลิตร นำไปโฮโมจีไนซ์ที่ความเร็วรอบ 9,500 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง

ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บสารละลายส่วนใส (ตัวอย่าง) โดยดูดสารละลายส่วนใสปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.2 mM DPPH ที่ละลายด้วยเมทานอล ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นอกจากนี้เตรียมหลอดควบคุมโดยใช้เมทานอลปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาณ มิลลิลิตร และเตรียมหลอด Blank ดูดสารละลายส่วนใสปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับเมทานอล 1 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระจากสูตร

$$\% \text{ Inhibition of DPPH} = 1 - \frac{\text{absorbance of sample} - \text{absorbance of blank}}{\text{absorbance of control}} \times 100$$

3.6.3.3 การวิเคราะห์ด้านประสาทสัมผัส

วิเคราะห์คุณภาพด้านประสาทสัมผัสโดยศึกษาความชอบโดยรวมของผู้บริโภคด้วยการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้านลักษณะปรากฏ ลักษณะเนื้อสัมผัส สี กลิ่น รส และลักษณะโดยรวมของผลิตภัณฑ์ ประเมินโดยวิธี Consumer test ตามวิธีของ Meilgaard *et al.* (1987) ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 7-Point hedonic scale โดยใช้คะแนนความชอบ 7 ระดับ ตั้งแต่ 1 – 7 ดังต่อไปนี้

1 หมายถึง	ไม่ชอบมากที่สุด
2 หมายถึง	ไม่ชอบมาก
3 หมายถึง	ไม่ชอบ
4 หมายถึง	เฉยๆ
5 หมายถึง	ชอบ
6 หมายถึง	ชอบมาก
7 หมายถึง	ชอบมากที่สุด

จำนวนผู้ทำการทดสอบเป็นอาจารย์ บุคลากรและนักศึกษา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองที่ 1 ศึกษาสัดส่วนของสารสกัด (เอทานอล:น้ำ) ต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบมะยม โดยคำนวณความแปรปรวนโดยมีค่าเฉลี่ย (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ Tukey's Multiple Range Tests โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (SPSS for windows version 11.5: SPSS Inc.)

การทดลองที่ 2 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในเนื้อสุกรบด โดยการเติมเชื้อก่อโรค *S. aureus* และ *S.* Typhimurium โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (SPSS for windows version 11.5: SPSS Inc.)

การทดลองที่ 3 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพด้านจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (SPSS for windows version 11.5: SPSS Inc.)

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาสัดส่วนของสารสกัด (เอทานอล: น้ำ) ต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบมะยม

4.1.1 ศึกษาสัดส่วนของสารสกัด (เอทานอล: น้ำ) ที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาหาสัดส่วนของสารสกัด (เอทานอล:น้ำ) ที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบมะยม การศึกษาประสิทธิภาพของการใช้สารสกัดเอทานอลต่อน้ำ ในอัตราส่วนผสมที่แตกต่างกัน (0%, 25%, 50%, 75% และ 100%) ที่มีผลต่อปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้ ปริมาณสารฟีโนลิคทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ผลจากการทดลองพบว่า น้ำบริสุทธิ์สามารถสกัดสารสกัดหยาบจากใบมะยม ได้ปริมาณสารสกัดหยาบสูงสุด โดยปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้จะลดลงตามสัดส่วนของเอทานอลที่เพิ่มขึ้น ปริมาณสารสกัดหยาบจากใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำบริสุทธิ์ได้ 2.80 กรัมต่อ 100 กรัมใบแห้งในขณะที่สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ได้ 0.53 กรัมต่อ 100 กรัมใบ ปริมาณสารฟีโนลิคทั้งหมดจากการสกัดใบมะยมและผลมะนาวโห่ ค่าอยู่ในช่วง 48.04 ถึง 49.87 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิคต่อสารสกัดหยาบ 1 กรัม และ 15.87 ถึง 20.44 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิคต่อสารสกัดหยาบ 1 กรัม ตามลำดับ ส่วนปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากการสกัดใบมะยมและผลมะนาวโห่ อยู่ในช่วง 0.51 ถึง 0.70 มิลลิกรัมสมมูลย์เคอร์ซิตินต่อสารสกัดหยาบ 1 กรัม และ 0.11 ถึง 0.17 มิลลิกรัมสมมูลย์เคอร์ซิตินต่อสารสกัดหยาบ 1 กรัม ตามลำดับ ยังพบว่าการต้านอนุมูลอิสระมีค่าสูงสุดจากการสกัดด้วยเอทานอล ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2

ตารางที่ 4.1 สัดส่วนของสารสกัด (เอทานอล : น้ำ) ที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ ต่อปริมาณปริมาณสารกัดหยาบ ปริมาณสารฟีโนลิคทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

Solvent (% ethanol)	Crude yield (g/100 g DW)	TPC (mg GAE/g crude)	TFC (mg QE/g crude)
Water	2.80 ± 0.13 [a]	49.87 ± 0.23 [a]	0.70 ± 0.04 [a]
25%	1.93 ± 0.14 [b]	49.82 ± 0.10 [a]	0.66 ± 0.03 [ab]
50%	1.77 ± 0.05 [bc]	49.46 ± 0.17 [ab]	0.52 ± 0.11 [b]
75%	1.59 ± 0.15 c	48.54 ± 0.13 [bc]	0.50 ± 0.01 [b]
100%	0.53 ± 0.07 [d]	48.04 ± 0.92 [c]	0.51 ± 0.05 [b]

GAE = สารมาตรฐานกรดแกลลิค

QE = สารมาตรฐานเควอซิทิน

[a-c] ตัวอักษรตามแนวตั้งที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.2 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสารสกัดจากใบมะยม โดยการสกัดด้วยสัดส่วนสารที่ใช้สกัด (เอทานอลต่อน้ำ) แตกต่างกัน

	IC_{50} (mg/l)			
Solvents (% ethanol)	Lipid peroxidation	Reducing power	DPPH	Metal chelating
Water	716.32 ± 0.95 [d]	932.25 ± 0.16 [e]	88.68 ± 0.04 [c]	1311.17 ± 0.70 [e]
25%	885.56 ± 0.68 [c]	988.21 ± 0.06 [d]	89.03 ± 0.87 [c]	2512.29 ± 0.31 [d]
50%	983.20 ± 0.91 [b]	1084.95 ± 0.87 [c]	92.47 ± 0.59 [b]	3677.13 ± 0.02 [c]
75%	1004.87 ± 0.25 [a]	1288.50 ± 0.16 [b]	94.66 ± 0.61 [a]	4599.27 ± 0.17 [b]
100%	1006.15 ± 0.22 [a]	1462.27 ± 0.03 [a]	95.32 ± 1.22 [a]	6442.60 ± 0.53 [a]

[a-e] ตัวอักษรตามแนวตั้งที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.1.2 ศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบมะยม ที่สกัดด้วยสัดส่วนสารที่ใช้สกัดแตกต่างกัน

(1) ศึกษาคุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์

จากการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่มักพบในอาหาร โดยทดสอบทั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากใบ

มะยมไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทั้งหมดจำนวน 11 ชนิด ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Escherichia coli* TISTR 780, *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321, *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14947^{T} , *Lactobacillus sakei* TISTR 890, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR 942, *Streptococcus* sp. TISTR 1030, *Lactococcus cremoris* TISTR 1344 และ *Bacillus coagulans* TISTR 1447 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย

Cultures	Inhibition zone (% ethanol)				
	Water	25%	50%	75%	100%
Pathogenic bacteria					
Salmonella Typhimurium TISTR 292	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus TISTR 118	-	-	-	-	-
Escherichia coli TISTR 780	-	-	-	-	-
Aeromonas hydrophila TISTR 1321	-	-	-	-	-
Spoilage bacteria	-	-	-	-	-
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	-	-	-	-	-
Lactobacillus plantarum ATCC 14947^{T}	-	-	-	-	-
Lactobacillus sakei TISTR 890	-	-	-	-	-
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* TISTR 942	-	-	-	-	-
Streptococcus sp. TISTR 1030	-	-	-	-	-
Lactococcus cremoris TISTR 1344	-	-	-	-	-
Bacillus coagulans TISTR 1447	-	-	-	-	-

\- = No inhibition.

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Thailand.

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Md

(2) การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) ในหลอดทดลอง (*In vitro*) ของสารสกัดน้ำจากใบมะยมและผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

1. ผลของสารสกัดน้ำจากใบมะยมและผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ปกติจากปอด WI-38 (ATCC® CCL-75™)

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดน้ำจากพืชทั้งสองชนิดไม่มีผลต่อการทำลายเซลล์ปกติจากปอด โดยเซลล์มีชีวิตรอดภายหลังการสัมผัสสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่มีค่า IC50 เฉลี่ย 940 ส่วนค่า IC50 ของเซลล์ที่สัมผัสสารสกัดจากใบมะยมมีค่าเฉลี่ยมากกว่า 1000

2. ผลของสารสกัดน้ำจากใบมะยมและผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ปกติจากปอด WI-38 (ATCC® CCL-75™)

จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดน้ำจากพืชทั้งสองชนิดไม่มีผลต่อการทำลายเซลล์มะเร็งจากลำไส้ โดยค่า IC50 การมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าเฉลี่ยมากกว่า 1000 ผลการทดลอง

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถให้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับความปลอดภัยหากนำสารที่ทดสอบมาใช้ในคน ซึ่งการตรวจสอบมีหลายวิธี เช่น Lactate dehydrogenase (LDH), Neutral red (NR), Trypan Blue, Tryphan Blue (TB) และ Methyl tetrazolium 3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay เป็นต้น MTT assay เป็นวิธีการตรวจอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองจากความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ Dehydrogenase และ cofactor ในไมโตรคอนเดรียที่จะรีดิวซ์สาร 3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) ที่มีสีเหลืองให้กลายเป็นผลึกฟอร์มาซาน (Formazan) ที่มีสีม่วงได้ ดังนั้นจึงใช้ผลึกฟอร์มาซานแสดงถึงความมีชีวิตของเซลล์ โดยเซลล์ที่ตายจะมีลักษณะใสไม่มีสี ส่วนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะมีผลึกสีม่วงเกิดขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งเมื่อนำมาทำละลายในตัวทำละลายเช่น DMSO จะได้สารละลายสีม่วงน้ำเงินที่สามารถวัดว่าการดูดกลืนแสงได้ด้วยเครื่อง Spectrophotometer นำมาคำนวนเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งนิยมรายงานความเป็นพิษของสารจากระดับความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายที่ร้อยละ 50 (สุพัตรา โพธิ์เอี่ยมและคณะ. 2555)

4.1.3 ศึกษาการใช้สารสกัดจากใบมะยมในเนื้อสุกรบดที่เก็บอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ-20 องศาเซลเซียส

4.1.3.1 ศึกษาการใช้สารสกัดจากใบมะยมในเนื้อสุกรบด 4 องศาเซลเซียส ด้านกายภาพ

(1) ผลของค่าสีของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในเนื้อสุกรบดที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์คุณภาพด้านสีในเนื้อสุกรบดศึกษาเฉพาะเนื้อสุกรบดที่เก็บ 4 องศาเซลเซียส โดยมีกลุ่มการทดลองดังนี้ กลุ่มควบคุม (ไม่เติมสารสกัด) กลุ่มที่เติม BHT 0.2 g กลุ่มที่เติมสารสกัดจากใบมะยม 2.5 และ 5 g พบว่าค่าความสว่าง (lightness, L*) ของเนื้อสุกรบด มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 51.10, 51.87, 51.55 และ 50.99 ตามลำดับ และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 วัน พบว่าค่าความสว่างของกลุ่มควบคุม (ไม่เติมสารสกัด) มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) โดยกลุ่มที่เติม BHT 0.2 g และกลุ่มที่เติมสารสกัดจากใบมะยม 2.5 และ 0.5 g มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

ส่วนค่าสีแดง (redness, a*) พบว่าเนื้อสุกรบดของทุกกลุ่มการทดลองมีค่าสีแดงไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 5.95, 6.08, 5.98 และ 6.02 ตามลำดับ และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 วัน พบว่าค่าสีแดงของกลุ่มควบคุม (ไม่เติมสารสกัด) กลุ่มที่เติม BHT 0.2 g กลุ่มที่เติมสารสกัดจากใบมะยม 2.5 g มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อการเก็บรักษานานขึ้น แต่กลุ่มที่เติมสารสกัดจากใบมะยม 5 g มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

ส่วนค่าสีเหลือง (Yellowness, b*) พบว่าเนื้อสุกรบดของทุกกลุ่มการทดลองมีค่าสีเหลืองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 14.15, 14.18, 14.22 และ 14.09 ตามลำดับ และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 วัน พบว่าค่าสีเหลืองของทุกกลุ่มการทดลอง มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.4

จากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rojas and Brewer (2007) การใช้สารสกัดเมล็ดองุ่นความเข้มข้น 0.02 g ในเนื้อวัวและเนื้อหมู พบว่าไม่มีความแตกต่างในค่าสีแดงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เติมสารสกัดหลังจากเก็บรักษานาน 8 วัน

ตารางที่ 4.4 ผลของค่าสีของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในสุกรบดเมื่อเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

Parameter	Storage time (days)	Color values			
		Control	0.2 g BHT/kg	2.5 g PWCE/kg	5 g PWCE/kg
Lightness (L*)	0	$51.10 \pm 0.88^{a,D}$	$51.87 \pm 0.27^{a,AB}$	$51.55 \pm 0.58^{a,B}$	$50.99 \pm 0.42^{a,A}$
	2	$51.92 \pm 0.37^{a,CD}$	$50.83 \pm 0.32^{a,B}$	$50.61 \pm 1.01^{a,B}$	$51.54 \pm 0.03^{a,A}$
	4	$53.19 \pm 0.27^{a,BC}$	$51.82 \pm 0.62^{ab,AB}$	$50.12 \pm 0.32^{ab,B}$	$51.03 \pm 1.38^{b,A}$
	6	$54.19 \pm 0.12^{a,AB}$	$52.17 \pm 0.72^{ab,AB}$	$51.57 \pm 0.19^{b,B}$	$50.95 \pm 1.38^{b,A}$
	8	$55.34 \pm 0.44^{a,A}$	$53.70 \pm 0.64^{b,A}$	$53.40 \pm 0.19^{b,A}$	$52.34 \pm 0.42^{b,A}$
Redness (a*)	0	$5.95 \pm 0.32^{a,A}$	$6.08 \pm 0.02^{a,A}$	$5.98 \pm 0.26^{a,A}$	$6.02 \pm 0.16^{a,A}$
	2	$4.57 \pm 0.15^{b,B}$	$5.81 \pm 0.32^{a,A}$	$5.31 \pm 0.26^{ab,AB}$	$5.45 \pm 0.84^{a,A}$
	4	$4.24 \pm 0.17^{a,B}$	$5.02 \pm 0.36^{a,B}$	$5.28 \pm 1.30^{a,ABC}$	$5.48 \pm 0.99^{a,A}$
	6	$3.28 \pm 0.04^{c,C}$	$4.56 \pm 0.16^{b,B}$	$4.16 \pm 0.07^{a,BC}$	$4.69 \pm 0.09^{a,AB}$
	8	$2.54 \pm 0.13^{c,D}$	$3.46 \pm 0.09^{b,C}$	$3.60 \pm 0.38^{ab,C}$	$4.06 \pm 0.16^{a,AB}$
Yellowness (b*)	0	$14.15 \pm 0.38^{a,B}$	$14.18 \pm 0.37^{a,B}$	$14.22 \pm 0.08^{a,AB}$	$14.09 \pm 0.87^{a,B}$
	2	$14.68 \pm 0.46^{a,B}$	$14.45 \pm 0.57^{a,AB}$	$14.47 \pm 0.84^{a,AB}$	$14.81 \pm 0.76^{a,AB}$
	4	$14.23 \pm 0.59^{a,B}$	$15.01 \pm 0.12^{a,AB}$	$15.31 \pm 1.38^{a,AB}$	$15.49 \pm 0.00^{a,AB}$
	6	$16.12 \pm 0.56^{a,A}$	$15.00 \pm 0.53^{a,AB}$	$15.39 \pm 0.48^{a,AB}$	$15.50 \pm 0.09^{a,AB}$
	8	$16.95 \pm 0.51^{a,A}$	$15.26 \pm 0.30^{b,A}$	$15.73 \pm 0.34^{b,A}$	$15.90 \pm 0.50^{b,A}$

$^{a-d}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

$^{A-C}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

(2) ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในเนื้อสุกรบดต่อที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเนื้อสุกรบดศึกษาเฉพาะเนื้อสุกรบดที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส โดยมีกลุ่มการทดลองดังนี้ กลุ่มควบคุม (ไม่เติมสารสกัด) กลุ่มที่เติม BHT 0.2 g กลุ่มที่เติมสารสกัดจากใบมะยม 2.5 และ 5 g พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเนื้อสุกรบดของทุกกลุ่ม มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 12 วัน พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเนื้อสุกรบดของทุกกลุ่ม มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในสุกรบดต่ออายุการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

Storage time	pH values[NS]			
(days)	Control	0.2 g BHT/kg	2.5 g PWCE/kg	5 g PWCE/kg
0	5.85 ± 0.42	5.89 ± 0.76	5.58 ± 0.44	5.84 ± 0.16
2	6.06 ± 0.71	5.99 ± 0.82	6.03 ± 0.75	5.99 ± 0.77
4	6.06 ± 0.82	6.09 ± 1.06	6.08 ± 0.95	6.06 ± 0.73
6	6.09 ± 0.12	6.11 ± 1.02	6.11 ± 0.32	6.07 ± 0.83
8	6.25 ± 0.79	6.18 ± 0.77	6.12 ± 0.02	6.11 ± 0.81

[NS] มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

4.1.3.2 ศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในเนื้อสุกรบดที่เก็บรักษา 4 และ -20 องศาเซลเซียสภายหลังการเติมสารสกัดจากใบมะยม

(1) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging Activity)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในเนื้อสุกรบดที่ยังไม่สุกและภายหลังการทำให้สุกที่เก็บในอุณหภูมิ 4 และ-20 องศาเซลเซียส ให้ผลในทำนองเดียวกันโดยพบว่า ค่า DPPH ในเนื้อสุกรบดที่ยังไม่สุก กลุ่มที่เติมสารสกัดน้ำจากใบมะยม มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม (ไม่เติมสารสกัด) และพบว่า กลุ่มที่เติมสารสกัด 5g/kg เนื้อมีค่า DPPH สูงสุด ในทำนองเดียวกัน ในเนื้อปรุงสุกพบว่า ค่า DPPH ในเนื้อบดที่เติมสารสกัดสูงกว่ากลุ่มควบคุมและมีค่าสูงสุดในกลุ่มที่เติมสารสกัดความเข้มข้น 5 g/kg ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และ 4.7 การศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Huang *et al.* (2011) ซึ่งทำการศึกษาการเติมสารต้านอนุมูลอิสระในเนื้อสัตว์ พบว่า ตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระจะเกิดการออกซิเดชันทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ซึ่งผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ากลไกการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH เกิดจากการรับอิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH ของสารจำพวกฟีนอล ซึ่งจะได้เป็นสาร DPPH ที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระอีกต่อไป ทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระหยุดลง (บุหรัน พันธุ์สวรรค์. 2556) ค่าการกำจัดอนุมูลอิสระ (DPPH) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้วิเคราะห์ค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ เป็นค่าที่บอกถึงศักยภาพของสารต้านอนุมูลอิสระ (วิไลพร ปองเพียร. 2550)

ตารางที่ 4.6 ผลของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในเนื้อสุกรบดต่ออายุการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการทำให้สุกและภายหลังการทำให้สุก โดยศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity

Storage time		% Inhibition of DPPH radical scavenging activity			
(days)		Control	0.2 g BHT/kg	2.5 g PWCE/kg	5 g PWCE/kg
Before cooking	0	20.31 ± 0.59 ^{d,AB}	29.20 ± 0.92 ^{c,A}	58.56 ± 0.78 ^{b,A}	74.66 ± 0.71 ^{a,A}
	2	21.56 ± 0.94 ^{d,A}	28.08 ± 0.95 ^{c,A}	57.02 ± 0.87 ^{b,AB}	73.94 ± 0.40 ^{a,AB}
	4	19.78 ± 0.58 ^{d,B}	29.53 ± 0.72 ^{c,A}	56.99 ± 0.96 ^{b,AB}	72.74 ± 0.11 ^{a,B}
	6	20.50 ± 0.57 ^{d,AB}	28.08 ± 0.64 ^{c,A}	56.74 ± 0.07 ^{b,AB}	72.94 ± 0.65 ^{a,B}
	8	19.41 ± 0.48 ^{d,B}	29.23 ± 0.77 ^{c,A}	55.77 ± 0.63 ^{b,B}	72.70 ± 0.51 ^{a,B}
After cooking	0	22.86 ± 0.76 ^{d,A}	35.92 ± 0.99 ^{c,A}	62.35 ± 0.63 ^{b,A}	79.60 ± 0.79 ^{a,A}
	2	22.37 ± 0.94 ^{d,A}	36.54 ± 0.65 ^{c,A}	61.67 ± 0.80 ^{b,B}	79.41 ± 0.79 ^{a,A}
	4	22.25 ± 0.98 ^{d,A}	36.74 ± 0.64 ^{c,A}	62.57 ± 0.67 ^{b,AB}	78.40 ± 0.38 ^{a,AB}
	6	21.61 ± 0.62 ^{d,AB}	35.54 ± 0.55 ^{c,A}	64.32 ± 0.52 ^{b,A}	78.23 ± 0.49 ^{a,AB}
	8	19.93 ± 0.41 ^{d,B}	36.42 ± 0.65 ^{c,A}	60.85 ± 0.89 ^{b,B}	77.40 ± 0.60 ^{a,B}

$^{a-d}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

$^{A-B}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.7 ผลของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในหมูบดต่ออายุการเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการทำให้สุกและภายหลังการทำให้สุก โดยศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity

Storage time		% Inhibition of DPPH radical scavenging activity			
(weeks)		Control	0.2 g BHT/kg	2.5 g PWCE/kg	5 g PWCE/kg
Before cooking	0	$16.33 \pm 0.15^{d,B}$	$27.20 \pm 0.19^{c,A}$	$57.56 \pm 0.08^{b,A}$	$71.66 \pm 0.01^{a,A}$
	4	$16.99 \pm 0.24^{d,A}$	$27.70 \pm 0.43^{c,A}$	$57.66 \pm 0.77^{b,A}$	$71.26 \pm 0.22^{a,A}$
	8	$17.05 \pm 0.11^{d,A}$	$26.71 \pm 0.22^{c,A}$	$56.35 \pm 0.42^{b,A}$	$70.32 \pm 0.13^{a,AB}$
	12	$16.67 \pm 0.02^{d,AB}$	$26.52 \pm 0.22^{c,A}$	$56.06 \pm 0.84^{b,A}$	$69.11 \pm 0.91^{a,B}$
After cooking	0	$22.16 \pm 0.06^{d,A}$	$38.72 \pm 0.09^{c,A}$	$61.15 \pm 0.03^{b,A}$	$78.20 \pm 0.08^{a,A}$
	4	$22.16 \pm 0.15^{d,A}$	$38.02 \pm 0.11^{c,AB}$	$61.25 \pm 0.13^{b,A}$	$78.22 \pm 0.11^{a,A}$
	8	$22.00 \pm 0.22^{d,A}$	$37.12 \pm 0.72^{c,B}$	$60.45 \pm 0.13^{b,B}$	$77.23 \pm 0.11^{a,B}$
	12	$21.06 \pm 0.41^{d,B}$	$37.21 \pm 0.03^{c,B}$	$60.05 \pm 0.23^{b,C}$	$77.37 \pm 0.13^{a,B}$

$^{a-d}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

$^{A-B}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

(2) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระฟอกสีเอบีทีเอช (ABTS radical cation decolorization)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระฟอกสี ABTS ในเนื้อสุกรบดที่ยังไม่สุกและภายหลังการทำให้สุกเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ-20 องศาเซลเซียส ให้ผลในทำนองเดียวกัน พบว่า ค่า ABTS ในเนื้อสุกรบดที่ยังไม่สุก กลุ่มที่เติมน้ำสารสกัดจากใบมะยมให้ค่า ABTS สูงกว่ากลุ่มควบคุม (ไม่เติมสารสกัด) และพบว่ากลุ่มที่ทำการเติมสารสกัด 5 g/kg ให้ค่า ABTS สูงสุด จากนั้นเมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้กับเนื้อสุกรบดภายหลังจากการทำให้สุกพบว่า เนื้อสุกรบดในกลุ่มที่เติมสารสกัดให้ค่า ABTS ในปริมาณที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมและให้ค่าสูงสุดในกลุ่มที่เติมสารสกัด 5g/kg ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และ 4.9 ในขณะที่การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS สามารถใช้กับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายทั้งในน้ำและไขมันได้ (Re *et al.* 1999) โดยการต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างที่ทำการศึกษาแต่ละชนิด (Chumyam *et al.* 2013; Fernandes *et al.* 2012) ซึ่ง Re *et al.* (1999) กล่าวว่าการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS เป็นวิธีใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระโดย ABTS จะถูกเปลี่ยนเป็นไอออนบวก radical ด้วยการเติมโซเดียมเพอร์ซัลเฟตและเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำเงิน

ตารางที่ 4.8 ผลของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในเนื้อสุกรบดต่ออายุการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการทำให้สุกและภายหลังการทำให้สุก โดยศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระฟอกสี ABTS radical cation decolorization

Storage time		% Inhibition of ABTS radical cation decolorization			
(days)		Control	0.2 g BHT/kg	2.5 g PWCE/kg	5 g PWCE/kg
Before cooking	0	37.75 ± 0.15 ^{d,A}	66.85 ± 0.03 ^{c,A}	69.14 ± 0.05 ^{b,A}	82.71 ± 0.15 ^{a,A}
	2	36.50 ± 0.08 ^{d,B}	66.34 ± 0.08 ^{c,A}	69.10 ± 0.08 ^{b,A}	82.69 ± 0.02 ^{a,A}
	4	36.96 ± 0.02 ^{d,B}	65.15 ± 0.14 ^{c,A}	67.82 ± 0.11 ^{b,AB}	82.32 ± 0.01 ^{a,AB}
	6	36.22 ± 0.03 ^{d,B}	65.14 ± 0.08 ^{c,AB}	66.65 ± 0.26 ^{b,B}	81.55 ± 0.21 ^{a,AB}
	8	36.39 ± 0.01 ^{d,B}	63.79 ± 0.12 ^{c,B}	66.80 ± 0.12 ^{b,B}	81.22 ± 0.11 ^{a,B}
After cooking	0	40.77 ± 0.22 ^{d,A}	68.44 ± 0.01 ^{c,A}	71.52 ± 0.19 ^{b,A}	85.39 ± 0.36 ^{a,A}
	2	40.82 ± 0.08 ^{d,A}	68.38 ± 0.03 ^{c,A}	71.30 ± 0.01 ^{b,A}	85.24 ± 0.14 ^{a,A}
	4	40.03 ± 0.01 ^{d,A}	67.35 ± 0.36 ^{c,B}	70.52 ± 0.39 ^{b,B}	85.19 ± 0.28 ^{a,A}
	6	40.22 ± 0.02 ^{d,A}	67.25 ± 0.04 ^{c,B}	70.24 ± 0.15 ^{b,B}	84.72 ± 0.17 ^{a,AB}
	8	38.55 ± 0.02 ^{d,B}	66.18 ± 0.11 ^{c,C}	70.17 ± 0.06 ^{b,B}	83.86 ± 0.02 ^{a,B}

$^{a-d}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

$^{A-B}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.9 ผลของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในเนื้อสุกรบดต่ออายุการเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการทำให้สุกและภายหลังการทำให้สุก โดยศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระฟอกสี ABTS radical cation decolorization

Storage time		% Inhibition of ABTS radical cation decolorization			
(weeks)		Control	0.2 g BHT/kg	2.5 g PWCE/kg	5 g PWCE/kg
Before cooking	0	36.75 ± 0.07 ^{d,A}	59.44 ± 0.02 ^{c,A}	68.24 ± 0.01 ^{b,A}	85.39 ± 0.36 ^{a,A}
	4	36.25 ± 0.22 ^{d,A}	58.84 ± 0.23 ^{c,B}	68.04 ± 0.25 ^{b,AB}	85.92 ± 0.16 ^{a,A}
	8	36.25 ± 0.41 ^{d,A}	58.94 ± 0.27 ^{c,B}	67.24 ± 0.17 ^{b,C}	84.55 ± 0.05 ^{a,B}
	12	35.01 ± 0.22 ^{d,B}	58.99 ± 0.11 ^{c,B}	67.74 ± 0.02 ^{b,B}	84.11 ± 0.31 ^{a,B}
After cooking	0	38.58 ± 0.12 ^{d,A}	65.13 ± 0.01 ^{c,B}	73.52 ± 0.18 ^{b,A}	88.41 ± 0.01 ^{a,A}
	4	38.77 ± 0.02 ^{d,A}	65.65 ± 0.21 ^{c,A}	72.09 ± 0.05 ^{b,B}	87.08 ± 0.21 ^{a,B}
	8	37.97 ± 0.16 ^{d,B}	64.77 ± 0.16 ^{c,B}	71.72 ± 0.41 ^{b,B}	87.20 ± 0.35 ^{a,B}
	12	38.02 ± 0.09 ^{d,B}	64.05 ± 0.08 ^{c,C}	71.92 ± 0.73 ^{b,B}	87.09 ± 0.11 ^{a,B}

$^{a-d}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

$^{A-B}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

(3) การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์สาร (Reducing power)

จากการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์สารในตัวอย่างเนื้อสุกรบดที่ยังไม่สุกและภายหลังการทำให้สุกที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส พบว่าค่าการรีดิวซ์สารของตัวอย่างในกลุ่มที่เติมสารสกัดน้ำจากใบมะยม 2.5 และ 5 g , กลุ่มควบคุม (ไม่เติมสารสกัด) และกลุ่มที่เติมสารสังเคราะห์ (BHT 0.2 g) มีค่าอยู่ในช่วง 0.32-0.87 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.10 และ 4.11 ซึ่งในตัวอย่างที่มีการเติมสารสกัดน้ำจากใบมะยมให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงกว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่เติมสารสกัด เนื่องจากใบมะยมมีสารประกอบโพลีฟีนอลิกในปริมาณที่สูงซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (Kim *et al.* 2013) และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์สารซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับเปอร์ออกไซด์และป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระโดยการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นบางชนิดซึ่งความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์สารเป็นการให้อิเล็กตรอนแก่สารอนุมูลอิสระเปลี่ยนเป็นสารที่คงตัวโดยวัดปฏิกิริยารีดักชั่นของ $Fe^{3+}(CN)_6$ ไปเป็น $Fe^{2+}(CN\text{-})_6$ ถ้าหากสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มขึ้นจะแสดงถึงความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นที่ดี (พรพิมล กิจวิชา. 2558)

ตารางที่ 4.10 ผลของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในเนื้อสุกรต่ออายุการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการทำให้สุกและหลังทำให้สุก โดยศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระความสามารถในการรีดิวซ์สาร

Storage time		Absorbance at 700 nm[NS]			
(days)		Control	0.2 g BHT/kg	2.5 g PWCE/kg	5 g PWCE/kg
Before cooking	0	0.38 ± 0.36	0.45 ± 0.21	0.59 ± 0.11	0.75 ± 0.10
	2	0.36 ± 0.40	0.44 ± 0.18	0.58 ± 0.22	0.77 ± 0.03
	4	0.35 ± 0.22	0.43 ± 0.10	0.54 ± 0.16	0.72 ± 0.03
	6	0.30 ± 0.08	0.38 ± 0.09	0.55 ± 0.05	0.70 ± 0.05
	8	0.32 ± 0.15	0.32 ± 0.05	0.55 ± 0.05	0.68 ± 0.12
After cooking	0	0.44 ± 0.30	0.61 ± 0.02	0.76 ± 0.10	0.87 ± 0.23
	2	0.38 ± 0.11	0.60 ± 0.25	0.70 ± 0.10	0.80 ± 0.10
	4	0.38 ± 0.20	0.57 ± 0.23	0.67 ± 0.33	0.75 ± 0.05
	6	0.38 ± 0.36	0.45 ± 0.21	0.59 ± 0.11	0.75 ± 0.10
	8	0.36 ± 0.40	0.44 ± 0.18	0.58 ± 0.22	0.77 ± 0.03

[NS] มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.11 ผลของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในหมูบดต่ออายุการเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการทำให้สุกและหลังทำให้สุก โดยศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระความสามารถในการรีดิวซ์สาร

Storage time		Absorbance at 700 nm^{NS}			
(weeks)		Control	0.2 g BHT/kg	2.5 g PWCE/kg	5 g PWCE/kg
Before cooking	0	0.32 ± 0.17	0.47 ± 0.12	0.57 ± 0.04	0.77 ± 0.36
	4	0.30 ± 0.45	0.46 ± 0.38	0.55 ± 1.07	0.77 ± 0.22
	8	0.27 ± 0.40	0.44 ± 0.58	0.55 ± 0.23	0.72 ± 0.22
	12	0.25 ± 0.22	0.38 ± 0.22	0.48 ± 0.11	0.65 ± 1.12
After cooking	0	0.42 ± 0.09	0.60 ± 0.31	0.72 ± 0.17	0.84 ± 0.32
	4	0.44 ± 1.12	0.62 ± 0.22	0.70 ± 0.11	0.83 ± 0.22
	8	0.40 ± 0.22	0.58 ± 0.18	0.65 ± 0.28	0.80 ± 1.18
	12	0.32 ± 0.77	0.47 ± 0.82	0.57 ± 0.04	0.77 ± 0.36

^{NS} มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

(4) ค่าการออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์ (Lipid oxidation) โดยวิธี 2-Thiobar bituric Acid Reactive Substance (TBAR)

จากการทดสอบค่าการออกซิเดชันของไขมันในตัวอย่างเนื้อสุกรบดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระหว่างวันที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 ระหว่างก่อนทำให้สุกและภายหลังการทำให้สุก พบว่า ค่าการออกซิเดชันของไขมันในเนื้อสุกรบดภายหลังการทำให้สุกมีค่าที่สูงขึ้นในทุกกลุ่มการทดลองซึ่งเป็นผลมาจากการให้ความร้อนซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในขณะที่กลุ่มควบคุม (ไม่เติมสารสกัด) ภายหลังการทำให้สุกมีค่าสูงกว่าทุกกลุ่มการทดลองคือ 13.03-15.21 และในกลุ่มที่เติมสารสกัดจากใบมะยม 5 g มีค่าที่ต่ำสุดคือ 2.91-3.01 แสดงให้เห็นค่าที่ต่ำทำให้เกิดการออกซิเดชันของไขมันได้ดี ดังแสดงในตารางที่ 4.12

จากการทดสอบค่าการออกซิเดชันของไขมันในตัวอย่างเนื้อสุกรบดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ระหว่างวันที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 ระหว่างก่อนทำให้สุกและภายหลังการทำให้สุกในระหว่างการเก็บรักษาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในขณะที่กลุ่มที่เติมสารสกัดจากใบมะยม 5 g มีค่าการออกซิเดชันของไขมันระหว่าง 2.78-4.33 ทั้งก่อนทำให้สุกและภายหลังการทำให้สุก ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.13 โดยการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ (Coutinho de Oliveira *et al.* 2012; Hernandez-Hernandez *et al.* 2009) พบว่า โอลิโกเมอร์ โปรไซยานิดินส์ (oligomer

procyanidins) เช่น คาเทชิน (catechin) และ เอพิคาเทชิน (epicatechin) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงซึ่งพบในสารสกัดจากพืช สามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมันในน้ำมันดิบได้ โดยการศึกษาของ Carpenter *et al.* (2007) ทำการศึกษาสารสกัดจากพืชที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าการให้ความร้อนเป็นการลดปริมาณเฟอร์ริกไอออน (FRC) และในทางกลับกันเป็นการเพิ่มปริมาณธาตุเหล็กแบบ non heme ในเนื้อสัตว์ส่งผลให้ปริมาณเฟอร์ริกไอออนในเนื้อสุกรภายหลังการทำให้สุกมีค่าลดลง เมื่อเทียบกับตัวอย่างเนื้อสุกรก่อนทำให้สุก นอกจากนี้ Min *et al.* (2008) รายงานว่าการให้ความร้อนในปริมาณที่คงที่ อาจทำให้เกิดเฟอร์รัสไอออน ซึ่งส่งผลต่อการเกิดมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde) ในเนื้อสุกรภายหลังการทำให้สุกในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งการเกิดการออกซิเดชันของไขมันในเนื้อ ในระหว่างการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันจะมีสาร malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากแตกตัวของกรดไขมันที่มีพันธะคู่ 3 พันธะหรือมากกว่านั้นเกิดขึ้นโดยปกติ MDA จะถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญชนิดหนึ่งของการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Shahidi *et al.* 1991)

ตารางที่ 4.12 ผลของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในหมูบดต่ออายุการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการ ทำให้สุกและภายหลังการทำให้สุก โดยศึกษาการออกซิเดชันของไขมันโดยวิธี 2- Thiobar bituric Acid Reactive Substance (TBARS)

Storage time		Total MDA (mg/kg meat)			
(days)		Control	0.2 g BHT/kg	2.5 g PWCE/kg	5 g PWCE/kg
Before cooking	0	$2.99 \pm 0.94^{a,B}$	$2.13 \pm 0.08^{a,B}$	$3.69 \pm 0.94^{a,A}$	$2.78 \pm 0.44^{a,A}$
	2	$3.21 \pm 0.14^{bc,AB}$	$2.55 \pm 0.37^{c,B}$	$4.74 \pm 0.88^{a,A}$	$4.03 \pm 0.30^{ab,A}$
	4	$3.28 \pm 0.35^{bc,AB}$	$2.65 \pm 0.22^{c,B}$	$4.85 \pm 0.46^{a,A}$	$4.25 \pm 0.67^{ab,A}$
	6	$4.08 \pm 0.18^{ab,AB}$	$2.74 \pm 0.17^{b,AB}$	$4.72 \pm 0.36^{a,A}$	$4.27 \pm 0.77^{a,A}$
	8	$4.56 \pm 0.34^{a,A}$	$3.35 \pm 0.24^{b,A}$	$4.83 \pm 0.13^{a,A}$	$4.33 \pm 0.61^{a,A}$
After cooking	0	$13.03 \pm 0.39^{a,C}$	$6.69 \pm 0.13^{b,B}$	$4.61 \pm 0.14^{c,B}$	$2.95 \pm 0.14^{d,A}$
	2	$13.34 \pm 0.34^{a,BC}$	$7.20 \pm 0.45^{b,B}$	$5.09 \pm 0.26^{c,B}$	$3.01 \pm 0.22^{d,A}$
	4	$14.47 \pm 0.59^{a,AB}$	$7.37 \pm 0.41^{b,B}$	$5.01 \pm 0.20^{c,AB}$	$2.91 \pm 0.45^{d,A}$
	6	$15.06 \pm 0.47^{a,A}$	$7.80 \pm 0.23^{b,B}$	$5.08 \pm 0.12^{c,AB}$	$3.14 \pm 0.27^{d,A}$
	8	$15.21 \pm 0.66^{a,A}$	$8.22 \pm 0.09^{b,A}$	$5.68 \pm 0.39^{c,A}$	$3.30 \pm 0.23^{d,A}$

$^{a-d}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

$^{A-C}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.13 ผลของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในหมูบดต่ออายุการเก็บรักษาที่ –20 องศาเซลเซียส ก่อนการทำให้สุกและภายหลังการทำให้สุก โดยศึกษาการออกซิเดชันของไขมันโดยวิธี 2- Thiobar bituric Acid Reactive Substance (TBARS)

Storage time		Total MDA (mg/kg meat)			
(weeks)		Control	0.2 g BHT/kg	2.5 g PWCE/kg	5 g PWCE/kg
Before cooking	0	2.89 ± 0.17 $^{a, A,\dot{i}}$	2.71 ± 0.01 ^{a,A}	2.68 ± 0.24 $^{a, A}$	2.76 ± 0.44 ^{a,A}
	4	2.87 ± 0.04 $^{a, A}$	2.72 ± 0.04 $^{ab, A}$	2.68 ± 0.11 $^{b, A}$	2.77 ± 0.02 $^{ab, A}$
	8	2.95 ± 0.07 $^{a, A}$	2.74 ± 0.07 ^{b,A}	2.69 ± 0.07 $^{b, A}$	2.77 ± 0.08 ^{ab,A}
	12	2.97 ± 0.04 ^{a,A}	2.74 ± 0.09 ^{a,A}	2.70 ± 0.08 ^{a,A}	2.77 ± 0.18 ^{a,A}
After cooking	0	13.03 ± 0.39 ^{a,A}	6.69 ± 0.13 ^{b,A}	4.61 ± 0.14 ^{c,A}	2.95 ± 0.14 ^{d,A}
	4	13.08 ± 0.05 ^{a,A}	6.69 ± 0.51 ^{b,A}	4.62 ± 0.71 ^{c,A}	2.99 ± 0.73 ^{d,A}
	8	13.11 ± 0.09 ^{a,A}	6.71 ± 0.23 ^{b,A}	4.75 ± 0.12 ^{c,A}	3.01 ± 0.25 ^{d,A}
	12	13.15 ± 0.47 ^{a,A}	6.74 ± 0.73 ^{b,A}	4.79 ± 0.07 ^{c,A}	3.05 ± 0.14 ^{d,A}

$^{a-d}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

$^{\dot{i}}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.1.3.2 ศึกษาการใช้สารสกัดจากใบมะยมในเนื้อสุกรบดด้านคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส

โดยทดสอบ 7 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น เนื้อสัมผัส รสชาติ และลักษณะโดยรวม ประเมินโดยวิธี Consumer test และได้แนบตัวอย่างแบบประเมินความพึงพอใจต่อคุณภาพในเนื้อสุกรบด โดยใช้ผู้ทดสอบชิมซึ่งเป็นกลุ่มนักศึกษา อาจารย์ และผู้บริโภคทั่วไป โดยมีช่วงการให้คะแนนความพึงพอใจ 7 ระดับ (7-Point Hedonic Scale) ตั้งแต่ 1-7 ต่อไปนี้

1	หมายถึง	ไม่ชอบมากที่สุด
2	หมายถึง	ไม่ชอบมาก
3	หมายถึง	ไม่ชอบ
4	หมายถึง	เฉยๆ
5	หมายถึง	ชอบ
6	หมายถึง	ชอบมาก
7	หมายถึง	ชอบมากที่สุด

ผลของการประเมินด้านประสาทสัมผัสของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในเนื้อสุกรบด โดยมีกลุ่มการทดลองดังนี้ กลุ่มควบคุม (ไม่เติมสารสกัด) กลุ่มที่เติม BHT 0.2 g กลุ่มที่เติมสารสกัดจากใบมะยม 2.5 g และ 5 g ได้คะแนนความชอบในด้านลักษณะปรากฏเท่ากับ 6.20, 5.05, 6.00 และ 5.90 ตามลำดับ โดยกลุ่มที่เติม BHT 0.2 g มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ด้านสีได้คะแนนความชอบเท่ากับ 6.05, 5.60, 5.95 และ 6.00 ตามลำดับ มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ด้านกลิ่นรสได้คะแนนความชอบเท่ากับ 6.25, 6.25, 6.30 และ 6.25 ตามลำดับ มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ด้านเนื้อสัมผัสได้คะแนนความชอบเท่ากับ 6.00, 5.85, 5.95 และ 5.90 ตามลำดับ มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ด้านรสชาติได้คะแนนความชอบเท่ากับ 5.90, 4.40, 5.35 และ 5.55 ตามลำดับ โดยกลุ่มที่เติม BHT 0.2 g มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) และด้านลักษณะโดยรวมได้คะแนนความชอบเท่ากับ 6.51, 4.65, 5.65 และ 5.75 ตามลำดับ โดยกลุ่มที่เติม BHT 0.2 g มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.14 จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ahn *et al.* (2007) รายงานว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 2 g ไม่มีผลต่อลักษณะประสาทสัมผัสทางด้านสี กลิ่น และรสชาติ แต่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นมากกว่า 10 g มีผลต่อลักษณะทางด้านสีแดงคือ ได้รับคะแนนมากกว่ากลุ่มควบคุม

ตารางที่ 4.14 ผลของการประเมินด้านประสาทสัมผัสของสารสกัดใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำในเนื้อสุกรบด

Parameters	Control	0.2 g BHT/kg	2.5 g PWCE/kg	5 g PWCE/kg
Overall appearance	6.20 ± 0.70^{a}	5.05 ± 1.19^{b}	6.00 ± 0.92^{a}	5.90 ± 1.11^{a}
Color	6.05 ± 0.94^{a}	5.60 ± 0.82^{a}	5.95 ± 0.82^{a}	6.00 ± 0.79^{a}
Odor	6.25 ± 0.91^{a}	6.25 ± 1.02^{a}	6.30 ± 0.80^{a}	6.25 ± 0.72^{a}
Texture	6.00 ± 0.73^{a}	5.85 ± 0.99^{a}	5.95 ± 0.76^{a}	5.90 ± 0.85^{a}
Flavor	5.90 ± 1.17^{a}	4.40 ± 0.99^{b}	5.35 ± 1.39^{ab}	5.55 ± 1.32^{a}
Overall quality	6.15 ± 0.74^{a}	4.65 ± 1.31^{b}	5.65 ± 1.04^{a}	5.75 ± 0.91^{a}

$^{a-b}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.2 ศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดจากพืชและสารแบคเทอริโอซิน

4.2.1 ศึกษาการทำงานเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic testing) ของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ร่วมกับแบคเทอริโอซิน Nisin A ที่สร้างจากเชื้อ *Lactocoocus lactis* subsp. *lactis* Nisin A ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 และ *S.* Typhimurium TISTR 292 โดยวิธี Checker board broth

ค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย (Fractional inhibitory concentration index, FICI) และค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อทำลายแบคทีเรีย (Fractional bactericidal concentration index, FBCI) ของการใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่และแบคเทอริโอซิน Nisin A ร่วมกัน พบว่าการใช้สารทั้งสองชนิดร่วมกันมีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 โดยค่า FICI คือ 0.63 (3.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 80 AU/ml) และค่า FBCI คือ 0.63 (3.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 80 AU/ml) การใช้สารทั้งสองชนิดร่วมกันมีฤทธิ์เสริมกันบางส่วนในการยับยั้งเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 โดยค่า FICI 0.56 (25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 10 AU/ml) และมีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อ โดยค่า FBCI คือ 0.56 (25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 10 AU/ml) ดังแสดงในตารางที่ 4.15

4.2.2 ศึกษาการทำงานเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic testing) ของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 และ *S.* Typhimurium TISTR 292 โดยวิธี Checker board broth

ค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย (Fractional inhibitory concentration index, FICI) และค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อทำลายแบคทีเรีย (Fractional bactericidal concentration index, FBCI) ของการใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่และแบคเทอริโอซิน Nisin A ร่วมกัน พบว่าการใช้สารทั้งสองชนิดร่วมกันมีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 โดยค่า FICI คือ 0.56 (12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 40 AU/ml) และค่า FBCI คือ 0.56 (12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 40 AU/ml) การใช้สารทั้งสองชนิดร่วมกันมีฤทธิ์เสริมกันบางส่วนในการยับยั้งเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 โดยค่า FICI 0.37 (12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 80 AU/ml) และมีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อ โดยค่า FBCI คือ 0.37 (12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 80 AU/ml) ดังแสดงในตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.15 ค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย (FICI) และค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อทำลายแบคทีเรีย (FBCI) ของการใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ร่วมกับแบคเทอริโรซิน Nisin A

เชื้อทดสอบ	FICI[a]		FBCI[a]	
	ความเข้มข้นของสาร[b]	แปลผล[c]	ความเข้มข้นของสาร[b]	แปลผล[c]
Staphylococcus aureus TISTR 118	3.125 + 80	0.63	3.125 + 80	0.63
Salmonella Typhimurium TISTR 292	25 + 10	0.56	25 + 10	0.56

[a]FICI = fractional inhibitory concentration index ; FBCI = fractional bactericidal concentration index

[b] ความเข้มข้นของมะม่วงหาวมะนาวโห่ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ร่วมกับแบคเทอริโอซิน Nisin A (AU/ml)

[c] การแปลผลค่า FICI และ FBCI : - FICI หรือ FBCI < 0.5 คือ ออกฤทธิ์เสริมกัน

- FICI หรือ FBCI > 0.5 to 1.0 คือ ออกฤทธิ์เสริมกันบางส่วน
- FICI หรือ FBCI > 1.0 to <2.0 คือ ไม่ออกฤทธิ์เสริมกันหรือขัดขวางกัน
- FICI หรือ FBCI $\geq$ 2.0 คือ ออกฤทธิ์ขัดขวางกัน

ตารางที่ 4.16 ค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย (FICI) และค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อ ทำลายแบคทีเรีย (FBCI) ของการใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1

เชื้อทดสอบ	FICI[a]		FBCI[a]	
	ความเข้มข้นของสาร[b]	แปลผล[c]	ความเข้มข้นของสาร[b]	แปลผล[c]
Staphylococcus aureus TISTR 118	12.5 + 40	0.56	12.5 + 40	0.56
Salmonella Typhimurium TISTR 292	12.5 + 80	0.37	12.5 + 80	0.37

[a]FICI = fractional inhibitory concentration index ; FBCI = fractional bactericidal concentration index

[b] ความเข้มข้นของมะม่วงหาวมะนาวโห่ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 (AU/ml)

[c] การแปลผลค่า FICI และ FBCI : - FICI หรือ FBCI < 0.5 คือ ออกฤทธิ์เสริมกัน

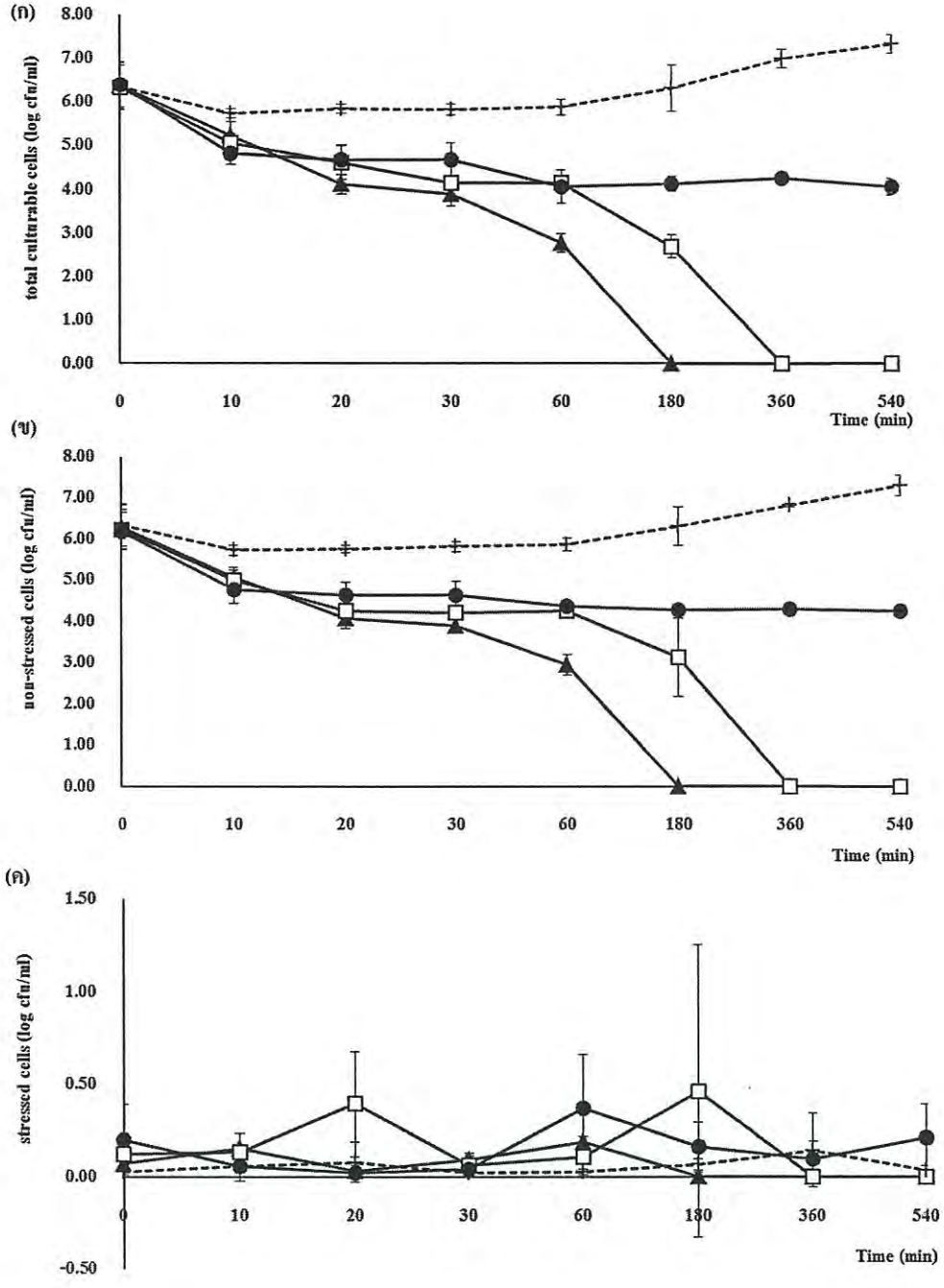
- FICI หรือ FBCI > 0.5 to 1.0 คือ ออกฤทธิ์เสริมกันบางส่วน
- FICI หรือ FBCI > 1.0 to <2.0 คือ ไม่ออกฤทธิ์เสริมกันหรือขัดขวางกัน
- FICI หรือ FBCI $\geq$ 2.0 คือ ออกฤทธิ์ขัดขวางกัน

4.2.3 ศึกษาระยะเวลาที่สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ แบคเทอริโอซิน Nisin A **และการใช้ร่วมกันต่อการลดลงของจำนวนเชื้อ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium โดยศึกษาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดและจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ (Cell stress) ของเชื้อบริสุทธิ์ (*In vitro*)**

4.2.3.1 การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 (log CFU/ml) ภายหลังการสัมผัสกับสารเป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 60, 180, 360 และ 540 นาที

จากการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ แบคเทอริโอซิน Nisin A และการใช้ร่วมกัน โดยเลือกความเข้มข้นจากค่า MBC (25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและ 320 AU/ml) และค่า FBCI (3.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 80 AU/ml) พบว่า การใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่เพียงอย่างเดียวสามารถทำลายจำนวนเชื้อ *S. aureus* ได้ภายใน 180 นาที ในขณะที่การใช้แบคเทอริโอซิน Nisin A เพียงอย่างเดียวไม่สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. aureus* ได้ นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ร่วมกับแบคเทอริโอซิน Nisin A สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. aureus* ได้หลังจากสัมผัสสารนาน 360 นาที ($P<0.05$)

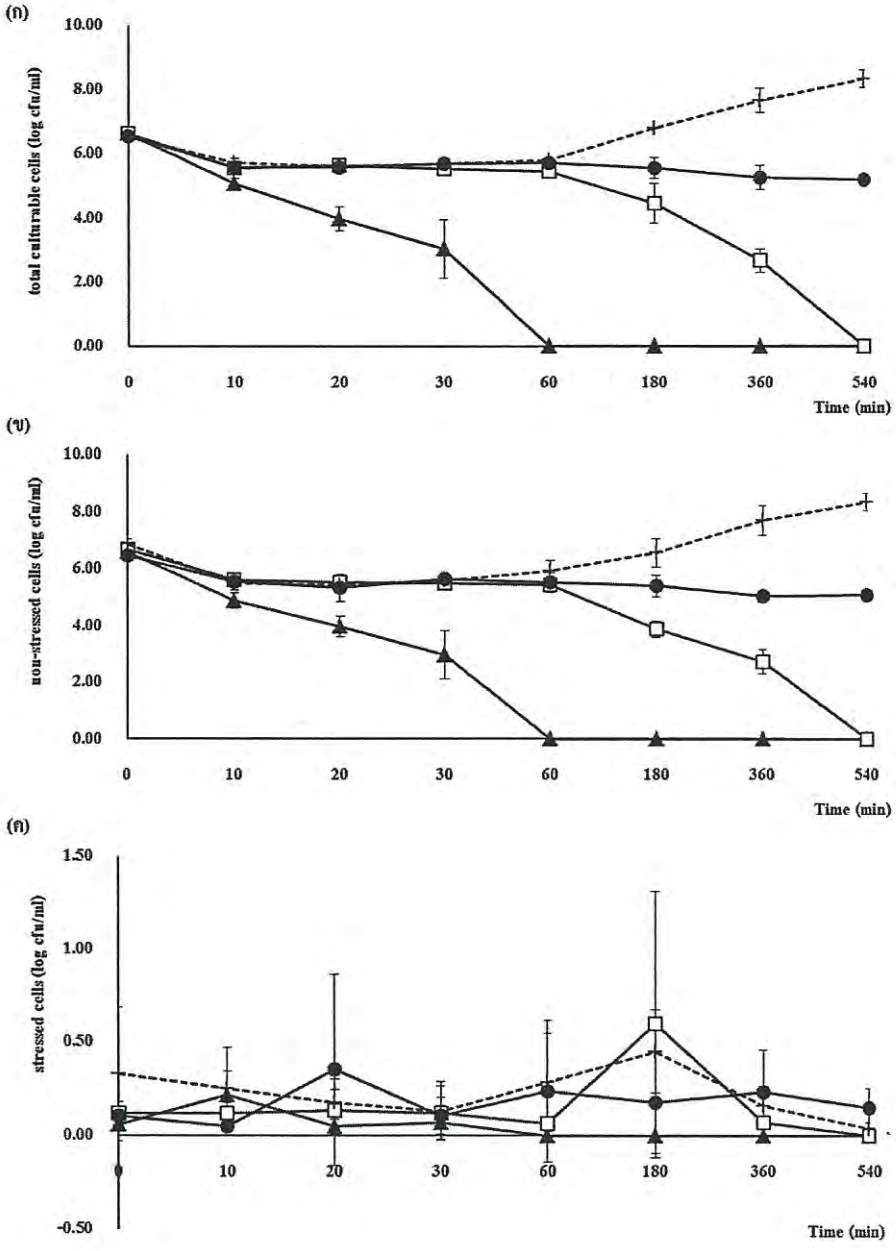
โดยกลุ่มควบคุม (ไม่สัมผัสสาร) ที่ระยะเวลา 10 นาที จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total culturable cells) และจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด (non-stressed cells) มีค่าค่อนข้างคงที่ จนถึงนาทีที่ 180 เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้น และเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) จำนวนเชื้อที่สัมผัสสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลาสัมผัส 10 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยลดลงจาก 6.37 ± 0.53 และ 6.30 ± 0.54 log CFU/ml ตามลำดับ เหลือเพียง 2.76 ± 0.21 และ 2.95 ± 0.24 log CFU/ml ตามลำดับ โดยเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียดมากที่สุดจาก 0.07 ± 0.03 เพิ่มขึ้นเป็น 0.19 ± 0.03 log CFU/ml ในนาทีที่ 60 และหลังจากนั้นแบคทีเรียทั้งสามสภาวะมีจำนวนลดลงและถูกทำลายทั้งหมดภายหลังสัมผัสสารสกัดเป็นเวลา 180 นาที ($P<0.05$) ในขณะที่แบคเทอริโอซิน Nisin A ที่ความเข้มข้น 320 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 10 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด มีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงนาทีที่ 540 และเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) ภายหลังจากนาทีที่ 360 ขึ้นไป นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ความเข้มข้น 3.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับแบคเทอริโอซิน Nisin A 80 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 10 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงจาก 6.34 ± 0.50 และ 6.23 ± 0.49 log CFU/ml ตามลำดับ เหลือเพียง 2.68 ± 0.26 และ 3.13 ± 0.94 log CFU/ml ตามลำดับ โดยเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียดมากที่สุดจาก 0.12 ± 0.11 เพิ่มขึ้นเป็น 0.46 ± 0.79 log CFU/ml ในนาทีที่ 180 และหลังจากนั้นแบคทีเรียทั้งสามสภาวะมีจำนวนลดลงและถูกทำลายทั้งหมดภายหลังสัมผัสสารสกัดเป็นเวลา 360 นาที ($P<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells (ก) non-stressed cells (ข) และ stressed cells (ค) เมื่อ ···+··· คือกลุ่มควบคุม, —▲— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, —●— คือกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน Nisin A 320 AU/ml และ —□— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ 3.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน Nisin A 80 AU/ml

4.4.2 การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 (log CFU/ml) ภายหลังการสัมผัสกับสารเป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 60, 180, 360 และ 540 นาที

จากการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 ของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ แบคเทอริโอซิน Nisin A และการใช้ร่วมกัน โดยเลือกความเข้มข้นจากค่า MBC (50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและ 320 AU/ml) และค่า FBCI (25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 10 AU/ml) พบว่า การใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่เพียงอย่างเดียวสามารถทำลายจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ได้ภายใน 60 นาที ในขณะที่การใช้แบคเทอริโอซิน Nisin A เพียงอย่างเดียวไม่สามารถลดจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ได้ นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ร่วมกับแบคเทอริโอซิน Nisin A สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. aureus* ได้หลังจากสัมผัสสารนาน 540 นาที ($P<0.05$) โดยกลุ่มควบคุม (ไม่สัมผัสสาร) ที่ระยะเวลา 10 นาที จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total culturable cells) และจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด (non-stressed cells) มีค่าค่อนข้างคงที่ จนถึงนาทีที่ 60 เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้น และเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) จำนวนเชื้อที่สัมผัสสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลาสัมผัส 10 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยลดลงจาก 6.64 ± 0.05 และ 6.58 ± 0.03 log CFU/ml ตามลำดับ เหลือเพียง 3.04 ± 0.92 และ 2.97 ± 0.85 log CFU/ml ตามลำดับ โดยเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียดมากที่สุดจาก 0.06 ± 0.02 เพิ่มขึ้นเป็น 0.07 ± 0.09 log CFU/ml ในนาทีที่ 30 และหลังจากนั้นแบคทีเรียทั้งสามสภาวะมีจำนวนลดลงและถูกทำลายทั้งหมดภายหลังสัมผัสสารสกัดเป็นเวลา 60 นาที ($P<0.05$) ในขณะที่แบคเทอริโอซิน Nisin A ที่ความเข้มข้น 320 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 10 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด มีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงนาทีที่ 540 และเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) ภายหลังจากนาทีที่ 360 ขึ้นไป นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับแบคเทอริโอซิน Nisin A 10 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 10 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงจาก 6.66 ± 0.03 และ 6.67 ± 0.16 log CFU/ml ตามลำดับ เหลือเพียง 2.67 ± 0.36 และ 2.72 ± 0.43 log CFU/ml ตามลำดับ โดยเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียดมากที่สุดจาก 0.12 ± 0.04 เพิ่มขึ้นเป็น 0.60 ± 0.71 log CFU/ml ในนาทีที่ 180 ($P<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.2

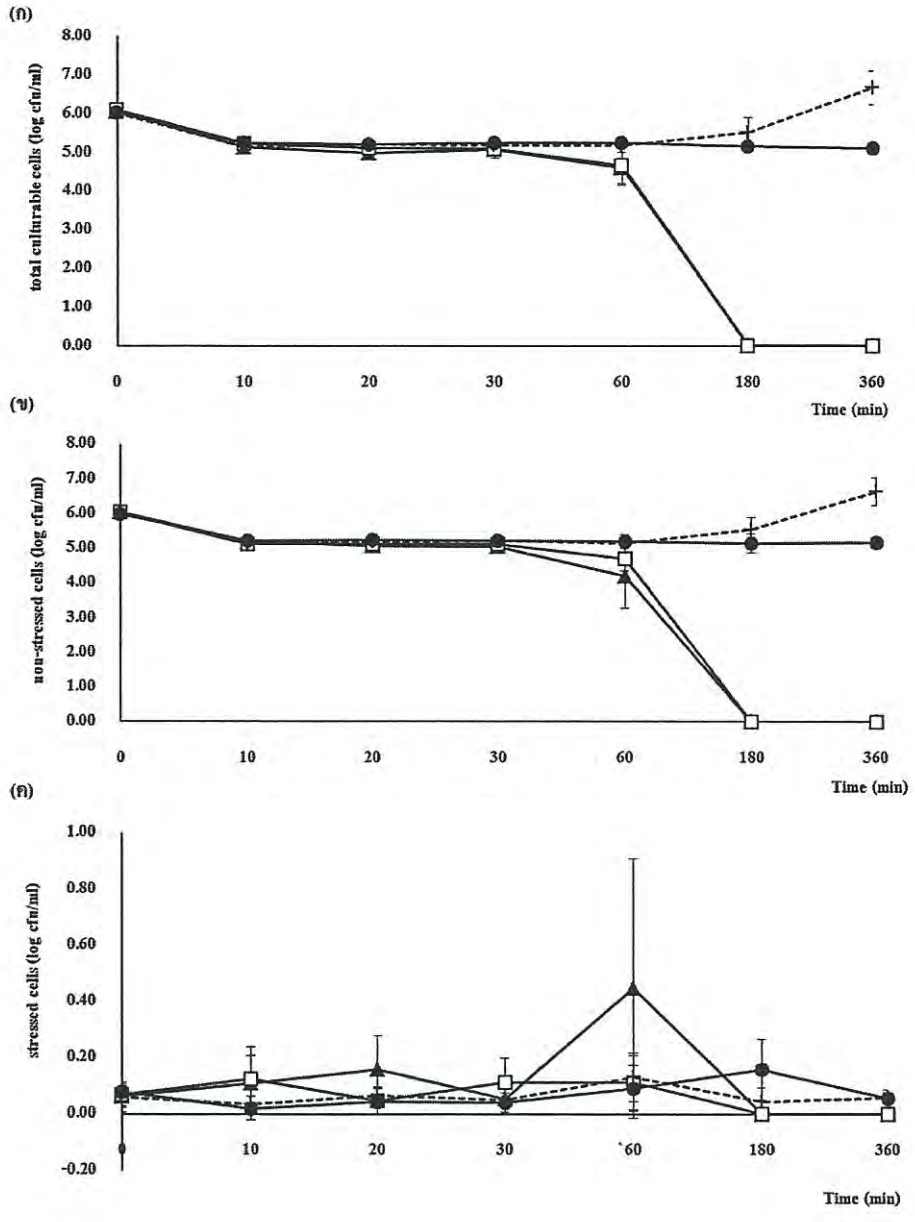


ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells (ก) non-stressed cells (ข) และ stressed cells (ค) เมื่อ···+··คือกลุ่มควบคุม,—▲— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร,—●— คือกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน Nisin A 320 AU/ml และ—□— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน Nisin A 10 AU/ml

4.2.4 ศึกษาระยะเวลาที่สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อการลดลงของจำนวนเชื้อ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium โดยศึกษาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดและจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ (Cell stress) ของเชื้อบริสุทธิ์ (*In vitro*)

4.2.4.1 การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 (log CFU/ml) ภายหลังการสัมผัสกับสารเป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 60, 180 และ 360 นาที

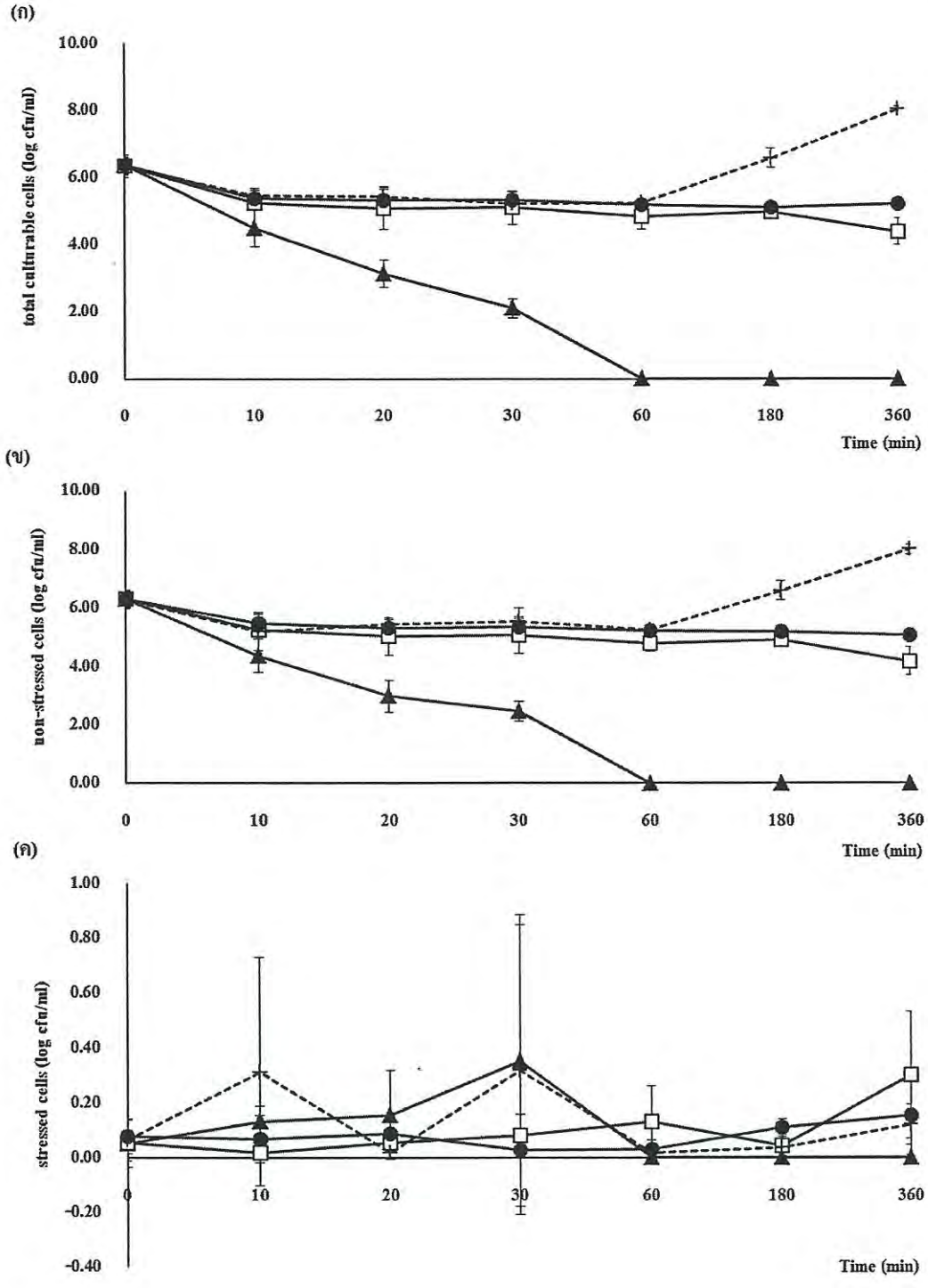
จากการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกัน โดยเลือกความเข้มข้นจากค่า MBC (25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและ 640 AU/ml) และค่า FBCI (12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 40 AU/ml) พบว่า การใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่เพียงอย่างเดียวสามารถทำลายจำนวนเชื้อ *S. aureus* ได้ภายใน 180 นาที ในขณะที่การใช้แบคเทอริโอซิน KL-1 เพียงอย่างเดียวไม่สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. aureus* ได้ นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. aureus* ได้หลังจากสัมผัสสารนาน 180 นาที ($P<0.05$) โดยกลุ่มควบคุม (ไม่สัมผัสสาร) ที่ระยะเวลา 10 นาที จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total culturable cells) และจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด (non-stressed cells) มีค่าค่อนข้างคงที่ จนถึงนาทีที่ 180 เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้น และเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) จำนวนเชื้อที่สัมผัสสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลาสัมผัส 10 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยลดลงจาก 6.05 ± 0.08 และ 6.03 ± 0.10 log CFU/ml ตามลำดับ เหลือเพียง 4.59 ± 0.40 และ 4.20 ± 0.91 log CFU/ml ตามลำดับ โดยเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียดมากที่สุดจาก 0.06 ± 0.03 เพิ่มขึ้นเป็น 0.45 ± 0.46 log CFU/ml ในนาทีที่ 60 และหลังจากนั้นแบคทีเรียทั้งสามสภาวะมีจำนวนลดลงและถูกทำลายทั้งหมดภายหลังสัมผัสสารสกัดเป็นเวลา 180 นาที ($P<0.05$) ในขณะที่แบคเทอริโอซิน KL-1 ที่ความเข้มข้น 640 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 10 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด มีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงนาทีที่ 360 และเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) ภายหลังจากนาทีที่ 180 ขึ้นไป นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 10 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงจาก 6.09 ± 0.11 และ 6.04 ± 0.17 log CFU/ml ตามลำดับ เหลือเพียง 4.66 ± 0.51 และ 4.70 ± 0.35 log CFU/ml ตามลำดับ โดยเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียดมากที่สุดจาก 0.07 ± 0.03 เพิ่มขึ้นเป็น 0.11 ± 0.09 log CFU/ml ในนาทีที่ 60 และหลังจากนั้นแบคทีเรียทั้งสามสภาวะมีจำนวนลดลงและถูกทำลายทั้งหมดภายหลังสัมผัสสารสกัดเป็นเวลา 180 นาที ($P<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells (ก) non-stressed cells (ข) และ stressed cells (ค) เมื่อ···+···คือกลุ่มควบคุม,—▲— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, —●— คือกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml และ—□— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml

4.2.4.2 การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 (log CFU/ml) ภายหลังการสัมผัสกับสารเป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 60, 180 และ 360 นาที

จากการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 ของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกัน โดยเลือกความเข้มข้นจากค่า MBC (50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและ 640 AU/ml) และค่า FBCI (12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 80 AU/ml) พบว่า การใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่เพียงอย่างเดียวสามารถทำลายจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ได้ภายใน 180 นาที ในขณะที่การใช้แบคเทอริโอซิน KL-1 เพียงอย่างเดียวไม่สามารถลดจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 สามารถลดจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ได้หลังจากสัมผัสสารนาน 360 นาที ($P<0.05$) โดยกลุ่มควบคุม (ไม่สัมผัสสาร) ที่ระยะเวลา 10 นาที จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total culturable cells) และจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด (non-stressed cells) มีค่าค่อนข้างคงที่ จนถึงนาทีที่ 60 เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้น และเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) จำนวนเชื้อที่สัมผัสสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลาสัมผัส 10 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยลดลงจาก 6.36 ± 0.26 และ 6.32 ± 0.23 log CFU/ml ตามลำดับ เหลือเพียง 2.10 ± 0.28 และ 2.46 ± 0.34 log CFU/ml ตามลำดับ โดยเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียดมากที่สุดจาก 0.05 ± 0.03 เพิ่มขึ้นเป็น 0.35 ± 0.53 log CFU/ml ในนาทีที่ 30 และหลังจากนั้นแบคทีเรียทั้งสามสภาวะมีจำนวนลดลงและถูกทำลายทั้งหมดภายหลังสัมผัสสารสกัดเป็นเวลา 60 นาที ($P<0.05$) ในขณะที่แบคเทอริโอซิน KL-1 ที่ความเข้มข้น 640 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 10 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด มีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงนาทีที่ 360 และเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) ภายหลังจากนาทีที่ 180 ขึ้นไป นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 80 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 10 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงจาก 6.34 ± 0.25 และ 6.29 ± 0.31 log CFU/ml ตามลำดับ เหลือเพียง 4.38 ± 0.39 และ 4.17 ± 0.47 log CFU/ml ตามลำดับ โดยเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียดมากที่สุดจาก 0.05 ± 0.08 เพิ่มขึ้นเป็น 0.30 ± 0.22 log CFU/ml ในนาทีที่ 360 ($P<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells (ก) non-stressed cells (ข) และ stressed cells (ค) เมื่อ ···+··· คือ กลุ่มควบคุม, —▲— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, —●— คือกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml และ —□— คือ กลุ่มที่เติมสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1

4.2.5 ศึกษาการทำงานเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic testing) ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน Ninsin A ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 และ *S.* Typhimurium TISTR 292 โดยวิธี Checker board broth

ค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย (Fractional inhibitory concentration index, FICI) และค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อทำลายแบคทีเรีย (Fractional bactericidal concentration index, FBCI) ของการใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน Ninsin A ร่วมกัน พบว่าการใช้สารทั้งสองชนิดร่วมกันมีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 โดยค่า FICI คือ 0.75 (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 40 AU/ml) และค่า FBCI คือ 0.75 (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 40 AU/ml) การใช้สารทั้งสองชนิดร่วมกันมีฤทธิ์เสริมกันบางส่วนในการยับยั้งเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 โดยค่า FICI 0.625 (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 40 AU/ml) และมีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อ โดยค่า FBCI คือ 0.25 (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 40 AU/ml) ดังแสดงในตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 ค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย (FICI) และค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อทำลายแบคทีเรีย (FBCI) ของการใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน Ninsin A

เชื้อทดสอบ	FICI[a]		FBCI[a]	
	ความเข้มข้นของสาร[b]	แปลผล[c]	ความเข้มข้นของสาร[b]	แปลผล[c]
Staphylococcus aureus TISTR 118	6.25 + 40	0.75	6.25 + 40	0.75
Salmonella Typhimurium TISTR 292	6.25 + 40	0.625	6.25 + 40	0.25

[a]FICI = fractional inhibitory concentration index ; FBCI = fractional bactericidal concentration index

[b] ความเข้มข้นของกระเจี๊ยบแดง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ร่วมกับแบคเทอริโอซิน Ninsin A (AU/ml)

[c] การแปลผลค่า FICI และ FBCI : - FICI หรือ FBCI < 0.5 คือ ออกฤทธิ์เสริมกัน

- FICI หรือ FBCI > 0.5 to 1.0 คือ ออกฤทธิ์เสริมกันบางส่วน
- FICI หรือ FBCI > 1.0 to <2.0 คือ ไม่ออกฤทธิ์เสริมกันหรือขัดขวางกัน
- FICI หรือ FBCI $\geq$ 2.0 คือ ออกฤทธิ์ขัดขวางกัน

4.2.6 ศึกษาการทำงานเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic testing) ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 และ *S.* Typhimurium TISTR 292 โดยวิธี Checker board broth

ค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย (Fractional inhibitory concentration index, FICI) และค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อทำลายแบคทีเรีย (Fractional bactericidal concentration index, FBCI) ของการใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ร่วมกัน พบว่าการใช้สารทั้งสองชนิดร่วมกันมีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 โดยค่า FICI คือ 0.31 (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 10 AU/ml) และค่า FBCI คือ 0.31 (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 10 AU/ml) การใช้สารทั้งสองชนิดร่วมกันมีฤทธิ์เสริมกันบางส่วนในการยับยั้งเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 โดยค่า FICI 0.75 (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 40 AU/ml) และมีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อ โดยค่า FBCI คือ 0.25 (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 40 AU/ml) ดังแสดงในตารางที่ 4.18

ตารางที่ 4.18 ค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย (FICI) และค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อทำลายแบคทีเรีย (FBCI) ของการใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับ แบคเทอริโอซิน KL-1

เชื้อทดสอบ	FICI[a]		FBCI[a]	
	ความเข้มข้นของสาร[b]	แปลผล[c]	ความเข้มข้นของสาร[b]	แปลผล[c]
Staphylococcus aureus TISTR 118	6.25 + 10	0.31	6.25 + 10	0.31
Salmonella Typhimurium TISTR 292	6.25 + 40	0.75	6.25 + 40	0.25

[a]FICI = fractional inhibitory concentration index ; FBCI = fractional bactericidal concentration index

[b] ความเข้มข้นของกระเจี๊ยบแดง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 (AU/ml)

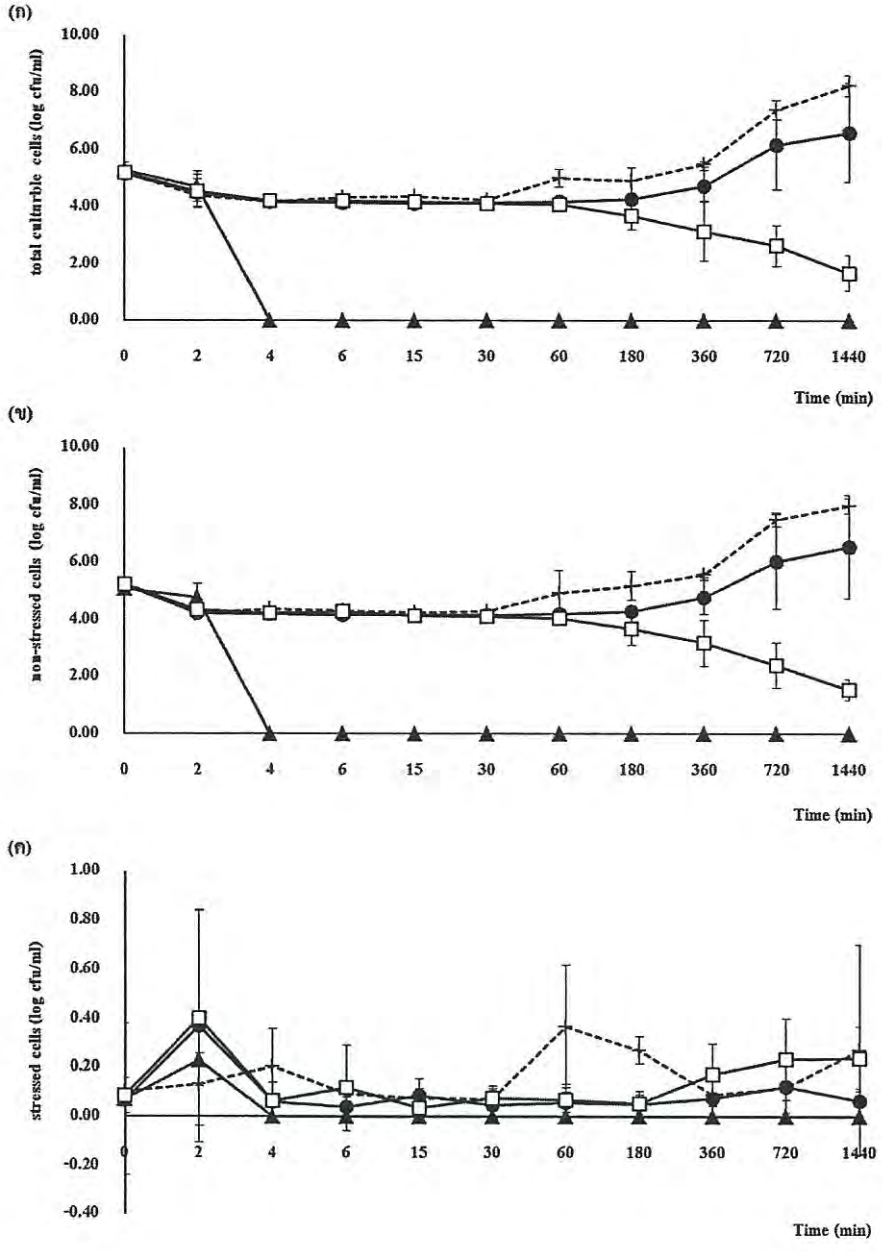
[c] การแปลผลค่า FICI และ FBCI : - FICI หรือ FBCI < 0.5 คือ ออกฤทธิ์เสริมกัน

- FICI หรือ FBCI > 0.5 to 1.0 คือ ออกฤทธิ์เสริมกันบางส่วน
- FICI หรือ FBCI > 1.0 to <2.0 คือ ไม่ออกฤทธิ์เสริมกันหรือขัดขวางกัน
- FICI หรือ FBCI $\geq$ 2.0 คือ ออกฤทธิ์ขัดขวางกัน

4.2.7 ศึกษาระยะเวลาที่สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน Ninsin A และการใช้ร่วมกันต่อการลดลงของจำนวนเชื้อ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium โดยศึกษาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดและจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ (Cell stress) ของเชื้อบริสุทธิ์ (*In vitro*)

4.2.7.1 การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 (log CFU/ml) ภายหลังการสัมผัสกับสารเป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 15, 30, 60, 180, 360, 720 และ 1440 นาที

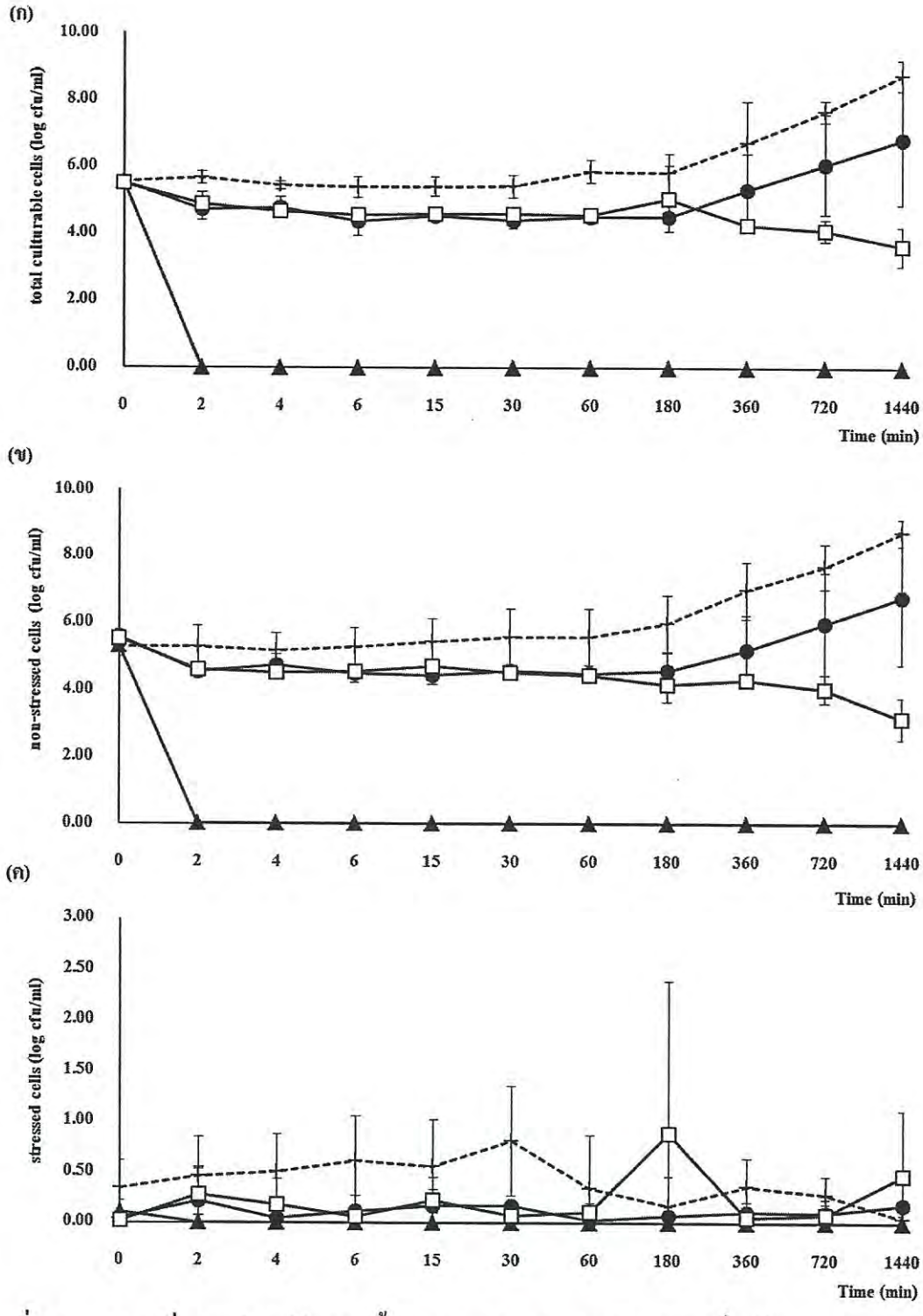
จากการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน Ninsin A และการใช้ร่วมกัน โดยเลือกความเข้มข้นจากค่า MBC (25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและ 80 AU/ml) และค่า FBCI (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 40 AU/ml) พบว่า การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงเพียงอย่างเดียวสามารถทำลายจำนวนเชื้อ *S. aureus* ได้ภายใน 4 นาที ในขณะที่การใช้แบคเทอริโอซิน Ninsin A เพียงอย่างเดียวไม่สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. aureus* ได้ นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน Ninsin A สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. aureus* ได้หลังจากสัมผัสสารนาน 60 นาที ($P<0.05$) โดยกลุ่มควบคุม (ไม่สัมผัสสาร) ที่ระยะเวลา 2 นาที จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total culturable cells) และจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด (non-stressed cells) มีค่าค่อนข้างคงที่ จนถึงนาทีที่ 360 เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้น และเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) จำนวนเชื้อที่สัมผัสสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลาสัมผัส 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยลดลงจาก 5.26 ± 0.30 และ 5.08 ± 0.05 log CFU/ml ตามลำดับ เหลือเพียง 4.71 ± 0.52 และ 4.77 ± 0.50 log CFU/ml โดยเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียดมากที่สุดจาก 0.07 ± 0.31 เพิ่มขึ้นเป็น 0.23 ± 0.03 log CFU/ml ในนาทีที่ 2 และหลังจากนั้นแบคทีเรียทั้งสามสภาวะมีจำนวนลดลงและถูกทำลายทั้งหมดภายหลังสัมผัสสารสกัดเป็นเวลา 4 นาที ($P<0.05$) ในขณะที่แบคเทอริโอซิน Ninsin A ที่ความเข้มข้น 80 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด มีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงนาทีที่ 180 เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้น และเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) ภายหลังจากนาทีที่ 360 ขึ้นไป นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับแบคเทอริโอซิน Ninsin A 40 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงจาก 5.17 ± 0.03 และ 5.26 ± 0.08 log CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนค่อนข้างคงที่จนถึงเวลาที่ 60 จากนั้นเชื้อมีแนวโน้มลดลงในนาทีที่ 180 เหลือเพียง 1.69 ± 0.62 และ 1.54 ± 0.37 log CFU/ml สอดคล้องกับสภาวะเครียด (stressed cells) ที่เพิ่มขึ้นในนาทีที่ 360 จาก 0.09 ± 0.07 เป็น 0.23 ± 0.13 log CFU/ml ($P<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells (ก) non-stressed cells (ข) และ stressed cells (ค)เมื่อ···+···คือกลุ่มควบคุม, —▲— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, —●— คือกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน Ninsin A 80 AU/ml และ —□— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน Ninsin A 40 AU/ml

4.2.7.2 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 (log CFU/ml) ภายหลังการสัมผัสกับสารเป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 15, 30, 60, 180, 360, 720 และ 1440 นาที

จากการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน Ninsin A และการใช้ร่วมกัน โดยเลือกความเข้มข้นจากค่า MBC (50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและ 320 AU/ml) และค่า FBCI (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 40 AU/ml) พบว่า การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงเพียงอย่างเดียวสามารถทำลายจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ได้ภายใน 2 นาที ในขณะที่การใช้แบคเทอริโอซิน Ninsin A เพียงอย่างเดียวไม่สามารถลดจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ได้ นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน Ninsin A สามารถลดจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ได้หลังจากสัมผัสสารนาน 360 นาที ($P<0.05$) โดยกลุ่มควบคุม (ไม่สัมผัสสาร) ที่ระยะเวลา 2 นาที จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total culturable cells) และจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด (non-stressed cells) มีค่าค่อนข้างคงที่ จนถึงนาทีที่ 180 เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้น และเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) จำนวนเชื้อที่สัมผัสสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลาสัมผัส 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยลดลงจาก 5.51 ± 0.15 และ 5.61 ± 0.16 log CFU/ml ตามลำดับ และหลังจากนั้นแบคทีเรียทั้งสามสภาวะมีจำนวนลดลงและถูกทำลายทั้งหมดภายหลังสัมผัสสารสกัดเป็นเวลา 2 นาที ($P<0.05$) ในขณะที่แบคเทอริโอซิน Ninsin A ที่ความเข้มข้น 320 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด มีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงนาทีที่ 180 เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้น และเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) ภายหลังจากนาทีที่ 360 ขึ้นไป นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับแบคเทอริโอซิน Ninsin A 40 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงจาก 5.49 ± 0.12 และ 5.52 ± 0.13 log CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนค่อนข้างคงที่จนถึงเวลาที่ 180 จากนั้นเชื้อมีแนวโน้มลดลงในนาทีที่ 360 เหลือเพียง 3.62 ± 0.59 และ 3.15 ± 0.62 log CFU/ml สอดคล้องกับสภาวะเครียด (stressed cells) ที่เพิ่มขึ้นในนาทีที่ 180 จาก 0.02 ± 0.03 เป็น 0.47 ± 0.03 log CFU/ml ($P<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.6

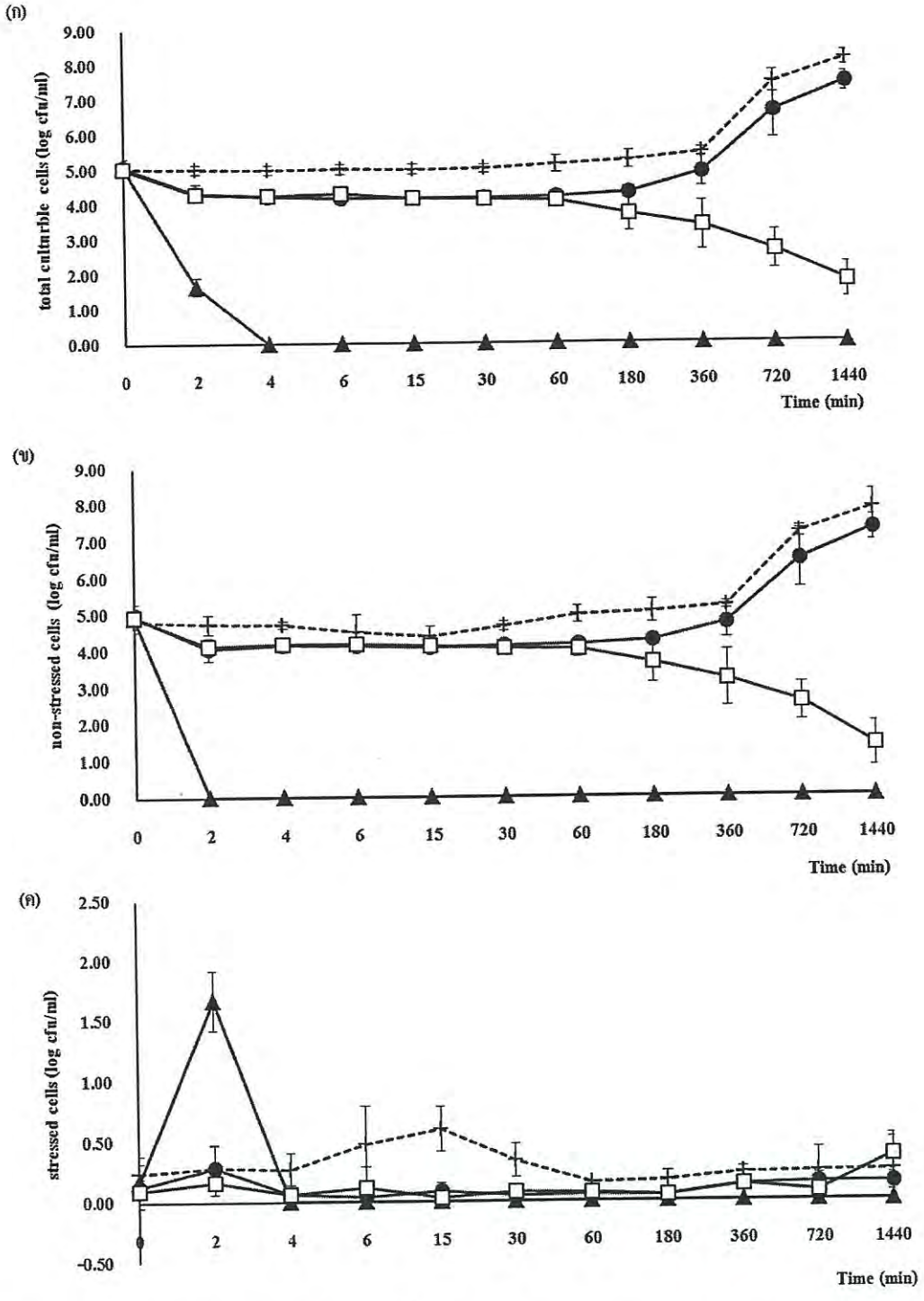


ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells (ก) non-stressed cells (ข) และ stressed cells (ค) เมื่อ ···+··· คือกลุ่มควบคุม, —▲— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, —●— คือกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน Ninsin A 320 AU/ml และ —□— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน Ninsin A 40 AU/ml

4.2.8 ศึกษาระยะเวลาที่สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อการลดลงของจำนวนเชื้อ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium โดยศึกษาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดและจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ (Cell stress) ของเชื้อบริสุทธิ์ (*In vitro*)

4.2.8.1 การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 (log CFU/ml) ภายหลังการสัมผัสกับสารเป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 15, 30, 60, 180, 360, 720 และ 1440 นาที

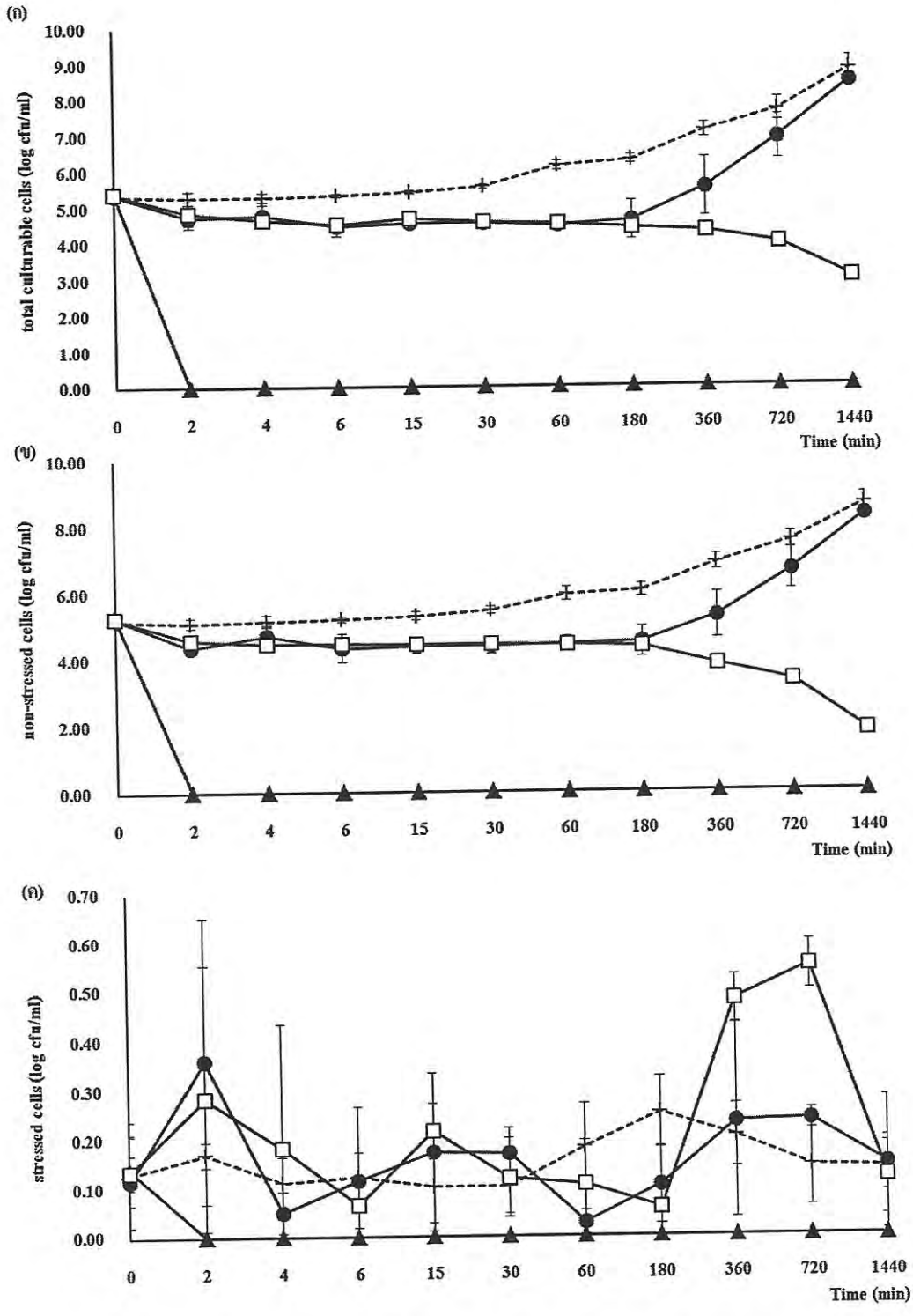
จากการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกัน โดยเลือกความเข้มข้นจากค่า MBC (25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและ 160 AU/ml) และค่า FBCI (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 10 AU/ml) พบว่า การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงเพียงอย่างเดียวสามารถทำลายจำนวนเชื้อ *S. aureus* ได้ภายใน 4 นาที ในขณะที่การใช้แบคเทอริโอซิน KL-1 เพียงอย่างเดียวไม่สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. aureus* ได้ นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. aureus* ได้หลังจากสัมผัสสารนาน 60 นาที ($P<0.05$) โดยกลุ่มควบคุม (ไม่สัมผัสสาร) ที่ระยะเวลา 2 นาที จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total culturable cells) และจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด (non-stressed cells) มีค่าค่อนข้างคงที่ จนถึงนาทีที่ 360 เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้น และเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) จำนวนเชื้อที่สัมผัสสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลาสัมผัส 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยลดลงจาก 5.09 ± 0.07 และ 4.92 ± 0.28 log CFU/ml ตามลำดับ เหลือเพียง 1.67 ± 0.25 และไม่สามารถตรวจพบได้ ตามลำดับ โดยเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียดมากที่สุดจาก 0.17 ± 0.21 เพิ่มขึ้นเป็น 1.67 ± 0.25 log CFU/ml ในนาทีที่ 2 และหลังจากนั้นแบคทีเรียทั้งสามสภาวะมีจำนวนลดลงและถูกทำลายทั้งหมดภายหลังสัมผัสสารสกัดเป็นเวลา 4 นาที ($P<0.05$) ในขณะที่แบคเทอริโอซิน KL-1 ที่ความเข้มข้น 160 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด มีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงนาทีที่ 360 เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้น และเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) ภายหลังจากนาทีที่ 360 ขึ้นไป นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 10 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงจาก 5.05 ± 0.21 และ 4.96 ± 0.22 log CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนค่อนข้างคงที่จนถึงเวลาที่ 360 จากนั้นเชื้อมีแนวโน้มลดลงในนาทีที่ 720 เหลือเพียง 4.31 ± 0.13 และ 4.15 ± 0.13 log CFU/ml สอดคล้องกับสภาวะเครียด (stressed cells) ที่เพิ่มขึ้นในนาทีที่ 720 จาก 0.10 ± 0.02 เป็น 0.16 ± 0.10 log CFU/ml ($P<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.7



ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells (ก) non-stressed cells (ข) และ stressed cells (ค) เมื่อ···+··· คือกลุ่มควบคุม, —▲— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, —●— คือกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 160 AU/ml และ —□— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 10 AU/ml

4.2.8.2 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 (log CFU/ml) ภายหลังการสัมผัสกับสารเป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 15, 30, 60, 180, 360, 720 และ 1440 นาที

จากการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกัน โดยเลือกความเข้มข้นจากค่า MBC (50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและ 320 AU/ml) และค่า FBCI (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 40 AU/ml) พบว่า การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงเพียงอย่างเดียวสามารถทำลายจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ได้ภายใน 2 นาที ในขณะที่การใช้แบคเทอริโอซิน KL-1 เพียงอย่างเดียวไม่สามารถลดจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ได้ นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 สามารถลดจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ได้หลังจากสัมผัสสารนาน 60 นาที ($P<0.05$) โดยกลุ่มควบคุม (ไม่สัมผัสสาร) ที่ระยะเวลา 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total culturable cells) และจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด (non-stressed cells) มีค่าค่อนข้างคงที่ จนถึงนาทีที่ 30 เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้น และเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) จำนวนเชื้อที่สัมผัสสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลาสัมผัส 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยลดลงจาก 5.44 ± 0.04 และ 5.36 ± 0.11 log CFU/ml ตามลำดับ จนไม่สามารถตรวจนับได้ และหลังจากนั้นแบคทีเรียทั้ง 3 สภาวะมีจำนวนลดลงและถูกทำลายทั้งหมดภายหลังสัมผัสสารสกัดเป็นเวลา 2 นาที ($P<0.05$) ในขณะที่แบคเทอริโอซิน KL-1 ที่ความเข้มข้น 320 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด มีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงนาทีที่ 180 เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้นและเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) ภายหลังจากนาทีที่ 180 ขึ้นไป นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงจาก 5.41 ± 0.04 และ 5.27 ± 0.01 log CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนค่อนข้างคงที่จนถึงเวลาที่ 180 จากนั้นเชื้อมีแนวโน้มลดลงในนาทีที่ 360 เหลือเพียง 4.87 ± 0.35 และ 4.58 ± 0.16 log CFU/ml สอดคล้องกับสภาวะเครียด (stressed cells) ที่เพิ่มขึ้นในนาทีที่ 360 จาก 0.13 ± 0.03 เป็น 0.28 ± 0.27 log CFU/ml ($P<0.05$) เมื่อระยะเวลาผ่านไปเชื้อที่บาดเจ็บจะสามารถฟื้นฟูและกลับมาเจริญเติบโตใหม่ได้ (Slavik *et al.* 1995) ดังแสดงในภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells (ก) non-stressed cells (ข) และ stressed cells (ค) เมื่อ···+···คือกลุ่มควบคุม, —▲— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, —●— คือกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน 320 AU/ml และ —□— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml

4.3 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพด้านจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด

4.3.1 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพด้านจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบดแช่เย็น

4.3.1.1 คุณภาพด้านจุลินทรีย์

การวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) (log cfu/g) พบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 4.99, 4.79, 4.93, 4.85, 5.06 และ 4.97 log cfu/g ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเมื่อเก็บรักษานาน 10 วัน ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยในวันที่ 2 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 5.29, 4.61, 4.65, 4.75, 4.73 และ 4.84 log cfu/g ตามลำดับ วันที่ 4 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 5.86, 5.25, 5.34, 5.44, 5.32 และ 5.43 log cfu/g ตามลำดับ วันที่ 6 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 6.11, 5.77, 5.74, 5.87, 5.61 และ 5.63 log cfu/g ตามลำดับ ในวันที่ 10 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 8.73, 7.28, 7.47, 7.55, 7.29 และ 7.25 log cfu/g ตามลำดับ โดยพบว่ากลุ่มควบคุมเนื้อเริ่มเน่าเสียในวันที่ 8 ของการเก็บรักษา โดยมีจำนวนจุลินทรีย์รวม 7.31 log cfu/g ซึ่งจำนวนเชื้อที่เริ่มเน่าเสียคือ log 7 cfu/g ทำให้เนื้อมีกลิ่นผิดปกติ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549; Olaoye and Ntuen. 2011) นอกจากนี้เนื้อจะเริ่มเกิดเมือกเมื่อตรวจนับจุลินทรีย์ได้ log 7.5- log 8 (ในวันที่ 7 ของการเก็บรักษา) ซึ่งการเกิดเมือกบนเนื้อสดเป็นปัญหาการเน่าเสียของเนื้อที่เก็บในตู้เย็นมากที่สุด (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549) ซึ่งกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 เนื้อเริ่มเน่าเสียในวันที่ 10 อย่างไรก็ตามกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 พบว่าจำนวนเชื้อไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4.19

การวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophilic) (log cfu/g) พบจำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ 4.23, 4.15, 4.09, 4.17, 4.23 และ 4.22 log cfu/g ตามลำดับ สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ โดยมีจำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) และเมื่อเก็บรักษาเนื้อสุกรบดนานขึ้นเป็นเวลา 10 วัน พบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 ของการเก็บรักษาและมากที่สุดในวันที่ 10 ของการเก็บรักษา ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.20

การวิเคราะห์หายีสต์และรา (log cfu/g) พบจำนวนยีสต์รา 3.54, 3.54, 3.41, 3.58, 3.60 และ 3.68 log cfu/g ตามลำดับ ในวันแรกของการเก็บรักษาทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณเชื้อไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) กลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและ

แบคเทอริโอซิน KL-1 มีจำนวนเชื้อต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ในวันที่ 2 โดยมีจำนวนเชื้อ 3.91, 3.49, 3.49, 3.41, 3.61 และ 3.64 log cfu/g ตามลำดับ และวันที่ 4 มีจำนวนเชื้อ 4.06, 3.46, 3.44, 3.64, 3.66 และ 3.72 log cfu/g ตามลำดับ ในวันที่ 6 และ 8 จำนวนเชื้อไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนในวันที่ 10 พบว่ากลุ่มที่เติมสารแบคเทอริโอซิน KL-1 และกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 มีจำนวนเชื้อต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงเพียงอย่างเดียว โดยมีค่า 5.34, 5.21, 5.00, 5.11,5.19 และ 5.11 log cfu/g ตามลำดับ และเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่าทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 ของการเก็บรักษา ยกเว้นกลุ่มควบคุมที่มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 ของการเก็บรักษาและมากที่สุดในวันที่ 10 ของการเก็บรักษา ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.21

การวิเคราะห์จำนวน Coliform (log cfu/g) พบจำนวน Colifom 3.90, 3.91, 3.94, 3.93, 4.04 และ 4.11 log cfu/g ตามลำดับ ในวันแรกของการเก็บรักษาทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวนเชื้อไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) นอกจากนี้ในวันที่ 2, 4, 6 และ 8 ทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวน Coliform ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml มีผลในการลดจำนวน Coliform ในวันที่ 2 สำหรับกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกัน มีผลในการลดจำนวน Coliform ในวันที่ 10 เท่านั้น โดยมีค่า 6.82, 5.82, 6.37, 6.40, 6.00 และ 6.24 log cfu/g ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.22

การวิเคราะห์หา *E. coli* (cfu/g) พบว่าตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 10 วัน ทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวน *E. coli* ต่ำกว่าค่าที่สามารถตรวจพบได้ (<1 lof cfu/g) ดังแสดงในตารางที่ 4.23

จากการสุ่มตัวอย่างชี้ให้เห็นว่า เนื้อสุกรมีสุขลักษณะในการผลิตที่ดีเนื่องจากจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเริ่มต้นอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของมาตรฐานสินค้าเกษตร (มกษ 6000-2547) เนื้อสุกร. 2547) ซึ่งกำหนดไว้ว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ต้องไม่เกิน 5×10^5 โคโลนี (CFU) ต่อตัวอย่าง 1 กรัม เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ พบว่าไม่สามารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งหมดได้ เนื่องจากจุลินทรีย์ที่พบในเนื้อสัตว์มีหลายชนิด บางชนิดสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ไม่สามารถยับยั้งได้ ซึ่งหากมีจำนวนจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถยับยั้งได้มาก ทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ (Jazani *et al.* 2007) ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ และชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ (Almajano *et al.* 2008) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลการทดลองของ Babatunde and Adewumi (2015) ทำการศึกษาผลของการใช้สารสกัดจากกลีบดอกกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยเอทานอลในแพตตี้ไก่ พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 14 วัน มีจำนวนเพิ่มขึ้น ผลดังกล่าวอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพของสารสกัด

เนื่องจากในเนื้อสัตว์มีปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารสกัด เช่น สารอินทรีย์ต่างๆ ไขมัน หรือเชื้อชนิดอื่นๆ ทำให้สิ่งเหล่านี้ไปขัดขวางการทำงานของสารสกัดทำให้สารสกัดออกฤทธิ์ได้ไม่เต็มที่ อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และความเข้มข้นของสารสกัด (นิพัฒน์ ลิ้มสงวน. 2547) นอกจากนี้การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิต่ำสามารถลดอัตราการแลกเปลี่ยนของเหลวภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ทำให้กรดไขมันที่ปกติเป็นสายยาวเปลี่ยนเป็นผลึกที่มแทงเซลล์ทำให้เซลล์ตาย โดยเชื้อจะเปลี่ยนสภาวะจากปกติไปเป็นเซลล์ที่บาดเจ็บ (ผุสดี และคณะ. 2553) แต่เมื่อเชื้ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม เช่น เนื้อสัตว์ จะทำให้เชื้อสามารถปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดในผลิตภัณฑ์ได้ เช่นเดียวการทดลองผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 จำนวนเชื้อไม่มีจำนวนที่ลดลง

ตารางที่ 4.19 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร+ แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	$4.99 \pm 0.31^{a,D\dagger,\ddagger,\S}$	$4.79 \pm 0.01^{a,E}$	$4.93 \pm 0.25^{a,E}$	$4.85 \pm 0.19^{a,E}$	$5.06 \pm 0.20^{a,DE}$	$4.97 \pm 0.21^{a,C}$
2	$5.29 \pm 0.18^{a,D}$	$4.61 \pm 0.01^{b,E}$	$4.65 \pm 0.03^{b,F}$	$4.75 \pm 0.03^{b,E}$	$4.73 \pm 0.23^{b,E}$	$4.84 \pm 0.02^{b,C}$
4	$5.86 \pm 0.01^{a,C}$	$5.25 \pm 0.01^{d,D}$	$5.34 \pm 0.02^{c,D}$	$5.44 \pm 0.12^{b,D}$	$5.32 \pm 0.03^{c,DE}$	$5.43 \pm 0.02^{b,BC}$
6	$6.11 \pm 0.11^{a,C}$	$5.77 \pm 0.26^{bc,C}$	$5.74 \pm 0.04^{bc,C}$	$5.87 \pm 0.02^{b,C}$	$5.61 \pm 0.03^{c,C}$	$5.63 \pm 0.29^{c,B}$
8	$7.31 \pm 0.65^{a,B}$	$6.24 \pm 0.71^{b,B}$	$6.55 \pm 0.03^{b,B}$	$6.52 \pm 0.53^{b,B}$	$6.36 \pm 0.69^{b,B}$	$6.67 \pm 0.57^{ab,A}$
10	$8.73 \pm 0.17^{a,A}$	$7.28 \pm 0.02^{b,A}$	$7.47 \pm 0.05^{b,A}$	$7.55 \pm 0.01^{b,A}$	$7.29 \pm 0.01^{b,A}$	$7.25 \pm 0.98^{b,A}$

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.20 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophilic) (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	$4.23 \pm 0.33^{a,D\dagger,\ddagger,\S}$	$4.15 \pm 0.15^{a,CD}$	$4.09 \pm 0.19^{a,E}$	$4.17 \pm 0.05^{a,E}$	$4.23 \pm 0.36^{a,E}$	$4.22 \pm 0.03^{a,E}$
2	$4.51 \pm 0.71^{a,D}$	$3.95 \pm 0.77^{a,D}$	$4.22 \pm 0.02^{a,E}$	$4.33 \pm 0.04^{a,E}$	$4.22 \pm 0.22^{a,E}$	$4.25 \pm 0.10^{a,E}$
4	$5.56 \pm 0.02^{a,C}$	$5.05 \pm 0.86^{a,C}$	$5.10 \pm 0.85^{a,D}$	$5.24 \pm 0.46^{a,D}$	$5.23 \pm 0.23^{a,D}$	$5.32 \pm 0.09^{a,D}$
6	$7.01 \pm 0.39^{a,B}$	$6.49 \pm 0.92^{a,B}$	$6.68 \pm 0.02^{a,C}$	$6.75 \pm 0.04^{a,C}$	$6.65 \pm 0.25^{a,C}$	$6.82 \pm 0.07^{a,C}$
8	$8.12 \pm 0.13^{a,A}$	$7.62 \pm 0.53^{a,A}$	$7.70 \pm 0.01^{a,B}$	$7.80 \pm 0.48^{a,B}$	$7.80 \pm 0.48^{a,B}$	$7.81 \pm 0.49^{a,B}$
10	$8.87 \pm 1.19^{a,A}$	$8.36 \pm 0.86^{a,A}$	$8.40 \pm 0.29^{a,A}$	$8.50 \pm 1.02^{a,A}$	$8.53 \pm 0.85^{a,A}$	$8.41 \pm 0.82^{a,A}$

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.21 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวนยีสต์และรา (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	$3.54 \pm 0.03^{a,E\dagger,\ddagger,\S}$	$3.54 \pm 0.32^{a,C}$	$3.41 \pm 0.21^{a,C}$	$3.58 \pm 0.23^{a,CD}$	$3.60 \pm 0.20^{a,C}$	$3.68 \pm 0.08^{a,C}$
2	$3.91 \pm 0.01^{a,D}$	$3.49 \pm 0.36^{b,C}$	$3.49 \pm 0.33^{b,C}$	$3.41 \pm 0.45^{b,D}$	$3.61 \pm 0.29^{ab,C}$	$3.64 \pm 0.18^{ab,C}$
4	$4.06 \pm 0.03^{a,C}$	$3.46 \pm 0.04^{c,C}$	$3.44 \pm 0.10^{c,C}$	$3.64 \pm 0.18^{b,CD}$	$3.66 \pm 0.02^{b,C}$	$3.72 \pm 0.04^{b,C}$
6	$4.11 \pm 0.02^{a,C}$	$3.92 \pm 0.12^{a,BC}$	$3.82 \pm 0.54^{a,BC}$	$3.87 \pm 0.28^{a,BC}$	$3.99 \pm 0.24^{a,BC}$	$3.89 \pm 0.40^{a,C}$
8	$4.35 \pm 0.12^{a,B}$	$4.15 \pm 0.31^{a,B}$	$4.24 \pm 0.49^{a,B}$	$4.26 \pm 0.48^{a,B}$	$4.25 \pm 0.55^{a,B}$	$4.30 \pm 0.30^{a,B}$
10	$5.34 \pm 0.01^{a,A}$	$5.21 \pm 0.06^{ab,A}$	$5.00 \pm 0.02^{c,A}$	$5.11 \pm 0.02^{bc,A}$	$5.19 \pm 0.18^{b,A}$	$5.11 \pm 0.17^{bc,A}$

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.22 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวน Coliform (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	$3.90 \pm 0.34^{a,D\dagger,\ddagger,\S}$	$3.91 \pm 0.18^{a,D}$	$3.94 \pm 0.05^{a,D}$	$3.93 \pm 0.05^{a,D}$	$4.04 \pm 0.11^{a,C}$	$4.11 \pm 0.13^{a,D}$
2	$4.18 \pm 0.37^{a,D}$	$3.95 \pm 0.15^{ab,D}$	$3.81 \pm 0.21^{b,D}$	$3.92 \pm 0.11^{ab,D}$	$4.01 \pm 0.16^{ab,C}$	$4.08 \pm 0.21^{ab,D}$
4	$4.28 \pm 0.35^{a,D}$	$4.30 \pm 0.37^{a,CD}$	$4.12 \pm 0.35^{a,D}$	$4.13 \pm 0.35^{a,D}$	$4.19 \pm 0.21^{a,C}$	$4.21 \pm 0.46^{a,D}$
6	$4.94 \pm 0.48^{a,C}$	$4.54 \pm 0.67^{ab,C}$	$4.70 \pm 0.55^{ab,C}$	$4.92 \pm 0.22^{ab,C}$	$4.34 \pm 0.24^{b,C}$	$4.99 \pm 0.28^{ab,C}$
8	$5.92 \pm 0.39^{a,B}$	$5.15 \pm 0.49^{b,B}$	$5.49 \pm 0.43^{ab,B}$	$5.55 \pm 0.14^{ab,B}$	$5.24 \pm 0.45^{b,B}$	$5.65 \pm 0.35^{ab,B}$
10	$6.82 \pm 0.31^{a,A}$	$5.82 \pm 0.40^{d,A}$	$6.37 \pm 0.28^{bc,A}$	$6.40 \pm 0.15^{ab,A}$	$6.00 \pm 0.24^{cd,A}$	$6.24 \pm 0.21^{bcd,A}$

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.23 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวน *E. coli* (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	<1*	<1	<1	<1	<1	<1
2	<1	<1	<1	<1	<1	<1
4	<1	<1	<1	<1	<1	<1
6	<1	<1	<1	<1	<1	<1
8	<1	<1	<1	<1	<1	<1
10	<1	<1	<1	<1	<1	<1

* น้อยกว่า 1 log cfu/g (ต่ำกว่าระดับที่ตรวจนับได้)

4.3.1.2 คุณภาพด้านกายภาพ

(1) ค่าสี (L*a*b*)

จากการวิเคราะห์ค่าความสว่าง (Lightness, L*) พบว่าในวันแรกมีค่าเท่ากับ 46.62, 45.86, 47.91, 48.85, 46.67 และ 46.33 ตามลำดับ โดยกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่าความสว่างน้อยที่สุด ($P<0.05$) และกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 320 Au/ml มีค่าความสว่างสูงที่สุด ($P<0.05$) ในขณะที่กลุ่มอื่นมีค่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ในวันที่ 4 ทุกกลุ่มการทดลองมีค่าความสว่างแตกต่างกันในทางสถิติ ($P<0.05$) ยกเว้นกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml และเมื่อเก็บรักษาเนื้อสุกรบดนานขึ้นเป็นเวลา 10 วัน พบว่าค่าความสว่างมีค่าสูงขึ้น และไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ยกเว้นกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.24

ค่าสีแดง (Redness, a*) ในวันแรกมีค่าเท่ากับ 6.06, 6.80, 7.03, 6.23, 6.65 และ 6.68 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) และเมื่อเก็บรักษาเนื้อสุกรบดนานขึ้นเป็นเวลา 10 วัน พบว่าทุกกลุ่มการทดลองค่าสีแดงมีค่าลดลงในวันที่ 4 ของการเก็บรักษา ($P<0.05$) ยกเว้นกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.25

อย่างไรก็ตามค่าสีเหลือง (Yellowness, b*) ในวันแรกมีค่าเท่ากับ 13.03, 13.39, 15.04, 14.74, 13.95 และ 13.80 ตามลำดับ โดยกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml มีค่าสีเหลืองสูงที่สุดในวันแรกของการเก็บรักษา ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อเก็บรักษาในวันที่ 2, 6 และ 10 พบว่ากลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรมีค่าสีเหลืองต่ำที่สุด และกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml มีค่าสูงที่สุดแตกต่างกันในทางสถิติ ($P<0.05$) และเมื่อเก็บรักษาเนื้อสุกรบดนานขึ้นเป็นเวลา 10 วัน พบว่าค่าสีเหลืองมีค่าลดลง และไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ยกเว้นกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml ค่าสีเหลืองลดลงในวันที่ 2 ของการเก็บรักษา ($P<0.05$) กลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml ค่าสีเหลืองลดลงในวันที่ 6 ของการเก็บรักษา ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.26

จากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ (2546) ทำการศึกษาการใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันธรรมชาติในหมูแผ่น โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่เติม BHT ร้อยละ 0.01 กลุ่มที่เติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงร้อยละ 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.3 สำหรับเปลือกส้มก็ใช้กลุ่มการทดลองเช่นเดียวกันและระดับความเข้มข้นของสารสกัดก็เช่นเดียวกับสารสกัดกระเจี๊ยบแดง เก็บรักษาผลิตภัณฑ์นาน 28 วัน พบว่าหมูแผ่นดิบและสุก

ที่เติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับร้อยละ 0.05–0.1 โดยน้ำหนัก มีค่าสีแดง (a*) ไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม ส่วนค่าความสว่าง (L*) และค่าสีเหลือง (b*) มีค่าการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยซึ่งไม่ได้รายงานค่าไว้ นอกจากนี้ลักษณะของแบคเทอริโอซินที่เติมลงในเนื้อสุกรบดมีลักษณะใส จึงไม่มีผลต่อค่าสี อีกทั้งตัวอย่างเนื้อสุกรบดมีส่วนผสมของไขมันจึงทำให้การสุ่มตัวอย่างไม่สม่ำเสมอจึงทำให้ผลดังกล่าวมีค่าไม่คงที่

(2) ค่าความเป็นกรด-ด่าง

การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ในวันแรกมีค่าเท่ากับ 5.70, 5.49, 5.76, 5.80, 5.59 และ 5.61 ตามลำดับ ในแต่ละกลุ่มการทดลองค่าความเป็นกรด-ด่างไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) และเมื่อเก็บรักษาเนื้อสุกรบดนานขึ้นเป็นเวลา 10 วัน พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าใกล้เคียงกันแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.27 แม้ว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซินจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 3-4 แต่การเติมลงไปเพียงเล็กน้อยในเนื้อสุกรบดไม่ได้ส่งผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง นอกจากนี้ สุภาพ นนทะสันต์ (2556) ที่ทำการศึกษาการประยุกต์ใช้สารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดกลีบดอกกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่ร้อยละ 0.2, 0.4 และ 0.6 พบว่าไม่มีผลกระทบต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง

ตารางที่ 4.24 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อค่าความสว่าง (Lightness, L*) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร+ แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	46.62 ± 0.81 ^{ab,A†,‡,§}	45.86 ± 0.78 ^{b,B}	47.91 ± 1.41 ^{ab,A}	48.85 ± 1.88 ^{a,A}	46.67 ± 0.69 ^{ab,A}	46.33 ± 2.24 ^{ab,A}
2	46.83 ± 1.30 ^{a,A}	47.03 ± 1.69 ^{a,AB}	47.58 ± 2.60 ^{a,A}	48.39 ± 2.10 ^{a,A}	47.41 ± 1.14 ^{a,A}	46.58 ± 1.70 ^{a,A}
4	45.93 ± 1.40 ^{b,A}	46.37 ± 0.93 ^{b,B}	48.80 ± 0.20 ^{a,A}	48.89 ± 1.30 ^{a,A}	47.29 ± 0.36 ^{ab,A}	46.59 ± 0.69 ^{b,A}
6	47.94 ± 1.32 ^{a,A}	47.21 ± 0.81 ^{a,AB}	49.51 ± 1.13 ^{a,A}	48.74 ± 2.52 ^{a,A}	47.66 ± 1.51 ^{a,A}	46.78 ± 1.06 ^{a,A}
8	48.37 ± 2.85 ^{a,A}	49.12 ± 1.45 ^{a,A}	49.42 ± 2.72 ^{a,A}	48.96 ± 2.97 ^{a,A}	48.36 ± 2.23 ^{a,A}	48.53 ± 0.84 ^{a,A}
10	46.94 ± 3.44 ^{a,A}	47.50 ± 2.19 ^{a,AB}	48.47 ± 3.53 ^{a,A}	48.20 ± 3.45 ^{a,A}	47.12 ± 2.74 ^{a,A}	48.34 ± 2.88 ^{a,A}

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.25 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อค่าสีแดง (Redness, a*) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	$6.06 \pm 1.08^{a,AB\dagger,\ddagger,\S}$	$6.80 \pm 0.51^{a,A}$	$7.03 \pm 0.79^{a,A}$	$6.23 \pm 0.52^{a,AB}$	$6.65 \pm 1.01^{a,A}$	$6.68 \pm 0.69^{a,A}$
2	$7.42 \pm 1.97^{a,A}$	$6.18 \pm 0.32^{a,AB}$	$6.69 \pm 1.53^{a,A}$	$7.28 \pm 1.80^{a,A}$	$6.57 \pm 1.71^{a,A}$	$6.60 \pm 1.38^{a,A}$
4	$6.90 \pm 2.40^{a,AB}$	$6.02 \pm 0.93^{a,AB}$	$6.50 \pm 1.66^{a,A}$	$6.59 \pm 1.88^{a,AB}$	$5.94 \pm 1.54^{a,AB}$	$6.53 \pm 1.15^{a,A}$
6	$5.48 \pm 2.00^{a,AB}$	$5.13 \pm 0.83^{a,BC}$	$5.43 \pm 1.54^{a,A}$	$5.59 \pm 1.11^{a,AB}$	$5.14 \pm 1.09^{a,AB}$	$5.21 \pm 1.16^{a,AB}$
8	$3.92 \pm 0.54^{a,B}$	$4.17 \pm 1.29^{a,C}$	$4.52 \pm 0.94^{a,A}$	$4.47 \pm 0.71^{a,B}$	$4.06 \pm 0.86^{a,B}$	$4.07 \pm 1.33^{a,B}$
10	$4.52 \pm 0.78^{a,AB}$	$4.23 \pm 0.29^{a,C}$	$4.63 \pm 0.94^{a,A}$	$4.73 \pm 0.97^{a,B}$	$4.47 \pm 0.27^{a,AB}$	$4.17 \pm 0.63^{a,B}$

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.26 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อค่าสีเหลือง (Yellowness, b*) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร+ แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	$13.03 \pm 1.30^{c,A\dagger,\ddagger,\S}$	$13.39 \pm 0.57^{bc,A}$	$15.04 \pm 0.27^{a,A}$	$14.74 \pm 0.48^{ab,A}$	$13.95 \pm 0.97^{abc,A}$	$13.80 \pm 0.53^{abc,A}$
2	$14.16 \pm 0.87^{a,A}$	$12.59 \pm 0.17^{b,AB}$	$13.91 \pm 0.94^{ab,AB}$	$14.80 \pm 0.71^{a,A}$	$13.79 \pm 0.53^{ab,A}$	$13.66 \pm 0.98^{ab,A}$
4	$13.86 \pm 1.65^{a,A}$	$12.87 \pm 0.60^{a,AB}$	$14.42 \pm 0.50^{a,AB}$	$14.45 \pm 1.02^{a,A}$	$13.26 \pm 1.13^{a,A}$	$13.52 \pm 0.50^{a,A}$
6	$13.60 \pm 0.81^{ab,A}$	$12.37 \pm 0.60^{b,AB}$	$13.83 \pm 1.14^{a,AB}$	$13.62 \pm 0.31^{ab,AB}$	$12.80 \pm 0.51^{ab,A}$	$12.87 \pm 0.45^{ab,A}$
8	$12.81 \pm 1.36^{a,A}$	$12.37 \pm 0.99^{a,AB}$	$13.97 \pm 1.46^{a,AB}$	$13.25 \pm 1.65^{a,AB}$	$12.52 \pm 1.25^{a,A}$	$12.35 \pm 1.74^{a,A}$
10	$12.30 \pm 0.11^{ab,A}$	$11.99 \pm 0.39^{b,B}$	$13.13 \pm 0.88^{a,B}$	$12.55 \pm 0.38^{ab,B}$	$12.22 \pm 0.77^{ab,A}$	$12.41 \pm 0.22^{ab,A}$

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.27 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร+ แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	$5.70 \pm 0.26^{a,A\dagger,\ddagger,\S}$	$5.49 \pm 0.29^{a,A}$	$5.76 \pm 0.22^{a,A}$	$5.80 \pm 0.21^{a,A}$	$5.59 \pm 0.24^{a,A}$	$5.61 \pm 0.23^{a,A}$
2	$5.73 \pm 0.20^{a,A}$	$5.55 \pm 0.14^{a,A}$	$5.78 \pm 0.16^{a,A}$	$5.78 \pm 0.20^{a,A}$	$5.61 \pm 0.19^{a,A}$	$5.62 \pm 0.18^{a,A}$
4	$5.83 \pm 0.28^{a,A}$	$5.58 \pm 0.25^{a,A}$	$5.86 \pm 0.26^{a,A}$	$5.87 \pm 0.29^{a,A}$	$5.73 \pm 0.25^{a,A}$	$5.69 \pm 0.27^{a,A}$
6	$5.76 \pm 0.20^{a,A}$	$5.51 \pm 0.24^{a,A}$	$5.80 \pm 0.25^{a,A}$	$5.84 \pm 0.23^{a,A}$	$5.66 \pm 0.22^{a,A}$	$5.64 \pm 0.23^{a,A}$
8	$5.85 \pm 0.12^{a,A}$	$5.51 \pm 0.18^{a,A}$	$5.78 \pm 0.17^{a,A}$	$5.82 \pm 0.14^{a,A}$	$5.58 \pm 0.13^{a,A}$	$5.63 \pm 0.17^{a,A}$
10	$6.10 \pm 0.26^{a,A}$	$5.69 \pm 0.35^{a,A}$	$6.01 \pm 0.44^{a,A}$	$6.12 \pm 0.35^{a,A}$	$5.83 \pm 0.41^{a,A}$	$5.82 \pm 0.46^{a,A}$

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.3.2 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในเนื้อสุกรบดแช่แข็ง

วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (1,1-Diphenyl-2 picrylhydrazyl) พบว่ากลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันมีค่าการกำจัดอนุมูลอิสระสูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) โดยกลุ่มที่เติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่าการกำจัดอนุมูลอิสระมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml และกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml และเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่าพบว่ากลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันมีค่าการกำจัดอนุมูลอิสระคงที่ตลอดอายุการเก็บรักษา ($P>0.05$) ยกเว้นกลุ่มควบคุมที่มีค่า DPPH ลดลงเมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับการการศึกษาเบื้องต้นพบว่า เนื้อสุกรบดที่เติม BHT ร้อยละ 0.02 มีค่าการกำจัดอนุมูลอิสระเพียง 48.71 ดังแสดงในตารางที่ 4.28

สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่นำมาศึกษาครั้งนี้มีปริมาณฟีอลิกทั้งหมด 675.80 มิลลิกรัมแกลลิกต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม นอกจากนี้ยังมีค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระเท่ากับ 937.20 ppm กลไกการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เกิดจากการรับอิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH ของสารจำพวกฟีนอล ซึ่งจะได้เป็นสาร DPPH ที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระอีกต่อไป ทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระหยุดลง (บุหรัน พันธุ์สวรรค์. 2556) ค่าการกำจัดอนุมูลอิสระ (DPPH) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้วิเคราะห์ค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ เป็นค่าที่บอกถึงศักยภาพของสารต้านอนุมูลอิสระ หรือพืชที่ใช้ หากมีค่าสูงหมายความว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง (วิไลพร ปองเพียร. 2550) Mohd-Esa *et al.* (2010) ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในส่วนต่างๆของกระเจี๊ยบแดง (กลีบดอก ใบ เมล็ดและลำต้น) สกัดด้วยน้ำและเอทานอลร้อยละ 80 โดยทำการศึกษาสารประกอบฟีโนลิก ค่า DPPH และนำผลที่ได้ไปศึกษาการต้านออกซิเดชันของไขมันในเนื้อวัวบด (Lipid oxidation) เมื่อเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน ผลการศึกษาพบว่า ส่วนของเมล็ดที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลร้อยละ 80 มีค่าฟีโนลิก สูงที่สุด (2.97 ± 0.17 mg GAE /g และ 4.87 ± 0.14 mg GAE /g) มีค่า DPPH สูงที่สุด คือร้อยละ 65.1 ± 2.58 และ 91.8 ± 1.05 เนื่องจากในส่วนของเมล็ดมีปริมาณค่าฟีโนลิกและการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าทุกๆส่วน สุภาพ นนทะสันต์ (2556) ทำการศึกษาการประยุกต์ใช้สารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเพื่อศึกษาผลของการเติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยเอทานอลปริมาณต่างๆ ได้แก่ร้อยละ 0.2, 0.4 และ 0.6 และศึกษาผลต่อคุณภาพทางด้านเคมี ได้แก่ ปริมาณ

แอนโทไซยานิน ค่า DPPH (2,2-Diphenyl-I-Picrylhydrazyl, ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ) ผลการศึกษาพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น ปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นเป็น 4.34, 8.90 และ 14.64 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 12.57, 24.24 และ 31.24 ตามลำดับ เนื่องจากคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงของแอนโธไซยานินซึ่งมีอยู่ในสารสกัดที่เติมลงไป อีกทั้ง Christian and Jackson (2009) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของกระเจี๊ยบ 3 ช่วงการเจริญเติบโตตลอดระยะเวลา 35 วัน (traditional bearing red:TRED, early bearing red:ERED และ white:WHTE) โดยศึกษาสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณแอนโธไซยานินและการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) พบว่าในกระเจี๊ยบในช่วง ERED มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด (ร้อยละ 79) เนื่องมาจากสารประกอบพวกฟีนอลิก รวมทั้งสารแอนโทไซยานินและสารที่ไม่ใช่แอนโทไซยานิน และหากนำไปใช้ร่วมกับ BHA จะทำให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากถึงร้อยละ 86

ตารางที่ 4.28 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของเนื้อสุกรบดแช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (เดือน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	15.85 ± 1.05 ^{c,A†,‡,§}	94.77 ± 0.71 ^{a,A}	20.11 ± 0.95 ^{d,C}	19.71 ± 1.56 ^{d,B}	76.85 ± 0.13 ^{b,A}	70.73 ± 0.34 ^{c,B}
1	15.29 ± 1.59 ^{c,AB}	92.70 ± 1.92 ^{a,A}	22.35 ± 0.88 ^{d,A}	22.44 ± 0.22 ^{d,A}	66.24 ± 0.97 ^{c,C}	72.26 ± 0.21 ^{b,A}
2	14.74 ± 0.64 ^{d,AB}	93.21 ± 1.44 ^{a,A}	21.75 ± 1.08 ^{c,AB}	20.47 ± 0.33 ^{c,B}	72.14 ± 0.01 ^{b,B}	71.00 ± 0.93 ^{b,B}
3	11.65 ± 0.38 ^{d,C}	93.74 ± 1.62 ^{a,A}	20.92 ± 0.23 ^{c,ABC}	20.81 ± 0.54 ^{c,AB}	70.72 ± 1.43 ^{c,E}	70.81 ± 0.17 ^{b,B}
4	13.59 ± 1.11 ^{c,B}	93.83 ± 0.17 ^{a,A}	20.59 ± 0.13 ^{d,BC}	21.01 ± 1.26 ^{d,AB}	70.68 ± 0.40 ^{c,B}	72.86 ± 0.10 ^{b,A}

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาอัตราส่วนของสารสกัด (เอทานอล:น้ำ) ที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) และคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สารสกัดน้ำจากใบมะยม และการใช้สารสกัดหยาบเพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ ของเนื้อสุกรบดที่ผสมสารสกัดน้ำจากใบมะยมโดยการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 วัน และ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ โดยการใช้อัตราส่วนสารสกัดเอทานอลต่อน้ำ ในอัตราส่วนผสมที่แตกต่างกัน คือ 0%, 25%, 50%, 75% และ 100% ตามลำดับ ซึ่งส่งผลต่อปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้ ปริมาณสารฟีโนลิคและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด จากผลการทดลองพบว่า น้ำบริสุทธิ์สามารถสกัดสารสกัดหยาบจากใบมะยมในปริมาณที่สูงสุด ซึ่งปริมาณสารสกัดหยาบจากมะยมที่สกัดได้จะลดลงตามอัตราส่วนของเอทานอลที่เพิ่มขึ้น ปริมาณสารสกัดหยาบจากใบมะยมที่สกัดด้วยน้ำบริสุทธิ์มีค่า เท่ากับ 2.80 กรัมต่อ 100 กรัมใบแห้ง และสารสกัดหยาบจากใบมะยมที่สกัดด้วยเอทานอลบริสุทธิ์มีค่า เท่ากับ 0.53 กรัมต่อ 100 กรัมใบแห้ง โดยปริมาณสารฟีโนลิคทั้งหมดของสารสกัดจากใบมะยม ให้ค่าอยู่ในช่วง 48.04 ถึง 49.87 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิคต่อสารสกัดหยาบ 1 กรัม ส่วนปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากการสกัดใบมะยมและผลมะนาวโห่ มีค่าอยู่ในช่วง 0.51 ถึง 0.70 มิลลิกรัมสมมูลย์เคอร์ซิตินต่อสารสกัดหยาบ 1 กรัม และ 0.11 ถึง 0.17 มิลลิกรัมสมมูลย์เคอร์ซิตินต่อสารสกัดหยาบ 1 กรัม ตามลำดับ และไม่พบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์จากสารสกัดที่ได้จากใบมะยม เมื่อทำการพิจารณาความชอบของผู้บริโภค โดยการใช้สารสกัดน้ำจากใบมะยม (PWCE) ผสมในเนื้อสุกรบด แบ่งการทดลองเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม (เนื้อสุกรบดไม่เติมสารสกัด) เนื้อสุกรบดที่เติมสาร BHT (0.2 g/kg meat) เนื้อสุกรที่เติม PWCE (2.5 g/kg meat) และเนื้อสุกรที่เติม PWCE (5 g/kg meat) และทำการศึกษาค่าต่างๆในแต่ละวิธี คือ DPPH scavenging radical activity, ABTS radical cation decolorization, reducing power, TBARS, pH, ค่าสี (CIE L*, a*, b*) และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์/รา แบคทีเรียที่เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ โคลิฟอร์ม ในเนื้อสุกรบด โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 0, 2, 4, 6 และ 8 วัน ผลการทดลองพบว่า ค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ reducing power ในเนื้อสุกรบดที่เติมสารสกัดจากใบมะยมทั้งในเนื้อทั้งที่ไม่สุกและเนื้อที่ให้สุกสุก ให้ค่าที่สูงกว่าตัวอย่างในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมสาร BHT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าการออกซิเดชั่นของไขมันในเนื้อสุกรบดไม่แตกต่างกันทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการเติมสารสกัด อย่างไรก็ตามพบว่า ค่าการออกซิเดชั่นของไขมันในเนื้อสุกที่เติมสารสกัดทั้งสองชนิดมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมสาร BHT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่าเนื้อสุกรบดกลุ่มที่เติมสารสกัดมีค่าสีแดงสูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดลองที่ 2 ศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบ ร่วมกับสารแบคเทอริโอซิน Nisin A และสารแบคเทอริโอซิน KL-1 ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium ผลการศึกษาพบว่าการใช้สารสกัดน้ำจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ร่วมกับสารแบคเทอริโอซิน Nisin A และสารแบคเทอริโอซิน KL-1 มีคุณสมบัติในการเสริมฤทธิ์กันบางส่วนในการทำลายเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิดที่ทดสอบในทำนองเดียวกันกับสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงร่วมกับสารแบคเทอริโอซิน พบว่ามีคุณสมบัติเสริมฤทธิ์กันในการทำลายเชื้อก่อโรคทั้งสองชนิดที่ใช้ทดสอบ

การทดลองที่ 3 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด โดยทำการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพสำหรับตัวอย่างเนื้อสุกรแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส พบว่าทุกกลุ่มการทดลองที่มีเติมสารสกัดน้ำจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซินสามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์รา และ Coliform แต่ไม่สามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำได้ ค่าสีของกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่าความสว่างต่ำที่สุด ส่วนค่าสีแดงในทุกกลุ่มการทดลองไม่มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และค่าสีเหลืองกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่าสีเหลืองต่ำที่สุด และกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน 640 AU/ml มีค่าสีเหลืองสูงที่สุด สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันในทางสถิติตลอดจนระยะเวลาการเก็บรักษา($P<0.05$) สำหรับการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในเนื้อสุกรบดแช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เก็บรักษานาน 4 เดือน พบว่าทุกกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติมสารสกัด โดยกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่าการกำจัดอนุมูลอิสระสูงสุดโดยมีค่าที่ร้อยละ 92-97 แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

บรรณานุกรม

คมแข พิลาสมบัติ และมณทินี ธีรารักษ์. 2557. **การใช้สารสกัดพืชพื้นเมืองไทยในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เพื่อเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ยืดอายุการเก็บรักษา และความปลอดภัยในการบริโภค.** รายงานการวิจัย. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นิพัฒน์ ลิ้มสงวน. 2547. **การศึกษากระบวนการสกัด คุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ และสารต้านอนุมูลอิสระของคาเทชินจากชาเขียวของไทย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยศิลปากร. กรุงเทพมหานคร.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. 2556. "อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ." **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** 21(3) : 275-286.

ผุสดี ตังวัชรินทร์, วิภา รักษ์ทอง และธัญพิสิษฐ์ พรหมศิริวรกุล. 2553. "อิทธิพลของกรดแอสคอร์บิกและความเย็นต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Salmonella* Rissen ในเนื้อสันนอกสุกร." **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า.** 28(3) : 44-51.

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์. 2546. **การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันธรรมชาติในหมูแผ่น.** รายงานการวิจัย. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.

พรพิมล กิจวิชา. 2558. **การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยของเชื้อเห็ดตับเต่า.** ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะศิลปศาสตร์ และวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิไลพร ปองเพียร. 2552. **ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานิน และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในพืชพื้นบ้านที่มีสีม่วงแดง.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตรศึกษา (เคมี) บัณฑิตศึกษา, มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.

วชิราภรณ์ ผิวล่อง, สุรศักดิ์ สัจจบุตร, ศิริลักษณ์ สิงห์เพชร และ จารุรัตน์ เอี่ยมศิริ. 2556. "อิทธิพลของระยะเวลาสุกต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของมะม่วงหาวมะนาวโห่." **วิทยาศาสตร์เกษตร.** 44 (2) : 337-340.

ศุภร อังศุจินดา. 2549. **สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง เปลือก และเมล็ดส้มเขียวหวาน.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สารานุกรมสมุนไพร. 2543. **สมุนไพรสวนสิรีรุกขชาติ.** ภาควิชาเภสัชพฤกศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพมหานคร : อมรินทร์พริ้นพับลิชชิ่ง.

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อินทิราเพชรทับทิม และ เกษม สร้อยทอง. 2555. ความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Beauvericin และสารสกัดหยาบที่ได้จาก เชื้อราสกุล *Beauveria* sp. วารสารวิจัยราชภัฏพระนคร. 7(1) : 35-43.

สุภาพ นนทะสันต์. 2556. "การประยุกต์ใช้สารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต." วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. หน้า 627-636. ใน **การประชุมทางวิชาการ "มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ครั้งที่ 9.** มหาสารคาม : มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** กรุงเทพฯ : จามจุรีโปรดักท์.

สกุลกานต์ สิมลา, สุรศักดิ์ บุญแต่ง และ พัชรี สิริตระกูลศักดิ์. 2556. "การประเมินปริมาณสารพฤษเคมี บางประการและกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระใน *Carissa carandas* L." แก่นเกษตร. 41 (1) : 602-606.

วีรสิงห์ เมืองมั่น. 2522 "การใช้สมุนไพรการรักษาโรคนิ่วและทางเดินปัสสาวะอักเสบ." **วารสารรามาธิบดี.** 10 : 62-63.

อดิศักดิ์ จูมวงษ์. 2557. "ผลของความแก่ต่อคุณภาพทางกายภาพและเคมีของผลหนามแดง." **วิทยาศาสตร์เกษตร.** 45 (3) : 229-232.

อัฐญาพร ชัยชมพู และ นฤมล ทองไว. 2554. **"การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดโดยใช้สารสกัดสมุนไพรพื้นบ้าน".** ใน การประชุมวิชาการครั้งที่ 8 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน.

AOAC. 2005. Chapter 17 AOAC Official Method 940. 36B. p. 2. In Horwitz, W. and Latimer, G.W. **Official methods of analysis of AOAC International.** Maryland.

AOAC. 2006. Chapter 17 AOAC Official Method 966. 23c-24. p. 5-6. In Horwitz, W. and Latimer, G.W. **Official methods of analysis of AOAC international.** Maryland.

Abee, T. 1995. "Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms." **FEMS Microbiol. Lett.** 129 : 1-10.

Almajano, M.P., Rosa, C.J., Angel, L.J. and Michael, H.G. 2008. "Antioxidant and antimicrobial activity of tea infusions." **Food Chem.** 108 : 55-63.

Ahmed, Z.S. and Abozed, S.S. 2015. "Functional and antioxidant properties of novel snack crackers in corporated with *Hibiscus sabdariffa* by-product." **J. Adv. Res.** 6 : 79-87.

Ahn, T., Ryu, S. and Han, I. 2007. "The impact of Web quality and playfulness on user acceptance of online retailing." **Info. Mana.** 44: 263–275

Awe, F.B., Fagbemi, T.N., Ifesan, B.O.T. and Badejo, A A. 2013. "Antioxidant properties of cold and hot water extracts of cocoa, Hibiscus flower extract, and ginger beverage blends." **Food Res. Int.** 52 : 490-495.

Babatunde, O. A. and Adewumi, A. O. 2015. "Effects of ethanolic extract of garlic, roselle and ginger on quality attributes of chicken patties." **Afr. J. Biotechnol.** Vol. 14 : 688-694.

BAM. 2001. Bacteriological Analytical Manual online, Chapter 12 on *Staphylococcus aureus*. U.S. Food and Drug Administration. January2001. http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/Laboratory Methods/Bacteriological. Analytical Manual BAM. [สืบค้นวันที่ 15 ธันวาคม 2557]

BAM. 2014. Bacteriological Analytic Manual Online. Salmonella. U.S. Food and Drug Administration. [Online]. Available: http://www.fda.gov/Food/Food ScienceResearch/ Laboratory Methods/ucm070149.htm. [สืบค้นวันที่ 15 ธันวาคม 2557]

Bruno, M.E.E. and Montville, T.J. 1993. "Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria." **Appl. Environ. Microbiol.** 59 : 3003-3010.

Bint-e-Sadek, Y., Choudhry, N. and Shahriar, M. 2013. "Biological Investigations of the leaf extracts of *Carissa Carandas*." **Res. Sci. Press.** 5 : 97-105.

Buege, J.A and Aust, S.D. 1987. "Microsomal lipid peroxidation." **Methods Enzymol.** 52 : 302–310.

Carpenter, R., O'Grady, M.N., O'Callaghan, Y.C., O'Brien, M.N. and Kerry, J.P. 2007. "Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork." **Meat Sci.** 76 : 604-610.

Chakraborty, R., Biplab, D., Devanna, N. and Sen, S. 2012. "Antiinflammatory, antinociceptive and antioxidant activities of *Phyllanthus acidus* L. extracts." **Asian Pac. J. Trop. Biomed.** 2 : 953–961.

Christian, K.R. and Jackson, J.C. 2009. "Changes in total phenolic and monomeric anthocyanin composition andantioxidant activity of three varieties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) during maturity." **J. Food Compos. Analy.** 22 : 663-667.

Chumyam, A., Whangchai, K., Jungklang, J., Faiyue, B. and Saengnil, K. 2013. "Effects of heat treatments on antioxidant capacity and total phenolic content of four cultivars of purple skin eggplants." **Science Asia. 39 : 246–251.**

Coutinho de Oliveira, T.L., Malfitano de Carvalho, S., de Araújo Soares, R., Andrade, M.A., Cardoso, M.D.G., Ramos, E.M. and Piccoli, R.H. 2012. "Antioxidant effects of *Satureja montana* L.

essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite." **LWT - Food Sci. Technol. 45 : 204–212.**

Davidson, P.M. and Hoover, D.G. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 127-160. In S. Salminen and A. von Wright, eds. **Lactic Acid Bacteria.** Marcel Dekker, Inc., New York.

Diliello, L.R. 1982. **Method in food and dairy microbiology.** The Avi Pubish Company. Connecticut. Ennahar, S., Sashihara, T. Sonomoto, K. And Ishizaki, A. 2000. "Class IIa bacteriocins : biosynthesis, structure and activity." **FEMS Microbiol. Rev.** 24 : 85-106.

Fernandes, A., Sousa Pinheiro, L., Souto Pereira, C., Neves Matias, W., Albuquerque Gomes, R., Souza Chaves, O., Vanderlei de Souza, M., Nóbrega de Almeida, R. and Simões de Assis, T. 2012. "Total phenolic content and antioxidant activity of some malvaceae family species." **Antioxidants 1 : 33–43.**

Fullerton, M., Khatiwada, J., Johnson, J.U., Davis, S. and Williams, L.L. 2011. "Determination of Antimicrobial Activity of Sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) on *Esherichia coli* O157:H7 Isolated from Food, Veterinary, and Clinical Samples." **J. Med. Food.** 14 : 950-956.

Gupta, P., Sharma, A. and Verma, A.K. 2012. "GC/MS profiling and antimicrobial effect of six Indian tropical fruit residues against clinically pathogenic bacterial strain." **Int. J. Adv. Pharm. Res.** 3 : 1229-1235.

Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S. and Aruoma, O.I. 1987. "Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 35 : 7-20.

Hernandez-Hernandez, E., Ponce-Alquicira, E., Jaramillo-Flores, M.E. and Guerrero Legarreta, I. 2009. "Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters." **Meat Sci. 81 : 410–417.**

Huang, B., He, J., Ban, X., Zeng, H., Yao, X. and Wang, Y. 2011. "Antioxidant activity of bovine and porcine meat treated with extracts from edible lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome knot and leaf." **Meat Sci. 87 : 46–53.**

Jazani, N.H., Shahabi, S.H., Ali, A.A. and Zartoshti, M. 2007. "Antibacterial effects of water soluble green tea extracts on multi-antibiotic resistant isolate of *Acinetobacter* sp." **Pak. J. Biol. Sci.** 10 : 1477-1780.

Jain, N.K. and Singhai, A.K. 2011. "Protective effects of *Phyllanthus acidus* L. Skeels leaf extracts on acetaminophen and thioacetamide induced hepatic injuries in Wistar rats." **Asian Pac. J. Trop.**

Med. 4 : 470–474.

Karre, L., Lopez, K. and Getty, K. J.K. 2013. "Natural antioxidants in meat and poultry products." **Meat Sci.** 94 : 220-227.

Khalaphallah, R. and Soliman, W. S. 2014. "Effect of henna and roselle extracts on pathogenic bacteria." **Asian. Pac. J. Trop. Dis.** 4 : 292-296.

Klaenhammer, T.R. 1993. "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria." **FEMS Microbiol. Rev.** 12 : 39-85.

Kim, S.J., Cho, A.R. and Han, J. 2013a. "Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation." **Food Control. 29 : 112–120.**

Kumar, S., Gupta, P. and Gupta K.L, V. 2013. "A critical review on Karamarda (*Carissa carandas* Linn.)." **Int. J. Pharm. Biol. Sci. Arch.** 4 : 637-642.

Maheshwari, R., Sharma, A. and Verma, D. 2012. "Phyto-therapeutic significance of Karaunda." **Bull. Env. Phamacol. Life Sci.** 1 : 34-36.

Mohd-Esa, N., Hern, F.S., Ismail, A. and Yee, C.L. 2010. "Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extractsand potential exploitation of the seeds." **Food Chem.** 122 : 1055–1060.

Muyanja, C.M.B.K., Narvhus, J.A., Treimo, J. and Langsrud, T. 2002. "Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria from busherra: a Ugandan traditional fermented beverage." **Int. J. Food Microbiol.** 80 : 201-210.

Misha, C.K., Shrivastava, B. and Sasmal, D. 2013. "Pharmacognostical standardization and phytochemical identification of fruit and root of *Carissa carandas* Linn." **Int. J. Pharm. Sci.** 5 : 346-350.

Min, B.R., Nam, K.C., Cordray, J.C. and Ahn, D.U. 2008. "Factors affecting oxidative stability of pork, beef, and chicken meat." **Iowa State Univ. Anim. Ind. Rep.** 654 : 1–5.

Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M. and Hara, Y. 1996. "Scavenging effect of tea catechins and their devivatives on 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical." **Free Radical Biol. Med.** 21 : 895-902.

Naveena, B., Sen, A., Vaithiyanathan, R., Babja, S., Babja, Y. and Kondiah, N. 2008. "Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties." **Meat Sci.** 80 : 1304-1308.

Perez, C., Paul, M. and Bazerque, P. 1990. "Antibiotic assay by agar-well diffusion method." **Acta Biol Med Exp.** 15 : 113-115.

Qwele, K., Hugo, A., Oyedemi, S.O., Moyo, B., Masika, P.J. and Muchenje, V. 2013. "Chemical composition, fatty acid content and antioxidant potential of meat from goats supplemented with Moringa (*Moringa oleifera*) leaves, sunflower cake and grass hay." **Meat Sci.** 93 : 455-462.

Rahman, Md. M., Habib, Md. R., Hasan, S. M. R., Sayeed, M. A. and Rana, S. 2011. "Antibacterial, cytotoxic and antioxidant potential of methanolic extract of *Phylianthus acidus* L." **Int. J. Drug Dev. Res.** 3(2): 145-161.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." Free Radic. **Biol. Med.** 26 : 1231–1237.

Rodríguez, J.M., Martinez, M.I., Horn, N. and Dodd, H.M. 2003. "Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria." **Int. J. Food Microbiol.** 81 : 101-116.

Salar, R.K. and Dhall, A. 2010. "Antimicrobial and free radical scavenging activity of extracts of some Indian medicinal plants." **J. Med. Plant Res.** 4 : 2313-1320.

Sebranek, S.G., Sewalt, V.J.H., Robbins, K.L. and Houser, T.A. 2005. "Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage." **Meat Sci.** 69 : 289–296.

Shahidi, F., & Hong, C. 1991. Evaluation of malonaldehyde as a marker of oxidative rancidity in meat products. **J. Food. Bioc.** 15: 97-105.

Siddiqi, R., Naz, S., Ahmad, S. and Sayeed, S.A. 2011. "Antimicrobial activity of the polyphenolic fractions derived from *Grewia asiatica, Eugenia jambolana* and *Carissa carandas.*" **Int. J. Food Sci.** 46 : 250-256.

Singh, A. and Uppal, G.K. 2015. "A review on *Carissa carandas* – phytochemistry, ethno-pharmacology, and micropropagation as conseravation strategy." **Asian J. Pharm. Clin. Res.** 8 : 26-30.

Somaatmadja, D., Powers, J.J. and Hamdy, M.K. 1964. "Anthocyanins. VI. Chelation studies on anthocyanins and other related compounds." **J. Food Sci.** 29 : 655-660.

Soubra, L., Sarkis, D. Hilan, C. and Verger, P.H.. 2007. "Dietary exposure of children and teenagers to benzoates, sulphites, butylhydroxyanisol (BHA) and butylhydroxytoluen (BHT) in Beirut (Lebanon)." **Regul. Toxicol. Pharm.** 47 : 68–77.

Tangwatcharin, P., Chanthachum, S., Khopaibool, P. and Griffiths, M.W. 2006. "Morphological and physiological responses of *Campylobacter jejuni* to stress." **J. Food Prot.** 69 : 2747-2753.

Tolulope, O.M. 2007. "Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*." **J. Med. Plants Res.** 1 : 9-13.

Tongnuanchan, P., Benjakul, S. and Prodpran, T. 2013. "Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils." **J. Food Eng.** 117 : 350–360.

Turgis, M., Dang Vu, K. Dupont, C. and Lacroix, M. 2012. "Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria." **Food Res. Int.** 48 : 696-702.

Vijayalakshmi, M and Ruckmani, K. 2016. "Ferric reducing anti-oxidant power assay in plant extract." **Bangladesh J. Pharmacol.** 11: 570-572.

Yang, L., Gou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F. Zhang, B. and Wu, X. 2012. "Antioxidant capacity of extracts from calyx fruits of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)." **Afr. J. Biotechnol.** 11 : 4063-4068.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

การประเมินความพึงพอใจต่อเนื้อสุกรบดที่เสริมสารสกัดจากใบมะยม

วันที่.....

ลำดับที่.....

<u>ตอนที่ 1</u> รายละเอียดของผู้ประเมิน

1.1 เพศ O ชาย O หญิง

1.2 กรุณาระบุช่วงอายุของท่าน

O ต่ำกว่า 20 ปี O 20 - 35 ปี O 36 - 50 ปี O สูงกว่า 50 ปี

1.3 รายได้ของท่านต่อเดือน O น้อยกว่า 5,000 บาท O 5,001 - 15,000 บาท

O 15,001 - 25,000 บาท O มากกว่า 25,000 บาท

1.4 อาชีพ O นักเรียน นักศึกษา O รับราชการ พนักงานของรัฐ

O บริษัทเอกชน O ทำงานส่วนตัว

O อื่น ๆ โปรดระบุ.....

คุณชอบรับประทานเนื้อสุกรบดหรือไม่

O ไม่ชอบมาก O ไม่ชอบ O ไม่ค่อยชอบ O เฉยๆ

O ค่อนข้างชอบ O ชอบ O ชอบมาก

🍸 กรุณากลั้วปากด้วยน้ำดื่มก่อนชิมตัวอย่างแรก

🍸 ก่อนชิมตัวอย่างถัดไป กรุณาทานแครกเกอร์เล็กน้อย ตามด้วยการกลั้วปากด้วยน้ำดื่มอีกเล็กน้อย (ท่านสามารถบ้วนทิ้งลงในถ้วยสูงที่เตรียมไว้ให้)

<u>ตอนที่ 2</u> กรุณาให้คะแนนระดับความชอบของท่าน (จาก 1 ถึง 7 คะแนน) ที่มีต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ท่านกำลังทดสอบชิมทีละตัวอย่าง โดยกรอกคะแนนลงให้ตรงกับรหัสตัวอย่างในตารางด้านล่าง

คะแนน		ระดับความชอบ
7	=	ชอบมากที่สุด
6	=	ชอบมาก
5	=	ชอบ
4	=	เฉยๆ
3	=	ไม่ชอบ
2	=	ไม่ชอบมาก
1	=	ไม่ชอบมากที่สุด

ลักษณะของผลิตภัณฑ์	รหัสผลิตภัณฑ์		
Overall appearance			
Color			
Odor			
Texture			
Flavor			
Overall quality			

ความคิดเห็นเพิ่มเติม

.....

.....

.....ขอบคุณที่กรุณาสละเวลาอันมีค่า ☺

T147852