# สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง เปลือก และเมล็ดส้มเขียวหวาน

# ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF EXTRACTS FROM ROSELLE (*Hibiscus subdariffa* Linn.), PEEL AND SEED OF TANGERINE (*Citrus reticulate* Blanco)


ศุภร อังศุจินดา

SUPORN ANGSUJINDA


วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549


ISBN 974-15-2478-1

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

# สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง เปลือก และเมล็ดส้มเขียวหวาน

# ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF EXTRACTS FROM ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), PEEL AND SEED OF TANGERINE (*Citrus reticulate* Blanco)

ศุภร อังศุจินดา

SUPORN ANGSUJINDA

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....63253
วัน,เดือน,ปี.....25 ส.ค. 2549

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2549

ISBN 974-15-2478-1

# ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF EXTRACTS FROM ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), PEEL AND SEED OF TANGERINE (*Citrus reticulate* Blanco)

SUPORN ANGSUJINDA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FUILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FOOD SCIENCE

SHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2006

ISBN 974-15-2478-1

**COPYRIGHT 2006**

**SCHOOL OF GRADUATE STUDIES**

**KING MONGKUT'S INTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

| | |
|---|---|
| **หัวข้อวิทยานิพนธ์** | สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน |
| **นักศึกษา** | นางสาวศุภร อังศุจินดา |
| **รหัสประจำตัว** | 45067010 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต |
| **สาขาวิชา** | วิทยาศาสตร์การอาหาร |
| **พ.ศ.** | 2549 |
| **อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์** | ผศ.ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม |
| **อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม** | ผศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ |

# บทคัดย่อ


จากการศึกษาสมบัติการต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง (Roselle extract, RE) เปลือกส้มเขียวหวาน (Tangerine peel extract, TPE) และเมล็ดส้มเขียวหวาน (Tangerine seed extract, TSE) ต่อแบคทีเรียแกรมบวก 4 สายพันธุ์ (*Staph. aureus* , *L. innocua* , *Lb. plantarum* และ *P. pentosaceus*) และแบคทีเรียแกรมลบ 2 สายพันธุ์ (*E. coli* และ *S.* Anatum) ด้วยวิธีให้สารที่ทดสอบแพร่ซึมในอาหารวุ้น (agar well diffusion method) พบว่า RE มีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของเชื้อทดสอบมากที่สุดและมีขอบข่ายการออกฤทธิ์กว้าง (broad spectrum) RE ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถต้าน *L. innocua* ได้เพียงชนิดเดียว RE 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ผลการต้าน *Staph. aureus* และ *L. innocua* และ RE > 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ทั้งหมด แต่ไม่มีผลการต้านการเจริญของแบคทีเรียแลกติก ยกเว้นที่ RE >150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับ TPEให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกเพียงสายพันธุ์เดียวคือ *Staph. aureus* สำหรับ TSE ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทุกสายพันธุ์ เมื่อศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทรีย์ (minimum bactericidal concentration, MBC ) ของRE ต่อแบคทีเรียที่ก่อความเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก พบว่า ค่า MIC ต่อเชื้อ *E. coli* และ *L. innocua* คือ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และวิถีการออกฤทธิ์เป็นแบบยับยั้งการเจริญของเชื้อ (bacteriostatic) แต่สำหรับความเข้มข้นเดียวกันนี้จะเป็นค่า MBC ที่มีผลต่อ *Staph. aureus* และ *S.* Anatum ซึ่งเป็นวิถีการออกฤทธิ์แบบทำลายเชื้อ (bactericide) เมื่อนำ RE มาทดสอบในสภาวะอาหารเหลวที่เป็นแบบจำลองของแหนม (NMB) ต่อ *Staph. aureus* พบว่า RE 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่มีผลในการทำลายเชื้อ

| | |
|---|---|
| **Thesis Title** | Antimicrobial Properties of Extracts from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), Peel and Seed of Tangerine (*Citrus reticulate* Blanco) |
| **Student** | Miss Suporn Angsujinda |
| **Student ID.** | 45067010 |
| **Degee** | Master of Science |
| **Programme** | Food Science |
| **Year** | 2006 |
| **Thesis advisser** | Assistant Professor Dr.Praphan Pinsirodom |
| **Thesis coadvisser** | Assistant Professor Dr.Adisorn Swetwiwathana |

## ABSTRACT

Antimicrobial properties of Roselle (RE), Tangerine peel (TPE) and Tangerine seed (TSE) extracts were investigated against four strains of gram-positive bacteria (*Staph. aureus, L. innocua , Lb. plantarum* and *P. pentosaceus*) and two strains of gram-negative bacteria (*E. coli* and *S.* Anatum) using agar well diffusion method. RE was the most efficient in inhibition of the growth of tested bacteria with broadspectrum of activity. RE at 25 mg/ml show the inhibitory effects against only *L. innocua*, while at 50 mg/ml inhibited *Staph. aureus* and *L. innocua*. RE at > 50 mg/ml could inhibit both gram-positive and gram-negative pathogenic bacteria tested, accepted for lactic acid bacteria (LAB) which were not inhibited until the concentration of RE was 150 mg/ml. TPE showed weak inhibition against only *Staph. aureus*, while TSE exhibited no antimicrobial activity against all the tested indicator strains. Further studies were done for RE on minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against the four stains of pathogenic bacteria. It was found that, the MIC for *E. coli.* and *L. innocua* were 12.5 mg/ml with bacteriostatic effect. At the same concentration, RE exhibited MBC with bactericidal effect on *Staph. aureus* and *S.* Anatum. The RE was then tested for its antimicrobial activity against *Staph. aureus* in Nham model broth (NMB) and the result showed that RE at 12.5 mg/ml was the MBC value for *Staph. aureus*.

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ ผศ.ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม และ ผศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผู้ซึ่งให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษาอันเป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ และผศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์ ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนคณาจารย์ในสาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร ทุกท่านที่ได้แนะแนวทางในการศึกษารวมทั้งความรู้และคำแนะนำต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

ขอขอบคุณพี่ๆ และเพื่อนๆนักศึกษาปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การอาหารที่ให้กำลังใจและช่วยเหลือด้วยดีมาตลอด ขอกราบพระคุณคุณพ่อ และคุณแม่ที่ให้กำลังใจมาโดยตลอด และให้การสนับสนุนและช่วยเหลือทุกด้านตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ศุภร อังศุจินดา

23 เมษายน 2549

# สารบัญ

หน้า

**บทคัดย่อภาษาไทย**.....I

**บทคัดย่อภาษาอังกฤษ**.....II

**กิตติกรรมประกาศ**.....III

**สารบัญ**.....IV

**สารบัญตาราง**.....VI

**สารบัญภาพ**.....VII

**บทที่ 1 บทนำ**..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์..... 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....2

**บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง**..... 3

2.1 สารเคมีที่แยกได้จากพืช..... 3

2.2 กระเจี๊ยบแดง.....6

2.3 สารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในกระเจี๊ยบแดง..... 7

2.4 สมบัติการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จากสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง..... 9

2.5 เปลือกและเมล็ดพืชตระกูลส้ม.....10

2.6 สารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในพืชตระกูลส้ม.....11

2.7 สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดพืชตระกูลส้ม.....14

2.8 การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลินทรีย์.....18

2.9 เชื้อจุลินทรีย์ที่พบในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก.....20

**บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง**.....24

3.1 วัตถุดิบ.....24

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....25

3.3 สถานที่ดำเนินงาน.....26

3.4 วิธีดำเนินงาน.....26

# สารบัญ(ต่อ)

หน้า

**บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง**.....32

4.1 การศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดกระเจี๊ยบแดง เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน.....32

4.2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทรีย์ (minimum bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงและเปลือกส้มเขียวหวานต่อเชื้อทดสอบ.....39

4.3 การศึกษาผลของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงในการต้านการเจริญของ *Staph. aureus* ในสภาวะอาหารเหลวที่เป็นแบบจำลองของแหนม (nham model broth, NMB).....48

**บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง**.....50

**บรรณานุกรม**.....52

**ภาคผนวก**.....55

ภาคผนวก ก.....56

ภาคผนวก ข.....60

ภาคผนวก ค.....63

ภาคผนวก ง.....66

**ประวัติผู้เขียน**.....67

# สารบัญตาราง


ตารางที่ หน้า

2.1 สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง.....9

2.2 สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม.....14

4.1 โซนใสที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบ.....34

4.2 โซนใสที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวาน.....37

4.3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง.....39

4.4 ค่า pH ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในNMB.....48

# สารบาญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1 | โครงสร้างหลักของแอนโธไซยานิน | 8 |
| 2.2 | โครงสร้างของแอนโธไซยานินที่พบในกระเจี๊ยบแดง | 8 |
| 2.3 | โครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์ | 11 |
| 2.4 | โครงสร้างของฟลาวาโนน | 12 |
| 2.5 | โครงสร้างของฟลาโวน | 12 |
| 2.6 | โครงสร้างของฟลาโวนอล | 13 |
| 2.7 | วิธีทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อ (MBC) | 20 |
| 4.1 | ลักษณะโซนใสที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบ | 33 |
| 4.2 | ลักษณะโซนใสที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวาน | 36 |
| 4.3 | ลักษณะโซนใสที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ของสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวาน | 38 |
| 4.4 | การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่มีต่ออัตราการเจริญของ *E. coli* | 40 |
| 4.5 | การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่มีต่ออัตราการเจริญของ *S.*Anatum | 41 |
| 4.6 | การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่มีต่ออัตราการเจริญของ *Staph. aureus* | 42 |
| 4.7 | การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่มีต่ออัตราการเจริญของ *L. innocua* | 42 |
| 4.8 | การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานที่มีต่ออัตราการเจริญของ *E. coli* | 44 |
| 4.9 | การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานที่มีต่ออัตราการเจริญของ *S.*Anatum | 45 |
| 4.10 | การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานที่มีต่ออัตราการเจริญของ *Staph. aureus* | 45 |
| 4.11 | การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานที่มีต่ออัตราการเจริญของ *L. innocua* | 46 |
| 4.12 | การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่มีต่ออัตราการเจริญของ *Staph. aureus* ในสภาวะอาหารเหลวที่เป็นแบบจำลองของแหนม | 49 |

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ รวมทั้งพืชสมุนไพรมี องค์ประกอบของสารพฤษเคมีที่มีสมบัติของชีวกิจกรรม (bioactivities) ได้แก่ สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (antioxidant) สมบัติการต้านมะเร็ง (anticancer) สมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial) เป็นต้น นอกจากนี้มนุษย์เราในปัจจุบันให้ความสนใจกับปัญหาสุขภาพมากขึ้นรวมทั้งเล็งเห็นปัญหาเรื่องความปลอดภัยของการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในการเติมลงในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ การศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้มาซึ่งสารสกัดจากพืชที่มีสมบัติชีวกิจกรรมดังกล่าวเพื่อทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ จึงได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น (Duffy and Power., 2001)

ได้มีรายงานถึงสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชตระกูลส้มโดยพบว่าสารประกอบที่สกัดได้จากพืชตระกูลส้มซึ่งมีความสามารถในการต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบได้หลายสายพันธุ์ และเชื้อราบางสายพันธุ์ (Duffy and Power, 2001; Jusoh *et al.*,2000 ; Jayaprakasha *et al.*, 2002 ; Suri *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับสมบัติการต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคท้องร่วงได้หลายสายพันธุ์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง (มาลินและคณะ, 2529 ; Chulasiri *et al.*, 1994) ในส่วนของน้ำมันและ unsaponification matter ของกระเจี๊ยบแดงมีสมบัติการต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบได้หลายสายพันธุ์ เช่น *Salmonella. typhi, S. albus, Bacillus. anthracis* และเชื้อราอีกด้วย (Gangrade *et al.*,1979)

ส้มเขียวหวานเป็นผลไม้ที่ปลูกมากในประเทศไทย และนิยมนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำส้มคั้น ซึ่งทำให้เกิดวัสดุเหลือทิ้งปริมาณมากจากกระบวนการผลิต คือ เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน สำหรับกระเจี๊ยบแดงนั้นเป็นพืชสมุนไพรที่คนไทยนิยมปลูก และนำมาบริโภคในรูปของเครื่องดื่ม โดยทราบว่า กระเจี๊ยบแดงมีฤทธิ์ทางยาช่วยรักษาการอักเสบของทางเดินปัสสาวะและรักษาโรคนิ่ว และเป็นแหล่งของแอนโธไซยานินที่มีสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี (วีรสิงห์, 2522) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อความเสื่อมเสียที่พบในผลิตภัณฑ์แหนมของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน โดยประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดดังกล่าวด้วยการทดสอบความไวของเชื้อที่ทดสอบ (sensitivity test) เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ สำหรับการนำมาใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์แหนมต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน

1.2.2 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทรีย์ (minimum bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดที่เหมาะสม

1.2.3 ศึกษาผลของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบในสภาวะอาหารเหลวที่เป็นแบบทดสอบจำลองของแหนม (nham model broth , NMB)

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการประเมินความสามารถของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อความเสื่อมเสียที่พบในผลิตภัณฑ์แหนม ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยจะเป็นแนวทางในการนำสารสกัดจากพืชมาใช้เป็นสารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์

# บทที่ 2
# ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 สารเคมีที่แยกได้จากพืช

สารเคมีที่แยกได้จากพืชนั้น สามารถได้จำแนกออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ primary metabolite และ secondary metabolite โดยมีความแตกต่างคือ primary metabolite เป็นสารที่พบได้ในพืชทุกชนิด เป็นผลิตผลที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน และไขมันส่วน secondary metabolite นั้นพบไม่เหมือนกันในพืชแต่ละชนิด ไม่พบทั่วไปและไม่มี metabolic function ที่ชัดเจน เช่น แอลคาลอยด์ ไกลโคไซด์ แทนนิน เป็นต้น

ในส่วนของ secondary metabolite จะมีสารตั้งต้นแตกต่างกันไป ตัวอย่างเช่น กรดอะมิโน (amino acid), อะซิเตท (acetate), มีแวลโลเนท (mevalonate) เป็นต้น โดยมีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้องในปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ ซึ่งพืชต่างชนิดกันจะมีเอนไซม์ที่ไม่เหมือนกัน ทำให้วิถีทางในกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biopathway) ต่างกันไป และได้สารประเภท secondary metabolite ต่างกันไปในพืชต่างชนิดกันหรือต่างฤดู สาเหตุที่แท้จริงในการสร้าง secondary metabolite ในพืชยังไม่ทราบแน่ชัดแต่พบว่าอาจเกิดจากการพยายามปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป (นิจศิริและพยอม, 2534)

จากข้อมูลเกี่ยวกับ primary และ secondary metabolite ของพืช ทำให้สามารถนำพืชมาใช้เป็นยารักษาโรคได้ ซึ่งอาจจำแนกออกได้เป็น 9 กลุ่มใหญ่ คือ

### 2.1.1 คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate)

คือ สารที่ประกอบด้วย C, H และ O ซึ่งอัตราส่วนของ H:O มักจะเป็น 2:1 และอยู่ในรูปของ โพลีไฮดรอกซีอัลดีไฮด์ (polyhydroxy aldehyde) หรือ คีโตน (ketone) ในปัจจุบันกลุ่มของคาร์โบไฮเดรตที่ใช้ในทางยา มักใช้ในรูปของ เดร็กโตส (dextrose) ฟรุกโตส (fructose) กลูโคส (glucose) แลกโตส (lactose) ซูโคส (sucrose) อะการ์ (agar) แพกติน (pectin) เป็นต้น

### 2.1.2 แอลคาลอยด์ (alkaloid)

เป็นสารอินทรีย์ซึ่งมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ (organic nitrogen compound) พบในพืชชั้นสูงเป็นส่วนมาก แต่บางครั้งก็พบได้ในสัตว์และพวกจุลินทรีย์ คุณสมบัติของแอลคาลอยด์ส่วนใหญ่มีรสขมไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มีฤทธิ์เป็นด่างและมักมีฤทธิ์ต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกาย

หน้าที่ของแอลคาลอยด์ในพืชยังไม่มีคำตอบที่แน่นอน แต่นักวิทยาศาสตร์ก็ได้ให้ข้อสังเกตที่น่าเชื่อถือได้ว่าอาจมีหน้าที่ดังนี้

1) เป็นสารที่มีพิษสำหรับป้องกันมิให้แมลงหรือสัตว์มารบกวนหรือทำลาย

2) เป็นผลที่ได้จากกระบวนการทำลายพิษ (detoxification) ของสารที่เป็นอันตรายต่อพืช

3) เป็นสารที่ช่วยควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (growth regulator)

4) เป็นแหล่งเก็บสะสมแร่ธาตุโดยสามารถสลายตัวให้ธาตุไนโตรเจน และธาตุอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของพืช

5) เป็นสารประกอบในการกำจัดไนโตรเจน (nitrogen excretory product) เช่นเดียวกับยูเรียหรือกรดยูริค

6) ช่วยรักษาสมดุลของไอออน (maintain ionic balance)

แอลคาลอยด์อาจพบในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ในเมล็ด (หมาก) ในผล (พริกไทย) ในใบ (ลำโพง) ในเปลือก (ซิงโคนา) ในเหง้า (ดองดึง) ในราก (ระย่อม) และยังพบได้ในราที่ขึ้นบนพืช (ergot) เป็นต้น

### 2.1.3 ไกลโคไซด์ (glycoside)

เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วย ส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล หรือเรียกว่าอะกลัยโคน (aglycone) กับส่วนที่เป็นน้ำตาล หรือเรียกว่ากลัยโคน (glycone) ดังนั้นเมื่อถูกย่อยสลายด้วยกรดหรือน้ำย่อยจะได้ ผลิตผล 2 ดังกล่าว ส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลมีสูตรโครงสร้างแตกต่างกันไปเป็นหลายประเภท ดังนั้นฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบในกลุ่มนี้ จึงมีได้กว้างขวางแตกต่างกันออกไป ส่วนที่เป็นน้ำตาลจะไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาแต่เป็นส่วนช่วยทำให้การละลายและดูดซึมเข้าสู่ร่างกายดีขึ้น

ไกลโคไซด์ในพืชจะทำหน้าที่ให้พืชมีการดำรงชีวิตเป็นปกติ (regulator and sanitary function) ไกลโคโซด์อาจจำแนกคร่าว ๆ ตามสูตรโครงสร้างของอะกลัยโคน (เนื่องจากเป็นส่วนที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา) ดังนี้

1) Cardiac glycoside จะมีฤทธิ์ต่อระบบกล้ามเนื้อหัวใจและระบบการไหลเวียนโลหิต

2) Anthraquinone glycoside ใช้เป็นยาระบาย (laxative) ยาฆ่าเชื้อ (antibiotic) และสีย้อม (dye stuff)

3) Saponin glycoside เมื่อเขย่ากับน้ำจะได้ฟองคล้ายสบู่ มักใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยาและสเตอรอยด์

4) Cyanogenetic glycoside เป็นไกลโคไซด์ซึ่งเมื่อถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ กรดหรือด่าง จะให้ hydrocyanic acid (HCN) ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อมนุษย์หรือสัตว์

5) Isothiocyanate glycoside เป็นไกลโคไซด์ซึ่งเมื่อถูกย่อยสลาย จะได้น้ำมันมัสตาร์ด น้ำมันนี้จะเป็นตัวทำให้มีกลิ่น และมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อโรคด้วย

6) Flavonoid glycoside เป็นสีที่พบในดอก ผลของพืช นำมาทำเป็นสีย้อมและแต่งสีอาหาร บางชนิดก็ใช้เป็นยา

7) Phenolic glycoside พบมากในธรรมชาติ โดยจะพบในรูปอนุพันธ์ของฟีนอล (phenol) เช่น พวกเทนนิน ในทางยาจะมีฤทธิ์ฝาดสมาน (astringent) ฆ่าเชื้อโรค

### 2.1.4 น้ำมันระเหย (volatile oil or essential oil)

เป็นน้ำมันที่ได้จากพืชโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) หรือการบีบ (expression) มีกลิ่นรสเฉพาะตัว ระเหยได้ง่ายในอุณหภูมิธรรมดา เบากว่าน้ำ เชื่อกันว่าน้ำมันระเหยเป็น waste product ไม่มีประโยชน์ในกระบวนการชีวเคมี หรืออาจทำหน้าที่เพื่อดึงดูดแมลง แต่เป็นไปได้ว่าน้ำมันระเหยเกิดจากผลิตผลที่ผิดปกติของกระบวนการชีวเคมีของพืชและอาจเป็นสารที่เกิดจากกระบวนการทำลายพิษของพืช ประโยชน์ทางด้านยา นอกจากใช้เป็นตัวแต่งกลิ่นแล้ว ส่วนใหญ่จะใช้ในทางขับลม (carminative) ฆ่าเชื้อ (antibacterial or antifungal) ทาถูนวด ยาทาภายนอก

### 2.1.5 ไขมัน (lipid)

ไขมันเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เมื่อต้มกับด่างจะได้สบู่ ถ้าเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้องเรียกว่าไขมัน ถ้าเป็นของเหลวเรียกว่า น้ำมัน มักอยู่ในรูปของอาหารสะสมของพืช ประโยชน์ของไขมันในทางยาคือ ใช้เตรียมขี้ผึ้งหรือใช้เป็นยาระบาย เช่น น้ำมันละหุ่ง รักษาโรคผิวหนัง เช่น น้ำมันกระเบา

### 2.1.6 เรซิน (resin)

เป็นสารอินทรีย์หรือสารผสมประเภทโพลิเมอร์ มีรูปร่างไม่แน่นอน มีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่สลับซับซ้อน ไม่ละลายน้ำ ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เมื่อต้มกับด่างจะได้สบู่ เมื่อเผาจะได้ควันเรซิน อาจเป็นสารที่พืชได้สร้างอยู่เป็นปกติ (normal physiological product) หรือเกิดการสร้างเมื่อพืชเป็นโรค (pathological product) หรือเมื่อต้นไม้มีแผลเกิดขึ้นในธรรมชาติพบเรซินรวมกับน้ำมันระเหยหรือกัม (gum) ตัวอย่างเช่น ยางสน กำยาน มหาหิงคุ์

### 2.1.7 วิตามิน (vitamins)

วิตามินเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีอยู่เล็กน้อยในพืชและสัตว์ตามธรรมชาติสามารถเข้าสู่ร่างกายจากอาหารหรือแหล่งอื่น เพื่อให้มีหน้าที่เฉพาะทางกายภาพ หรือเพื่อการเติบโตเข้าสู่สภาพปกติ

**2.1.8 ยาปฏิชีวนะ (antibiotic)**

เป็นผลิตผลทางเคมีที่ได้จากสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่จะได้จากแบคทีเรียและเชื้อรา สำหรับพืชชั้นสูงก็มีสารที่มีฤทธิ์เป็นยาปฏิชีวนะ แต่ยาปฏิชีวนะที่ได้จากพืชสมุนไพรที่ใช้อยู่ในตลาดยายังมีจำนวนน้อยมาก

**2.1.9 สเตอรอยด์ (steroid)**

เป็นสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างเป็น tetracyclic terpenoid ซึ่งสร้างขึ้นมาโดยพืชและสัตว์ ในทางการแพทย์มีการใช้สเตอรอยด์จำพวกฮอร์โมนเพศเป็นยามานานแล้ว แต่เดิมการสกัดพวกคอร์ติโซน (cortisone) จากกรดน้ำดี (bile acid) นั้นยุ่งยากและทำให้มีราคาแพง ปัจจุบันสามารถผลิตสเตอรอย์จากพืชและเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้สเตอรอยด์มีราคาถูกลง

## 2.2 กระเจี๊ยบแดง

กระเจี๊ยบแดง เป็นพืชไร่ที่ปลูกได้ง่าย และให้ผลดีในประเทศไทย ชื่อสามัญ คือ roselle , red sorrel , jamaica sorrel หรือ karkade มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Hibiscus sabdariffa* Linn. เป็นพืชวงศ์ *Malvaceae* กระเจี๊ยบแดงเริ่มรู้จักและนำมาใช้ประโยชน์ทางอาหารและเภสัชวิทยา ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1658 กลีบดอกนำมาทำเป็นเครื่องดื่ม ชากระเจี๊ยบ เจลลี่ แยม หรือสกัดเป็นสารให้สีแดง เนื่องจากเป็นแหล่งของแอนโธไซยานิน (anthocyanin) ในปริมาณสูง การนำกระเจี๊ยบแดงมาทำเป็นเครื่องดื่มที่ให้ความสดชื่น และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic effects) ตับ และไต (Askari *et al.*, 1996) นอกจากนี้นำมาใช้ประโยชน์ด้านเภสัชกรรม ดังนี้ กระเจี๊ยบแดงมีสมบัติในการป้องกันการทำลายของอนุมูลอิสระในร่างกาย มีสมบัติในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันไขมันในซีรั่ม ซึ่งช่วยป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบตัน (Tee *et al.*, 2002) มีฤทธิ์เป็นยาขับปัสสาวะใช้ในการรักษาโรคนิ่วและการอักเสบของทางเดินปัสสาวะได้ดี (วีรสิงห์, 2522) และจากการศึกษาของ Chewonarin และคณะ (1999) พบว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยเอธานอล 80% มีผลต้านการกลายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ได้ถึง 60-90% สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงยังมีผลเป็นสารต้านมะเร็งธรรมชาติ (natural chemopreventive agent) โดยทางการแพทย์จะใช้เป็นสารต้านการเกิดเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้แล้วกระเจี๊ยบยังมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อีกด้วย

องค์ประกอบของกระเจี๊ยบแดง ส่วนใหญ่เป็นกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น กรดฮิบิสซิค (hibiscic acid) 23% กรดซิตริก (citric acid) 12-17% นอกจากนี้ยังมีกรดมาลิค (malic acid) กรดทาร์ทาลิค (tartaric) กรดออกซาลิค (oxalic acid) (วีรสิงห์, 2522) เนื่องจากองค์ประกอบส่วนมากเป็นกรดจึงทำให้กระเจี๊ยบแดงมีพีเอชอยู่ระหว่าง 2-3 และมีรสชาติเปรี้ยว สีแดงของกลีบดอกกระเจี๊ยบประกอบด้วยรงควัตถุแอนโธไซยานิน ซึ่งรงควัตถุนี้จัดอยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์

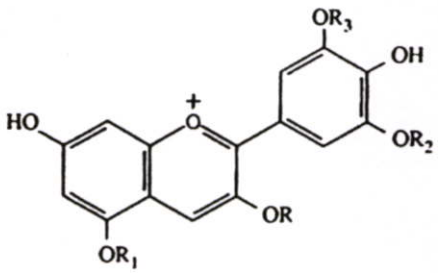
แอนโธไซยานินในกระเจี๊ยบแดง ประกอบด้วย เดลฟินิดิน-3-แซมบูไบโอไซด์ (delphinidin-3-sambubioside) เป็นรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีม่วงแดงในกระเจี๊ยบแดงโดยมีปริมาณมากที่สุด รงควัตถุที่พบรองลงมาคือ ไซยานิดิน-3-แซมบูไบโอไซด์ (cyanidin-3- sambubioside) โดยอัตราส่วนของรงควัตถุทั้งสองชนิดในกระเจี๊ยบแดงคิดเป็นร้อยละ 70.9 : 29.1 ของปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมดใน 100 กรัมของกระเจี๊ยบแดงแห้ง จะมีปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมด 1.5 กรัม ในรูปของเดลฟินิดิน-3-กลูโคไซด์ (delphinidin-3-glucoside) (Bridle and Timberlake, 1997) มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำ อะซิโตน แอลกอฮอล์ ไม่ละลายในปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเบนซิน สีของแอนโธไซยานินสามารถเปลี่ยนแปลงไปตามความเป็นกรด-ด่าง คือในสภาพเป็นกรดจะให้ สีแดงจนถึงสีแดงเข้ม ในสภาพเป็นกลางจะให้สีชาแดง และในสภาพที่เป็นด่างจะให้สีแดงคล้ำจนถึงปนเขียว (วิชัย, 2517)

## 2.3 สารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในกระเจี๊ยบแดง

สารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในกระเจี๊ยบแดงคือ แอนโธไซยานิน ซึ่งเป็นรงควัตถุกลุ่มของฟลาโวนอยด์ที่พบมากในกระเจี๊ยบ เนื่องจากมีโครงสร้างหลักเป็นฟลาแวนนิว-เครียส (flavan nucleus) ต่ออยู่กับอะโรมาติก 2 วง เชื่อมกันโดย 3 carbon atom ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล (aglycone) เรียกว่า แอนโธไซยานิดิน (anthocyanidin) ปัจจุบันค้นพบแล้วมากกว่า 20 ชนิด แต่มีเพียง 6 ชนิดที่พบบ่อยได้แก่ พีลาร์โกนิดิน (pelargonidin) ไซยานิดิน (cyaniding) เดลฟินิดิน (delphindin) พีโอนิดิน (peonidin) พีทูนิดิน (petunidin) และมาลวิดิน (malvidin) สามารถแยกส่วนที่เป็นน้ำตาลและส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลของแอนโธไซยานินออกจากกันได้ด้วยการไฮโดรไลซิสด้วยกรด สำหรับในกระเจี๊ยบแดงจะพบแอนโธไซยานินเฉพาะส่วนที่อยู่ในรูปของไกลโคไซด์ (glycoside) เท่านั้นคือ ส่วนที่รวมกับน้ำตาลเป็นเอสเทอร์ น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของแอนโธไซยานินจะเป็นได้ทั้ง โมโน- ได- และไตรแซ็คคาร์ไรด์ โมเลกุลของน้ำตาลส่วนใหญ่จะจับอยู่กับหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลของแอนโธไซยานินโดยเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันที่อะตอมของคาร์บอนตำแหน่ง 3 ในโมเลกุลของแอนโธไซยานิน ถ้าเป็นไดไกลโคไซด์จะเกาะกับหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 3 และ 5 น้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ที่พบได้แก่ น้ำตาลกลูโคส (glucose) กาแล็กโทส (galactose) แรมโนส (rhamnose) อะราบิโนส (arabinose) และไซโรส (xylose) สำหรับน้ำตาลไดแซ็กคาไรด์ที่พบได้แก่ รูติโนส (rutinose หรือ L-rhamnosyl(α1→6)D-glucose) เจนทิโอไบโอส (gentiobiose หรือ D-glucosyl(β1→6)D-glucose) โซฟอโรส (sophorose หรือ D-glucosyl(β1→2)D-glucose) และแซมบูไบโอส (sambubiose หรือ D-xylosyl D-glucosyl(β1→2)D-glucose)

โครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุลแอนโธไซยานิน ประกอบด้วยวงแหวนเบนโซไพแรน (benzopyran) 2 วงต่อกับวงแหวนฟีนิล (phenyl ring) 1 วง และแอนโธไซยานินจะมีประจุบวก

(flavylium cation) ในโครงสร้างด้วย จึงทำให้ว่องไวต่อปฏิกิริยามากและสามารถไอออนไนซ์ (ionize)ได้ง่าย โครงสร้างของแอนโธไซยานินแสดงดังภาพที่ 2.1

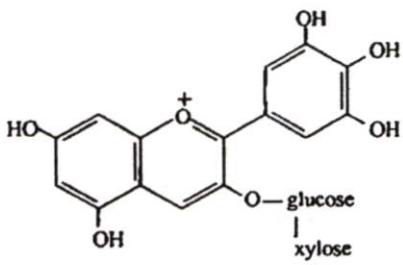



R, R1, R2, R3, = H หรือโมเลกุลของน้ำตาล

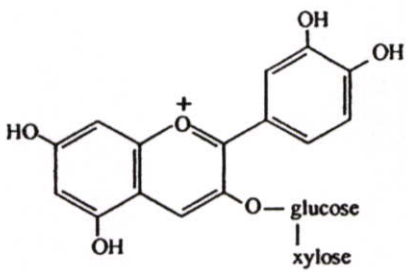
**ภาพที่ 2.1** โครงสร้างหลักของแอนโธไซยานิน

ที่มา : Mishra และคณะ(1999)

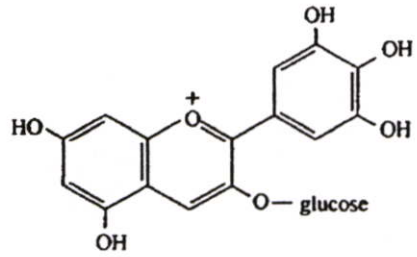
แอนโธไซยานินที่เป็นองค์ประกอบหลักในกระเจี๊ยบแดงคือ เดลฟินิดิน-3-แซมบูไบโอไซด์ (delphinidin-3-sambubioside) เป็นรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีม่วงแดง สำหับแอนโธไซยานินที่พบรองลงมาคือ เดลฟินิดิน-3-กลูโคไซด์ (delphinidin-3-glucoside) ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (cyanidin-3-glucoside) และไซยานิดิน-3-แซมบูไบโอไซด์ โครงสร้างของแอนโธไซยานินทั้ง 4 ชนิด แสดงดังภาพที่ 2.2



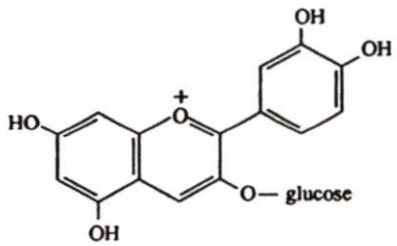

เดลฟินิดิน-3-แซมบูไบโอไซด์




ไซยานิดิน-3-แซมบูไบโอไซด์




เดลฟินิดิน-3-กลูโคไซด์




ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์

**ภาพที่ 2.2** โครงสร้างของแอนโธไซยานินที่พบในกระเจี๊ยบแดง

ที่มา : Mishra และคณะ(1999) และ Macheix และคณะ(1990)

## 2.4 สมบัติการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง

กระเจี๊ยบแดงเป็นพืชสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ทางเภสัชวิทยา เนื่องจากมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดี ดังนั้นจึงมีการศึกษาสมบัติในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มากมาย (ตารางที่ 2.1) ซึ่งมีการรายงานดังต่อไปนี้

**ตารางที่ 2.1** สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง

| พืช | กลุ่มสารสกัดที่ได้/ความเข้มข้น | เชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้ง | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|
| กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* Linn) | - สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น 15% ใช้ปริมาณ 4 มล. | *E. coli* | Sharaf และGineidi (1962) |
| | - ส่วนของน้ำมัน และ unsaponification matter | *Salmolla typhi, S. albus, B. anthracis* และเชื้อรา | Gangradeและคณะ(1979) |
| | - สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น 3% | *E. coli* และ *Staph. aureus* | Shihata และคณะ (1983) |
| | - สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น 5 และ 10% | ลดการสร้างอะฟลาทอกซินได้ 42-85% ของ *Aspergillus flavus* | El-Shaveb และMabrouk (1984) |
| | - สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 50 ม.ก/ม.ล.หรือเทียบเท่า 216 ม.ก/ม.ล ของกระเจี๊ยบแดงแห้ง | เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ก่อโรคท้องร่วงได้ 101 สายพันธุ์ | Chulasiriและคณะ (1994) |

Pratt และคณะ (1960) รายงานผลสารสกัดแอนโทไซยานินจาก สตรอเบอรี่และองุ่นต่อการต้านการเจริญของแบคทีเรีย พบว่า แอนโธไซยานินจำพวกพีลาร์โกนิดิน -3-โมโนกลูโคไซด์ (Pelargonidin-3-monoglucoside) ไซยานิดิน-3-โมโนกลูโคไซด์ (cyanidin-3-monoglucoside) และเดลฟินิดิน-3-โมโนกลูโคไซด์ (delphinidin-3- monoglucoside) ใช้ปริมาณละ 10 มิลลิกรัม มีผลต่อการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Lactobacillus acidophilus* โดยสามารถลดอัตราการเจริญในช่วง Lag Phase ของเชื้อดังกล่าวได้

Sharaf และ Gineidi (1962) ศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยน้ำ ต่อการเจริญของแบคทีเรียในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยเปรียบเทียบกับสารประกอบฟีนอล พบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงความเข้มข้น 15 % ใช้ปริมาณ 4 มิลลิลิตร หรือเทียบเท่ากับการใช้สารประกอบฟีนอล 1 มิลลิลิตรสามารถต้านการเจริญของ *E. coli* ได้

Somaatmadja และคณะ (1964) กล่าวว่า แอนโธไซยานิน ซึ่งเป็นรงควัตถุกลุ่มของฟลาโวนอยด์ที่พบมากในกระเจี๊ยบ มีสมบัติในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้นั้น เนื่องจากโครงสร้างของสารประกอบที่เป็น double-ring benzopyran มีประจุบวกจึงทำให้ว่องไวต่อการเกิดคีเลท (chelate) ของโลหะอิออน ซึ่งจะมีผลไปรวมตัวกับหมู่ซัลไฟดริล (sulfydryl) ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานของแบคทีเรีย เมื่อเอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงาน จึงมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ และตายไปในที่สุด

Shihata และคณะ (1983) ศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยน้ำ พบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 3% มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของ *E. coli* และ *Staph. aureus*

Shaveb และ Mabrouk (1984) ได้นำสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม มาทดสอบการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* พบว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 5 และ 10% สามารถลดการสร้างอะฟลาทอกซินได้ 42-85 % เมื่อเทียบเท่ากับชุดควบคุม แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของไมซีเลียมได้

Chulasiri และคณะ (1994) ศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยน้ำต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ก่อโรคท้องร่วง พบว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงมีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ 101 สายพันธุ์ และที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรหรือเทียบเท่า 216 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรของกระเจี๊ยบแดงแห้ง สามารถทำลายจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในส่วนของน้ำมัน และ unsaponification matter ที่พบในกระเจี๊ยบแดงมีสมบัติการต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบได้หลายสายพันธุ์ เช่น *S. typhi, S. albus, B. anthracis* และเชื้อราได้อีกด้วย (Gangrade *et.al.*,1979)

นอกจากนี้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงยังประกอบด้วยกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ จำนวนมาก เช่น กรดฮิบิสซิค (hibisic acid) 23% กรดซิตริก (citric acid) 12-17% (วีรสิงห์, 2522) ซึ่งกรดเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดยมีผลไปลดพีเอช รบกวนการขนส่งสารผ่านเข้าออกของผนังเซลล์ และไปทำลายเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานเพื่อใช้ในการดำรงชีวิต (Naidu, 2000)

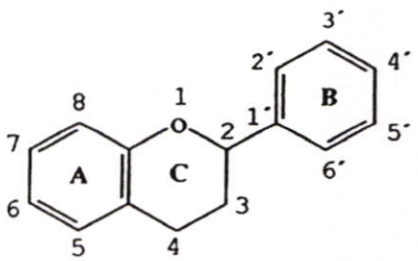
## 2.5 เปลือกและเมล็ดพืชตระกูลส้ม

ส้มเขียวหวานมีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Citrus reticulata* Blanco อยู่ในตระกูลของ Rutacea มีลักษณะเป็นไม้พุ่มยืนต้นปลูกได้ในบริเวณพื้นที่เขตกึ่งร้อน จึงมีการปลูกอยู่ทั่วโลก ส้มเป็นผลไม้ที่นิยมรับประทานทั้งส่วนที่เป็นเนื้อหรือเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำส้มคั้น ในกระบวนการผลิตน้ำส้มคั้นทั่วไปจะได้ส่วนที่เป็นน้ำประมาณ 50% ที่เหลือจะเป็นวัสดุเหลือทิ้งส่วนใหญ่เป็น

เปลือกและเมล็ด (Braddock,1995) ได้มีการนำเปลือกส้มมาใช้ประโยชน์โดยเป็นแหล่งของผลิตภัณฑ์พลอยได้หลายชนิด เช่น โมแลส (molasses) เพคติน น้ำมันหอมระเหย และลิโมนีน (limonene) นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์อีกด้วย สำหรับเมล็ดส้มเป็นแหล่งของลิโมนอยด์ (limoniod) สารให้รสขม ซึ่งเป็นสารพฤกษเคมีที่มีลักษณะเฉพาะของพืชตระกูลส้ม และยังมีสมบัติในการต้านการเกิดของเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลองได้ดี (Braddock and Cadwallader, 1992; Braddock, 1995; Bocco *et al.*, 1998) เปลือกและเมล็ดพืชตระกูลส้มยังเป็นแหล่งของสารประเภทฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิค และอื่น ๆ มีสมบัติการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีส่วนช่วยถนอมอาหารให้ยาวนานขึ้น และยังพบว่าสารประกอบฟีนอลิคมีส่วนทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต (Milic *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังมีการนำสารเหล่านี้มาประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรมอีกมากมาย เช่น สามารถป้องกันการจับตัวของเกล็ดเลือด (antithrombogenic)ในหลอดเลือดเพื่อใช้รักษาโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดและหัวใจ (Benavente-Gracia *et al.*, 1997)

## 2.6 สารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในพืชตระกูลส้ม

สารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในพืชตระกูลส้ม คือ ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นสารจำพวกโพลีฟีนอลที่พบในธรรมชาติในพืชหลายชนิด มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเป็นสารมีสีที่พบตามธรรมชาติใน ดอก ผล ใบ ราก เนื้อไม้ เปลือกไม้ และเมล็ด พืชตระกูลส้มก็เป็นพืชอีกชนิดที่มีองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์อยู่ปริมาณมาก โครงสร้างของฟลาโวนอยด์ประกอบด้วยวงเบนซิน 2 วง และอาจจะมีคาร์บอนอะตอมที่เรียงตัวเป็นเบนซิน วงที่ 3 แทรกอยู่ตรงกลางด้วย สารฟลาโวนอยด์แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่ม โดยเข้าแทนที่คาร์บอนอะตอมในวงเบนซินด้วยสารกลุ่มไฮดรอกซิล เมทอกซิล และน้ำตาล (ในรูปของกลัยโคไซด์) ดังนั้นในธรรมชาติจึงมีสารฟลาโวนอยด์มากมาย และที่ค้นพบแล้วในธรรมชาติกว่า 4000 ชนิด (ปาริชาติ, 2543) โครงสร้างของฟลาโวนอยด์แสดงดังภาพที่ 2.3

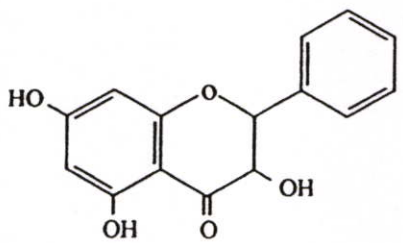



**ภาพที่ 2.3** โครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์
ที่มา : ปาริชาติ(2543)

สำหรับในพืชตระกูลส้มพบฟลาโวนอยด์อยู่สองกลุ่มคือ โพลีเมธอกซิเลทฟลาโวน (polymethoxylated flavones) และไกลโคซิเลทฟลาวาโนน (glycosylated flavanones) (Bocco *et al.*, 1998) ฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชตระกูลส้มแบ่งได้ 4 ชนิดคือ

### 2.6.1 ฟลาวาโนน(flavanones)

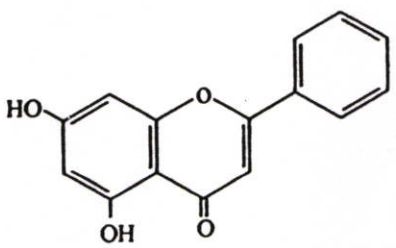
ฟลาวาโนนที่พบในพืชตระกูลส้มเช่น นารินจิน (naringin) เฮสเปอริดิน (hesperidin) นารินจีนิน (naringerin) โครงสร้างของฟลาวาโนนจะมามีพันธะคู่ตำแหน่ง 2-3 ในวงแหวนซี (C-ring structure) ดังภาพที่ 2.4




**ภาพที่ 2.4** โครงสร้างของฟลาวาโนน
ที่มา : Rice-Evans และคณะ(1997)

### 2.6.2 ฟลาโวน(flavones)

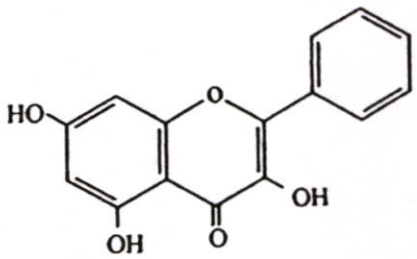
ฟลาโวนที่พบในพืชตระกูลส้มมีความเข้มข้นอยู่ในระดับต่ำพบอยู่ในส่วนของเนื้อเยื่อส้ม (citrus tissue) เช่น อิพิจินิน (epigenin) ลูทีโอลิน (luteolin) ไดโอสมิทิน (diosmetin) และแทนเจอริทิน (tangeretin) โครงสร้างของฟลาโวนจะขาดหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ในตำแหน่งที่ 3 บนวงแหวนซี ดังภาพที่ 2.5




**ภาพที่ 2.5** โครงสร้างของฟลาโวน
ที่มา : Rice-Evans และคณะ(1997)

### 2.6.3 ฟลาโวนอล(flavonols)

ฟลาโวนอลที่พบในพืชตระกูลส้มมีความเข้มข้นอยู่ในระดับต่ำพบอยู่ในส่วนของเนื้อเยื่อส้มเช่น เควอร์ซีทิน (quercetin) และเคมเฟอรอล (kaempferol) ฟลาโวนอลจะมีหมู่ 3-ไฮดรอกซิล (3-hydroxy) อยู่บนวงแหวนซี และหมู่ 5-ไฮดรอกซิล (5-hydroxy) อยู่บนวงแหวนเอ (A-ring structure) ดังภาพที่ 2.6




**ภาพที่ 2.6** โครงสร้างของฟลาโวนอล

ที่มา : Rice-Evans และคณะ(1997)

### 2.6.4 แอนโธไซยานิน

สารกลุ่มนี้เป็นรงควัตถุ พบเฉพาะในส่วนของน้ำส้มสีทับทิม (blood orange) ซึ่งมีสีส้มแดงเช่น ไซยานิดิน (cyanidin) พิโอนิดิน (peonidin) เดลฟีนิดิน (delphinidin)

ฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชตระกูลส้มมีสมบัติการต้านจุลินทรีย์ได้นั้น มีความสัมพันธ์กับโครงสร้างทางเคมีและการเชื่อมต่อกันด้วยหมู่แทนที่ต่างๆของสารฟลาโวนอยด์ และจากการศึกษาของ Ramaswamy และคณะ(1972) แสดงให้เห็นว่าไบโอฟลาโวนอยด์ (bioflavoniod) จากพืชตระกูลส้มมีผลต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ โดยพบว่าโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ที่เป็น อะกลัยโคน มีสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่า ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ และยังพบอีกว่าพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 2-3 ในโครงสร้างของวงแหวนซีมีส่วนสำคัญในการต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย ซึ่งจากการทดลองนี้ฟลาโวนอล (flavonols) มีผลการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด ส่วนแนวโน้มของการใช้สารสกัดจากพืชตระกูลส้มในอุตสาหกรรมอาหารนั้น ส่วนใหญ่จะใช้เพื่อเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและน้ำมันในผลิตภัณฑ์อาหารเนื่องจากสารประกอบฟีนอลิค และสารประเภทฟลาโวนอยด์ในพืชตระกูลส้มมีส่วนช่วยถนอมอาหารและยืดอายุการเก็บรักษาอาหารให้ยาวนานขึ้นได้ และยังพบอีกว่าสารประกอบฟีนอลิคจากธรรมชาติและสารประเภทฟลาโวนอยด์มีส่วนช่วยทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตด้วย (Milic *et al.*, 1998)

## 2.7 สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดพืชตระกูลส้ม

พืชตระกูลส้มเป็นพืชที่ประกอบด้วยสารที่มีสมบัติเป็นสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์มากมายโดยเฉพาะสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ ดังนั้นจึงมีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์จากพืชตระกูลส้มด้วยวิธีการสกัดและทดสอบกับจุลินทรีย์ที่ทดสอบมากมาย (ตารางที่ 2.1) ดังรายงานวิจัยต่อไปนี้

**ตารางที่ 2.2** สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของพืชตระกูลส้ม

| พืช | กลุ่มสารสกัดที่ได้/ความเข้มข้น | เชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้ง | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|
| พืชตระกูลส้ม<br>- เมล็ดพืชตระกูลส้ม | สารประกอบลิโมนีน (limonene) | *Azotobacter* sp. , *Strep. faecalis* และ *Pseu. aeruginosa* และเชื้อรา *Mucor* sp. , *Penicillium* sp. , *Aspergillus* sp. และ *Trichoderma* sp. | Nelrotti และคณะ(1996) |
| - ส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulata*) ส่วนของเปลือก | ส่วนที่ละลายในเอทานอล (ethanol soluble fraction) และวิเคราะห์องค์ประกอบพบ polymethoxylated flavone (PMF) 3 ชนิด ได้แก่ เดสเมทิลโนบิเลติน โนบิเลติน และ แทนเจริติน | *B. cereus* , *B. coagulans* , *B. subtills*, *Staph. aureus*, *E. coli* และ *Pseu. aeruginosa* | Jayaprakasha และคณะ (2000) |
| - ส้มเขียวหวาน (pericardium *Citri reticulatae*)ส่วนของเปลือก | ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC) คือ 50 และมากกว่า 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | *B. subtills* และ*E. coli* | Duffy และ Power(2001) |

**ตารางที่ 2.2** สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของพืชตระกูลส้ม (ต่อ)

| พืช | กลุ่มสารสกัดที่ได้/ความเข้มข้น | เชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้ง | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|
| พืชตระกูลส้ม<br>- มะกรูด (*Citrus hystrix*) | นาริงจิน รูติน เควอร์เซติน คาเอมเฟอรอล และเฮสเปอริดิน | แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* , *Proteus vulgaris* และ *Klebsiella Pneumoniae*<br>แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staph. aureus* , *B. cereus* , *B. subtills* , *Strep. lactis* และ *S. thyposa* | Suri และคณะ (2002) |
| - ส้ม (*Citrus mitis*) ส่วนของเมล็ด | นาริงจิง รูโทไซด์ และเฮสเปอริดิน | *B. subtills* , *Staph. aureus*, *P. vulgaris* , *S. thyposa* , *K. pneumoniae* , *E. coli* และ *Pseu* . *aeruginosa* และ *Candida albicans* | Jusoh และคณะ(2002) |
| - ส้มที่มีรสเปรี้ยว (*Citrus aurantium* amara) ส่วนของเปลือก | น้ำมันหอมระเหย (essential oils) วิเคราะห์องค์ประกอบพบสารประกอบโมโนเทอร์พีน (monoterpenes) (ลิโมนีน (limonene) 77.90% เบต้าไพนีน (β-pinene) 3.40% ไมริซีน (myricene) 1.81% และทรานโอซิเมน (trans-ocimen) 1.16%) อัลดีไฮด์ (aldehydes) แอลกอฮอล์ (alcohols) ลินาโนน (linalool) และนูตคาโตน (nootkatone) | *Staph. aureus* | Quinteroและคณะ (2003) |

Del Rio และคณะ(1998) ทดสอบสารประกอบ PMF ที่แยกได้จากน้ำมันหอมระเหยของส้มที่มีรสหวาน (sweet orange) และส้มที่มีรสเปรี้ยว (sour orange) ต่อการต้านการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora citrophthora* , *Penicillium digitatum* , *Geotrichum* species พบว่า PMF ที่แยกได้จากน้ำมันหอมระเหยของส้มที่มีรสหวาน และส้มที่มีรสเปรี้ยวมีสมบัติการต้านการเจริญของเชื้อราดังนี้ *P. digitatum* ได้ 100 % และ 77 % , *P. citrophthora* 14 % และ100 % และ *Geotrichum species* 34% และ 57 % ตามลำดับ

Jayaprakasha และ คณะ(2000) ศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulata*) เปรียบเทียบการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ คือ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม อะซิโตน ส่วนที่ละลายในเอธานอล (ethanol soluble fraction) และส่วนที่ไม่ละลายในเอธานอล (ethanol insoluble fraction) นำสารสกัดเหล่านั้นมาทดสอบสมบัติการต้านจุลินทรีย์ด้วยการหาค่า MIC พบว่า สารสกัดจากเปลือกส้มในส่วนที่ละลายในเอทานอล (ethanol soluble fraction) มีประสิทธิภาพในการต้านที่ดีที่สุดกับแบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus* , *B. coagulans* , *B. subtills* และ *Staph. aureus* ) และแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* , *Pseu. aeruginosa*) และตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัดจากเปลือกส้มในส่วนที่ละลายในเอทานอลโดยการแยกลำดับส่วนของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดด้วย silica gel column และวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบด้วยวิธี NMR และ mass spectra พบสารประกอบ polymethoxylated flavone (PMF) 3 ชนิด คือ เดสเมทิลโนบิเลติน (desmethlnobiletin) โนบิเลติน (nobiletin) และ แทนเจริติน (tangeretin) (Kandaswami *et al.*, 1991)

Duffy และ Power(2001) ศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวาน (pericardium *Citri reticulatae*) ที่สกัดด้วยเอทานอล 60 % การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC) ของสารสกัดดังกล่าว พบว่า ค่า MIC ของสารสกัดที่ใช้คือ 50 และมากกว่า 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีสมบัติการต้านแบคทีเรียแกรมบวก (*B. subtills*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) ตามลำดับ และไม่มีผลการต้านเชื้อรา (*A. niger* และ *A .awamori*)

Suri และคณะ (2002) ศึกษาการใช้สารสกัดจากมะกรูด (*Citrus hystrix*) ที่สกัดด้วยเมธานอลต่อสมบัติการต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* , *Proteus vulgaris* และ *Klebsiella pneumoniae*) และแบคทีเรียแกรมบวก (*Staph. aureus* , *B. cereus* , *B. subtills* , *Streptococcus lactis* และ *S. thyposa*) ฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของมะกรูด (ใบ เปลือก น้ำมะกรูด และ callus) คือ นาริงจิน รูติน เฮสเปอริดิน เควอร์เซติน และแคมเฟอรอล จากผลการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่า ฟลาโวนอยด์ทุกชนิดที่กล่าวถึงสามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis* และ *Strep. lactis* ส่วนเฮสเปอริดิน และ เควอร์เซติน สามารถต้านการเจริญของ *Staph. aureus* และ *S. thyposa* ได้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง


Jusoh และคณะ (2002) ได้ศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเมล็ด *Citrus mitis* ที่สกัดด้วยเมธิลแอลกอฮอล์ สามารถให้ผลต้านแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ (*B. subtilis , Staph. aureus, P. vulgaris , S. thyposa , K. pneumoniae , E. coli* และ *Pseu. aeruginosa)* และเชื้อรา 1 สายพันธุ์ (*Candida albicans*) พบว่า หลังการบ่ม 12 ชั่วโมง การใช้สารสกัดดังกล่าว 1.5 มิลลิกรัม สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้ทั้งหมด และตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบที่มีอยู่ในสารสกัดโดยใช้ HPLC (high performance liquid chromatography) พบสารฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในสารสกัดของพืชตระกูลส้มที่สกัดด้วยเมธิลแอลกอฮอล์ได้แก่ นาริงจิง รูโทไซด์ และเฮสเปอริดิน

Saleem และคณะ(2003) ศึกษาผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยไอน้ำจากเปลือกพืชตระกูลส้ม 4 สายพันธุ์ คือ *Citrus paradisi , Citrus aurantiifolia , Citrus reticylata* และ *Cymbopogon citratue* ทดสอบสมบัติต้านการเจริญของจุลินทรีย์ดังนี้ *T.longiformis , Fusarium solani , F. moniliforme , Microsporum canis , A. flavus , Pseu. aeruginosa , S. typhi , B. subtilis , Staphy. aureus* และ *Strep. pyogenes* จากผลการทดลองพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกพืชตระกูลส้มทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถต้านการเจริญของ *T. longiformis , F. moniliforme , A. flavus , S. typhi* และ *S. pyogenes* ได้

Quintero และคณะ (2003) ศึกษาองค์ประกอบและชีวกิจกรรม (biological activity) ของน้ำมันหอมระเหยจากส้มที่มีรสเปรี้ยว *Citrus aurantium* amara โดยนำส่วนเปลือก (cortex) ของส้มมาสกัดเอาน้ำมันหอมระเหย ด้วยวิธี cold pressing จากการนำน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้มาทดสอบการต้านการเจริญของแบคทีเรีย พบว่า ไม่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของ *E. coli* และ *Pseudomonas.* spp. แต่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของ *Staphy. aureus* และจากการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหยโดยวิเคราะห์จาก GC (gas chromatography) และ GC-Mass spectroscopy พบสารประกอบโมโนเทอร์พีน (monoterpenes) [ลิโมนีน (limonene) 77.90% เบต้าไพนีน (β-pinene) 3.40% ไมริซีน (myricene) 1.81% และทรานโอซิเมน (trans-ocimen) 1.16%] อัลดีไฮด์ (aldehydes) แอลกอฮอล์ (alcohols) ลินาโนน (linalool) และนูตคาโตน (nootkatone)

สารประกอบลิโมนีน (limonene) เป็นสารพฤกษเคมีที่พบในเมล็ดพืชตระกูลส้ม มีสมบัติในการต้านการเจริญของแบคทีเรีย (*Azotobacter* sp. , *Strep. faecalis* และ *Pseu. aeruginosa*) และเชื้อรา (*Mucor* sp. , *Penicillium* sp. , *Aspergillus* sp. และ *Trichoderma* sp.) (Nelrotti *et al.*, 1996) ลิโมนีนที่อยู่ในส้ม *Citrus reticulata* Blanco ยังมีสมบัติในการต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งในมนุษย์ (Tian *et al.*, 2001) และเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลองได้ดีอีกด้วย (Braddock and Cadwallader, 1998)

สำหรับฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อรานั้น พบว่า มีฟลาโวนอยด์เพียงน้อยชนิดที่มีผลต้านการเจริญของเชื้อราและออกฤทธิ์กับเชื้อราน้อยชนิด

63253

## 2.8 การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลินทรีย์ (sensitivity test)

การสกัดและการศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ (antimicrobial activities) ของสมุนไพร มีข้อควรคำนึงถึง คือ วิธีการสกัด ชนิดและแหล่งของเชื้อที่ใช้ อายุและปริมาณของเชื้อที่ใช้ทดสอบ และชนิดของวิธีการทดสอบ

การประเมินประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์ทำได้หลายวิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลินทรีย์ก็เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถทดสอบได้ ซึ่งได้รับความนิยมหลังจากมีการผลิตยาต้านจุลินทรีย์ขึ้นเพื่อใช้ทางการค้าอย่างกว้างขวาง การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลินทรีย์มีหลายวิธีที่นิยมกันได้แก่

### 2.8.1 การทดสอบด้วยการให้สารแพร่ในอาหารวุ้น (agar diffusion method)

อาศัยหลักการแพร่ซึม (diffusion) โดยสารละลายที่ต้องการทดสอบจะแพร่จากจุดเริ่มต้นออกไปในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์จะเป็นสัดส่วนกับระยะทางที่แพร่ออกไป ดังนั้นในความเข้มข้นหนึ่งจะพบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้โดยปรากฏเป็นโซนใส (inhibition zone) หลังจากบ่มครบเวลาที่กำหนด ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสเป็นหน่วยมิลลิเมตรนี้ บอกถึงความสามารถของสารต้านจุลินทรีย์ว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้มากน้อยเพียงใด แต่ถ้าไม่เกิดโซนใสหรือโซนใสขนาดเล็กกว่ากำหนดจะถือว่าเชื้อดื้อยา (resistance) คือ สารนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์น้อย หรือไม่มีฤทธิ์เลย และขนาดของโซนใสจะขึ้นกับสมบัติทางเคมีกายภาพ (physico-chemical properties) ของสารแต่ละชนิดซึ่งมีผลให้อัตราการซึมผ่านวุ้น (diffusion rate) ต่างกัน

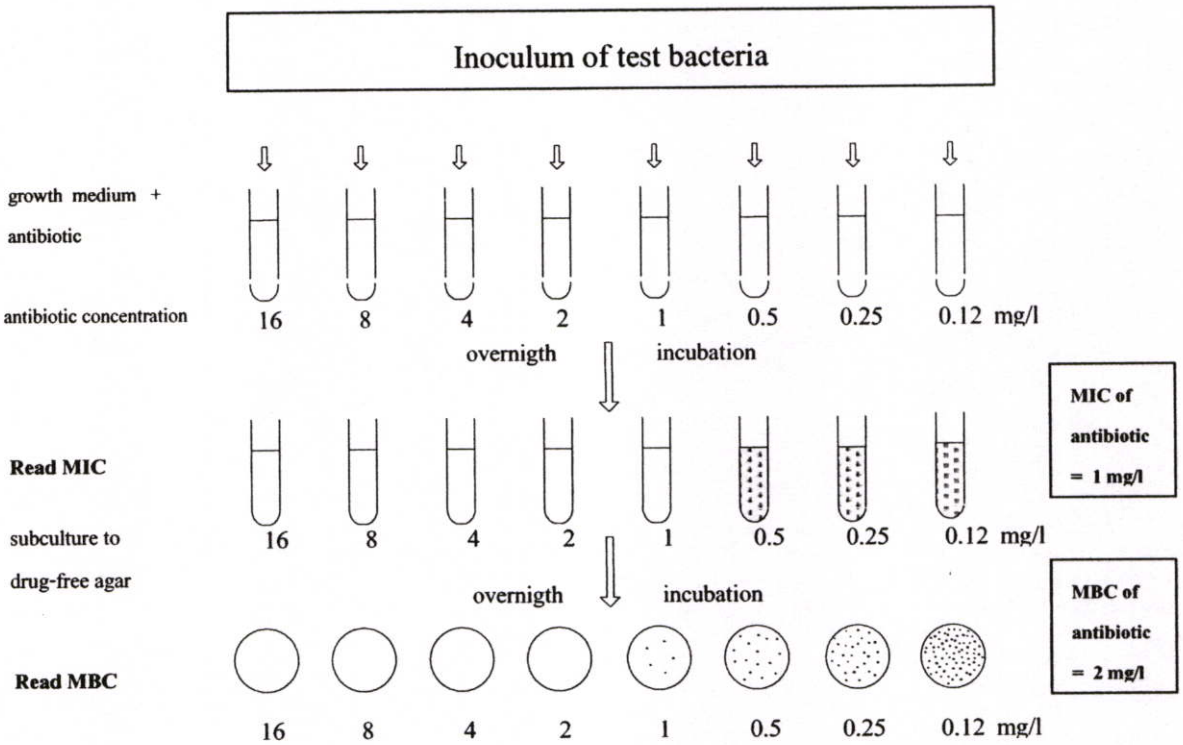
วิธีนี้ทำได้หลายรูปแบบขึ้นกับชนิดของสิ่งรองรับ และมักเรียกชื่อวิธีการตามสิ่งรองรับที่ใช้ เช่น สิ่งรองรับที่เป็นหลุมซึ่งได้จากการเจาะหลุมในอาหารวุ้น แล้วเติมสารละลายที่จะทดสอบลงไปจะเรียกว่าวิธี agar-well diffusion method สิ่งรอบรับเป็นกระดาษซับกลมซึ่งหยดสารละลายก่อนวางบนอาหารวุ้นจะเรียกว่า วิธี agar-disk diffusion method สิ่งรองรับเป็นถ้วยโลหะปลอดสนิมทรงกระบอกจะเรียกว่า cup diffusion method ฯลฯ โดยทั่วไป การใช้สิ่งรองรับที่เป็นกระดาษซับกลมจะเป็นที่นิยมมากที่สุด แต่ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดใช้สิ่งรองรับที่เป็นหลุมเจาะหรือถ้วยจะให้ผลเด่นชัดกว่า

ในขั้นต้นของการตรวจสอบศักยภาพการต้านจุลชีพของสารสกัด ใช้วิธีนี้จะสะดวกที่สุดและง่ายที่สุดทั้งนี้ด้วยการใช้เชื้อทดสอบสายพันธุ์อ้างอิงในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ดีสำหรับสารประกอบออกฤทธิ์ต้านเชื้อที่มีโมเลกุลใหญ่หรือแพร่ซึมยาก อาจตรวจสอบไม่พบการออกฤทธิ์เพราะไม่มีบริเวณใสเกิดขึ้นให้เห็น ควรใช้วิธีการเจือจางโดยนำสารสกัดที่ทดสอบมาเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution method) หรือการเจือจางในอาหารแข็ง (agar dilution method) ซึ่ง

กล่าวถึงการเจือจางในอาหารเหลวอย่างเดียวในหัวข้อถัดไป หลังจากได้ข้อมูลการต้านเชื้อของสารสกัดด้วยวิธีนี้แล้ว ควรดำเนินการตรวจหาค่า MIC หรือ MBC ของสารสกัดด้วยเพื่อใช้ประโยชน์ของค่าดังกล่าวในการตรวจสอบขั้นต่อไป

**2.8.2 การหาความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimal inhibitory concentration, MIC) โดยเทคนิคการเจือจางในอาหารเหลว**

เทคนิคการเจือจางในอาหารเหลวเป็นวิธีแรกที่นำมาใช้ในการหาค่า MIC และยังคงใช้อยู่ในปัจจุบัน วิธีนี้อาศัยหลักการการติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ปริมาณคงที่ในสารละลายต้านจุลินทรีย์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ โดยทำ 2-fold dilution ตามลำดับ มีหลอดควบคุม (control) เป็นอาหารเหลวที่ไม่มีสารต้านจุลินทรีย์ แล้วนำเชื้อที่ทดสอบในปริมาณที่เหมาะสม ใส่ลงสารละลายที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในปริมาณที่เท่ากันไปบ่มที่อุณหภูมิในเวลาที่กำหนด นำมาสังเกตความขุ่นโดยความขุ่นที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่า เชื้อจุลินทรีย์ไม่ถูกยับยั้งการเจริญ โดยยาหรือสารละลายที่คาดว่ามีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นนั้นๆ จุดตัดสิน (break point) คือ ระหว่างความเข้มข้นของสารที่แสดงผลเป็นสารละลายใส กับความเข้มข้นของสารที่แสดงผลเป็นสารละลายขุ่น จุดนี้เรียกว่า minimal inhibitory concentration (MIC) เป็นระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในหลอดทดลอง (in vitro) ได้ ถ้าเป็นการทดสอบกับยาจะรายงานผลเป็นหน่วยไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อได้ค่า MIC มาแล้วให้นำความเข้มข้นของสารที่แสดงผลเป็นสารละลายใสระดับสุดท้ายตามลำดับก่อนที่จะถึงความเข้มข้นของสารที่แสดงผลเป็นค่า MIC ขึ้นไป นำมาแตะบนอาหารวุ้น ภายหลังการบ่มเพาะ สังเกตว่ามีหรือไม่มีเชื้อเจริญขึ้นมา และดูว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่เชื้อเจริญหรือเกือบไม่เจริญ (99.9% ถูกทำลาย) ค่าที่ได้ถือว่าเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (ถ้าเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรียจะเป็น minimal bactericidal concentration, MBC และถ้าเจาะลงกับเชื้อราจะเป็น minimal fungicidal concentration, MFC) นำค่าที่ได้นี้ไปเปรียบเทียบกับค่า MIC ถ้าค่าทั้งสองเท่ากันหรือไม่เกินสองความเข้มข้น แสดงว่าสารสกัดมีศักยภาพฆ่าเชื้อ แต่ถ้าต่างกันหลายความเข้มข้น แสดงว่าสารสกัดมีศักยภาพเฉพาะยับยั้งการเจริญของเชื้อ ภาพที่ 2.7 แสดงวิธีการทดสอบหาค่า MIC และ MBC




**ภาพที่ 2.7** วิธีทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อ (MBC)

ที่มา : Mims และคณะ (2004)

## 2.9 เชื้อจุลินทรีย์ที่พบในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

การเสื่อมเสียของเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ส่วนใหญ่มักมีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในระหว่างการฆ่า ตัดแต่งเนื้อสัตว์จากส่วนภายนอกและระบบทางเดินอาหารของสัตว์ และยังมีการปนเปื้อนจากอากาศ ภาชนะบรรจุ มีด เขียง และคนงานอีกด้วย หรือหลังจากกระบวนการแปรรูป เนื่องจากมีจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ จึงทำให้พบจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์หลายชนิดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนเหล่านั้นเหล่านั้นจะเริ่มแทรกตัวเข้าไปในเนื้อเยื่อสัตว์ก่อความเสื่อมเสียที่แตกต่างกันไป

ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักจะพบแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ต่อกระบวนการหมักและแบคทีเรียที่ก่อความเสื่อมเสียแก่ผลิตภัณฑ์ บางชนิดเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคทางเดินอาหาร และบางสายพันธุ์ใช้เป็นดัชนีสุขาภิบาลบ่งบอกถึงการขาดการควบคุมระบบสุขลักษณะที่ดี หรือกระบวนการผลิตไม่ถูกต้อง

**2.9.1 เชื้อ *Lactobacillus plantarum***

*Lactobacillus plantarum* เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อนค่อนข้างยาว มักเรียงต่อเป็นรูปโซ่ เป็นพวกต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญ (microaerophilic) สลายน้ำตาลแล้วให้กรดแลกติกเป็นส่วนใหญ่ ติดสีแกรมบวก อาจจะเปลี่ยนเป็นแกรมลบเมื่ออายุมากและมีกรดสูง ไม่สร้างสปอร์และเอนไซม์คาตาเลส (สุมาลี, 2535) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตทั่ว ๆ ไป 30-40 องศาเซลเซียส ช่วงอุณหภูมิในการเติบโตอยู่ที่ 5-53 องศาเซลเซียส ค่า pH ที่เหมาะสมโดยปกติ 5.5-5.8 หรือต่ำกว่า การเติบโตที่ค่า pH ที่เป็นกลางหรือเริ่มเป็นด่าง ระยะแรกของการเจริญเติบโตจะยาวขึ้นหรือการเจริญเติบโตจะชะลอลง เชื้อในกลุ่มนี้จึงเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการหมักดอง

**2.9.2 เชื้อ *Pediococcus pentosaceus***

*Pediococcus pentosaceus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างกรดแลกติก รูปร่างกลมอยู่กันเป็น 4 หรือเป็นคู่ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เป็นพวกต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญเติบโต ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส การหมักเป็นแบบโฮโมแลกติก (Klaenhammer, 1993) หมักน้ำตาลให้กรด 0.5-0.9 % ส่วนใหญ่เป็นกรดแลกติก พบมากในอาหารหมักไม่ค่อยเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส พบได้ในชีส ไส้กรอกหมัก และในปากของมนุษย์

**2.9.3 เชื้อ *Escherichia coli*** (พงษ์เทพ, 2540)

*E. coli* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม coliforms ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบตัวเซลล์ (peritrichous flagella) ไม่สร้างสปอร์ เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในที่มีอากาศ (aerobic) หรือเจริญได้ทั้งในที่มีอากาศและมีอากาศน้อย (facultative anaerobe) พบเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ซึ่งอาศัยอยู่บริเวณลำไส้เล็กตอนปลาย และบริเวณลำไส้ใหญ่ของคนและสัตว์เลือดอุ่น จึงมักใช้เป็นดัชนีสุขาภิบาลที่บอกถึงการปนเปื้อนจากอุจจาระในน้ำและอาหาร โดยอาจเกิดจากการขาดการควบคุมระบบสุขลักษณะที่ดี หรือกระบวนการผลิตไม่ถูกต้อง การบ่งชี้ดังกล่าวนอกจากจะบอกถึงความสะอาดแล้วยังบอกถึงอัตราการเสี่ยงต่อการเกิดโรคจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่พบในระบบทางเดินอาหาร เช่น *Salmonella* spp. , *Shigella* spp. , *Vibrio* spp. , *Staph. aureus* เป็นต้น นอกจากนี้ *E. coli* บางสายพันธุ์ยังถูกจัดไว้ในกลุ่ม enterovirulent *E. coli*

**2.9.4 เชื้อ *Salmonella* Anatum** (อรุณ, 2544)

*Salmonella* spp.จัดเป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ (food-borne disease) ที่สำคัญชนิดหนึ่ง ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Enterobacteriaceae ซึ่งมีสายพันธุ์ต่าง ๆ กันมากมายกว่า 2,000 serotypes แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ขนาดประมาณ 0.5 x 1.3 μ ติดสีแกรมลบหรือ ติด

สีแดงเมื่อทำการย้อมเซลล์โดยวิธีแกรม เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะมีลักษณะเหมือนแบคทีเรีย *E. coli* สามารถเจริญได้ทั้งในที่มีอากาศและมีอากาศน้อย (facultative anaerobe) ไม่สร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนไหวได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซล (peritrichous flagella) และบางสายพันธุ์ไม่มีแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลจึงไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ เช่น *S. gallinarum* และ *S. pullorum* เชื้อซาลโมเนลลา สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบพื้น ๆ โดยทั่วไป สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสและแมนิทอลได้ แต่ไม่สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลซูโครส แลคโทส และซอร์โบส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอสเฟต แบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่สามารถสร้างอินโดล (indole) และไม่สามารถย่อยสลายยูเรีย มีปฏิกิริยาออกซิเดส (oxidase) เป็นลบ ส่วนใหญ่สามารถใช้ซิเตรท (citrate) เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ แต่ละสายพันธุ์และซีโรไทป์ (serotype) มีความสามารถในการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์แตกต่างกัน ซาลโมเนลลาแบ่งออกเป็นซีโรไทป์ต่าง ๆ ตาม antigenic structure (H, O และ Vi) แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นปรสิตของระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นเชื้อโรคในคนและสัตว์ และพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ การเกิดอาการอาหารเป็นพิษ เนื่องจากการกินอาหารที่มีเชื้อนี้ในปริมาณที่มากพอที่จะแสดงอาการ

*S.* Anatum ทำให้เกิดอาการ Gastroenteritis โดยเชื้อติดเข้าไปกับอาหารประเภท เนื้อสัตว์ ไข่ นม เมื่อรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป เชื้อจะแทรกเข้าไปอยู่ในเยื่อบุลำไส้ใหญ่และลำไส้เล็กส่วนกลางระยะฟักตัวของเชื้อประมาณ 8-24 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการอักเสบ ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง มีไข้เล็กน้อย

ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น เนื้อสัตว์ ไข่ มีโอกาสมากที่จะถูกปนเปื้อนด้วยเชื้อนี้ที่ติดมากับอุจจาระของสัตว์โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีเชื้อซาลโมเนลลาหลายชนิดที่เมื่ออยู่ในร่างกายของสัตว์แล้วสัตว์ไม่แสดงอาการเป็นโรค แต่จะเป็นพาหะของโรคโดยจะขับถ่ายอุจจาระที่มีเชื้อนี้ออกมาเมื่อถ่ายทอดไปสู่คนทำให้คนแสดงอาการของที่รุนแรงได้ นอกจากนี้ยังอาจได้รับเชื้อทางอ้อมจากการกินอาหารที่ผ่านการปรุงที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ผู้ปรุงอาหารที่มีเชื้อโรคนี้ก็เป็นตัวการสำคัญทำให้เกิดการแพร่กระจายของโรคผ่านทางอาหารไปสู่ผู้อื่น

### 2.9.5 เชื้อ *Listeria innocua*

เชื้อแบคทีเรีย *L. innocua* และ *L. monocytogenes* สามารถพบได้ในอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปที่ไม่สะอาด และเชื้อนี้แพร่กระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ในมูลสัตว์ และอุจจาระของคน ในน้ำเสีย ดิน แหล่งน้ำ ผักและหญ้าหมัก ตลอดจนในเนื้อดิบและอาหารที่แช่เย็น เชื้อ Listeria ทั้ง 2 สกุล มีการจัดลำดับของจีโนม (genomes) ที่เหมือนกันจึงทำให้มีลักษณะทางพันธุ์กรรม (genetic) ที่คล้ายกัน โดยจะต่างกันที่ *L. monocytogenes* เป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคลิสเทอริโอซิส (listeiosis) ในคน ส่วน *L. innocua* เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ได้ก่อโรคในคน (no diseases)

*L. innocua* จึงเป็นสายพันธุ์ที่มีความปลอดภัยต่อการนำมาวิจัยและสามารถนำมาเทียบเคียงกับ *L. monocytogenes* ได้เพราะมีลักษณะทางพันธุ์กรรมที่เหมือนกัน ลักษณะและรูปร่างของ

*L. innocua* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างท่อนหรือค่อนข้างกลม (bacilli or coccobacilli) และเมื่อย้อมสีแบบแกรมอาจเห็นการจัดเรียงตัวอยู่ในรูปอักษรจีน (Chinese letter) (Eley, 1992) ปลายเซลล์มีขนาด 0.4 – 0.5 x 0.5 – 0.2 ไมโครเมตร โดยปกติจะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรือเป็นสายสั้นๆ ในอาหารเหลวเชื้อจะมีรูปร่างกลมทำให้สับสนกับ streptococci ได้ เชื่อที่มีอายุมากจะมีการเรียงตัวเป็นเส้นสาย (filamentous) ยาว 6 - 20 ไมโครเมตร สามารถเจริญได้ทั้งในที่มีอากาศและมีอากาศน้อย (facultative anaerobe) ไม่สร้างแคปซูล สามารถเคลื่อนที่ได้ในอาหารเหลว จะมีลักษณะเฉพาะคือเคลื่อนที่กลับไปกลับมา (tumbling motility) ซึ่งจะสังเกตได้ชัดเจนใน tryptose broth ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และเมื่อปลูกเชื้อโดยการเข็มเขี่ย (stap) ลงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semisolid medium) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 – 25 องศาเซลเซียส จะเห็นการเคลื่อนที่แบบร่ม (umbrella like) โดยเห็นเป็นรัศมีแผ่ออกรอบๆ รอยที่ปลูกเชื้อคล้ายร่มกาง ซึ่งจะอยู่ต่ำกว่าผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 – 5 มิลลิเมตร แต่ถ้าเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การพัฒนาแฟลกเจลลาจะไม่ดีทำให้ไม่เห็นการเคลื่อนที่ (Ryser and Marth, 1991) เชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง โคโลนีจะมีลักษณะกลม ขอบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี 0.5 – 1.5 มิลลิเมตร โคโลนีมีเนื้อสัมผัสละเอียด

**2.9.6 เชื้อ *Staphylococcus aureus***

*Staph. aureus* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Micrococcaceae รูปร่างกลม (cocci) เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 ไมโครเมตร มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ เป็นคู่หรือเป็นกลุ่มคล้ายรวงผึ้งหรือพวงองุ่น ติดสีแกรมบวก (gram positive) ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ สามารถเจริญได้ทั้งในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (aerobe, anaerobe) สามารถใช้น้ำตาลสำหรับการเจริญได้หลายชนิด สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือสูงถึง 10% และสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส โปรติเอสและเพนนิซิเลสได้ นอกจากนี้ยังสามารถทนต่อการถูกทำลายด้วยความร้อน และอยู่ในสภาพที่แห้งหรือ water activity ($a_w$) ต่ำได้ดี *Staph. aureus* เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ตามผิวหนัง โพรงจมูก ลำคอ ของผิวหนังคนและสัตว์ ด้วยเหตุนี้จึงมักทำการตรวจหาเชื้อนี้ในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งถ้าตรวจพบเชื้อดังกล่าวในผลิตภัณฑ์ จะบ่งชี้ถึงขั้นตอนการผลิตอาจมีการปนเปื้อนจากการสัมผัสของผู้สัมผัสอาหาร (food handling) จึงถือได้ว่าเชื้อ *Staph. aureus* เป็น skin index microorganism ที่บ่งชี้ถึงสุขลักษณะส่วนบุคคลของการผลิตอาหาร นอกจาก *Staph. aureus* จะเป็นจุลินทรีย์บ่งชี้สุขลักษณะส่วนบุคคลแล้ว เชื้อดังกล่าวเมื่อปนเปื้อนลงในอาหารแล้ว ถ้าสามารถเจริญในอาหารได้ดี จะมีการสร้างสารที่เรียกว่าเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร ซึ่งเอนเทอโรทอกซินนี้เป็นสารที่ทนต่อการทำลายด้วยความร้อนดี ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษกับผู้บริโภคได้ ดังนั้นการตรวจหาเชื้อ *Staph. aureus* ในผลิตภัณฑ์อาหาร นอกจากจะบอกถึงสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่ดีแล้ว ยังบอกถึงอัตราการเสี่ยงหรือสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษเมื่อตรวจพบเชื้อนี้ในอาหาร

# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## 3.1 วัตถุดิบ

### 3.1.1 กระเจี๊ยบแดง เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน

กระเจี๊ยบแดงแห้งและส้มเขียวหวานซื้อจากตลาดสดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร สำหรับนำส้มเขียวหวานจะนำมาแยกเปลือกและเมล็ดเก็บไว้ใช้ในการทดลอง

### 3.1.2 สารเคมี

| | | |
|---|---|---|
| - ปิโตเลียมอีเธอร์จุดเดือด 40-60 °ซ | BHD | อังกฤษ |
| - เอทิลแอลกอฮอล์ 95 % | องค์การสุราสรรพสามิต | ไทย |
| - ไดเมททิลซัลฟอกไซด์ 99.5% GC | Sigma | เยอรมันนี |

### 3.1.3 เชื้อจุลินทรีย์

- *Escherichia coli* JM 109
- *Salmonella anatum* (WHO Salmonella-Shigilla Center) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
- *Staphylococcus aureus* ATCC 12600
- *Listeria innocua* ATCC 33090
- *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917
- *Pediococcus pentosaceus* JCM 5890

### 3.1.4 ยาต้านจุลชีพ

| | | |
|---|---|---|
| - Chloramphenicol 30 µg. | Oxoid | อังกฤษ |

### 3.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ

| | | |
|---|---|---|
| - Trypticase Soy Agar slant, plate | Merck | เยอรมันนี |
| - Trypticase Soy Broth | Merck | เยอรมันนี |
| - MRS agar | Merck | เยอรมันนี |
| - MRS broth | Merck | เยอรมันนี |
| - Yeast Extracts (YE) | Oxoid | อังกฤษ |
| - Agar | S.P.science | ชิลี |

| | | |
|---|---|---|
| - Meat extract | Merck | เยอรมันนี |
| - Tryptone | Merck | เยอรมันนี |
| - Glucose | SP scientific | ชิลี |

## 3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

### 3.2.1 อุปกรณ์ในการเตรียมวัตถุดิบ

| | | |
|---|---|---|
| - ตู้อบรมร้อน | Memmert 854 Schwabach | เยอรมันนี |
| - ถาดอะลูมีเนียม | | |

### 3.2.2 อุปกรณ์ในการเตรียมสารสกัด

| | | |
|---|---|---|
| - เครื่องสกัดไขมัน | Soxhlet apparatus BUCHI810 | สวิสเซอร์แลนด์ |
| - เตาหลุมให้ความร้อน | Electro thermal EME60500 | อังกฤษ |
| - เครื่องทำความเย็น | Cooling รุ่น CBD 1 | ไทย |
| - เครื่องระเหยสูญญากาศ | Rotavapor BUCHI R-114 | สวิสเซอร์แลนด์ |
| - เครื่องบดหยาบ | Blender MX-T 110N | ไต้หวัน |
| - เครื่องชั่งชนิดละเอียด | MettlerAE3000 | สวิสเซอร์แลนด์ |
| - ปั๊มสูญญากาศ | Vacuum system BUCHI B-169 | สวิสเซอร์แลนด์ |
| - อ่างควบคุมอุณหภูมิ | Water bath BUCHI B-480 | สวิสเซอร์แลนด์ |
| - ตู้อบลมร้อน | Memmert | เยอรมันนี |
| - เครื่องเขย่า (shaker) | Gerhardt Bonn | เยอรมันนี |
| - ไลโอฟิไลเซอร์ (lyophylizer) | LP-54620 | สหรัฐอเมริกา |

### 3.2.3 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์ผลทางด้านจุลินทรีย์

| | | |
|---|---|---|
| - Autoclave | Tomy SS-325 | ญี่ปุ่น |
| - ตู้บ่มเชื้อ | Memmert | เยอรมันนี |
| - ตู้อบฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว | Heraeus | เยอรมันนี |
| - ตู้ Lamina | Microflow ABS-1200 | สหรัฐอเมริกา |
| - Vortex | VM-300 | สหรัฐอเมริกา |
| - ไมโครเวฟ | LG Ms-1822C | จีน |
| - ไมโครปิเปต | Eppendorf Research | สหรัฐอเมริกา |
| - water bath | Memmert | เยอรมันนี |
| - Millipore | millex-GP(33 mm) | ญี่ปุ่น |

## 3.3 สถานที่ดำเนินงาน

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## 3.4 วิธีดำเนินงาน

### 3.4.1 การเตรียมวัตถุดิบ

**3.4.1.1** กระเจี๊ยบแดง นำดอกกระเจี๊ยบแดงแห้ง มาอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จนมี ความชื้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 7 – 10% จากนั้นเก็บตัวอย่างแห้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

**3.4.1.2** เปลือกส้มหรือเมล็ดส้มเขียวหวาน นำเปลือก หรือเมล็ดส้มเขียวหวานมาล้างให้สะอาดตากแดดเป็นเวลา 12 ชั่วโมงจนมีความชื้นอยู่ในช่วง 14-15% จากนั้นนำมาอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนมีความชื้นสุดท้ายน้อยกว่า 5% นำเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานมาบดหยาบด้วยเครื่องบดหยาบ (blender MX-T 110N) แล้วชั่งน้ำหนักตัวอย่างละ 10 กรัม สกัดเอาไขมันออกโดยใช้เครื่อง Soxhlet และใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวสกัด ใช้เวลาสกัด 2 ชั่วโมง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกจากตัวอย่างเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน โดยตั้งทิ้งไว้ในตู้ดูดควันเป็นเวลา 30 นาที เก็บตัวอย่างแห้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

### 3.4.2 การเตรียมสารสกัด

**3.4.2.1** การเตรียมสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง ชั่งกระเจี๊ยบแดงแห้งที่บดละเอียดแล้ว 25 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมเอทิลแอลกอฮอล์ (80%) ปริมาณ 250 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเขย่าเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำสารที่สกัดได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 โดยใช้กรวยกรองบุชเนอร์ เอาส่วนกากมาทำการสกัดอีกครั้ง (re-extraction) โดยเข้าเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 คืน กรองและนำสารสกัดที่กรองได้ทั้งสองครั้งมารวมกันไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสูญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนตัวทำละลายหมดไป นำไปทำให้แห้งโดยใช้ ไลโอฟิไลเซอร์ (lyophylizer) จากนั้นเก็บตัวอย่างที่สกัดได้ไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

**3.4.2.2 การเตรียมสารสกัดจากเปลือกหรือเมล็ดส้มเขียวหวาน** นำเปลือกหรือเมล็ดส้มเขียวหวานที่ผ่านการสกัดเอาไขมันออกแล้ว ชั่งน้ำหนักตัวอย่างละ 10 กรัม ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเอทิลแอลกอฮอล์ (95%) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สกัดโดยวิธีการรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่งโมง กรองสารกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 โดยใช้กรวยกรองบุชเนอร์ นำสารที่สกัดได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสูญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนตัวทำละลายหมดไปจากนั้นเก็บตัวอย่างที่สกัดได้ไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20°ซ จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

**3.4.3 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ**

**3.4.3.1 เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดความเสื่อมเสีย**ได้แก่ *Escherichia coli, Salmonella anatum, Staphylococcus aureus,* และ *Listeria innocua* เก็บเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง TSAYE [Trypticase soy agar (Merck) + 0.6% yeast extract (Oxoid)] นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSBYE[Trypticase soy broth (Merck) + 0.6% yeast extract (Oxoid)] เป็นเวลา 20- 24 ชั่วโมง ก่อนทำการศึกษา

**3.4.3.2 เชื้อแบคทีเรียแลกติก**ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* เก็บเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MRS ager (Merck) นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth (Merck) เป็นเวลา 20- 24 ชั่วโมง ก่อนทำการศึกษา

**3.4.4 ศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน**

ในการศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานใช้วิธี agar-well diffusion method (ดัดแปลงจากวิธีที่รายงานโดย Carran *et al.,* 1987 ; Perez *et al.,* 1990) ซึ่งอาศัยหลักการแพร่ซึมของสารละลายที่ทดสอบโดยหยดสารละลายที่ต้องการตรวจสอบลงในหลุม (well) บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ ภายหลังระยะการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (inhibition zone) หน่วยเป็นมิลลิเมตร ความกว้างของโซนใสบอกถึงความสามารถของสารละลายที่ตรวจสอบมีสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์

ในการศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานใช้จุลินทรีย์ที่ทดสอบ 6 สายพันธุ์ โดยมี ชุดควบคุมตัวทำละลาย (solvent control) คือ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile distilled water) และ DMSO 10% (sigma) และ ชุดควบคุม

ทางยา (drug control) คือ คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) 30 ไมโครกรัม (oxiod) เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบ โดยขั้นตอนของการทดสอบมีดังนี้

**3.4.4.1 การเตรียมสารละลายสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง**

แบ่งสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่ผ่านการทำแห้งโดยไลโอฟิไลซ์ (lyophylize) ใช้ตัวทำละลาย คือ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ เตรียมให้ได้ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (stock solution) จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรอง ก่อนนำไปเจือจางในอัตราส่วน 1:2 (2-fold dilution) จนได้ความเข้มข้น 5 ระดับ โดยมีชุดควบคุมให้ผลเชิงลบ (negative control) คือ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และชุดควบคุมให้ผลเชิงบวก (positive control) คือ คลอแรมเฟนิคอล 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

**3.4.4.2 การเตรียมสารละลายสารสกัดจากเปลือกหรือเมล็ดส้ม**

ผสมสารสกัดจากเปลือกหรือเมล็ดส้มเขียวหวานกับ 100% DMSO ในอัตราส่วน 20 กรัมต่อ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile distilled water) ในอัตราส่วน 1:10 ให้ได้ความเข้มข้น 2 กรัม/มิลลิลิตร (stock solution) ทำการเจือจางในอัตราส่วน 1:2 จนได้ความเข้มข้น 5 ระดับ โดยมีชุดควบคุมให้ผลเชิงลบ คือ 10% DMSO และชุดควบคุมให้ผลเชิงบวก (positive control) คือ คลอแรมเฟนิคอล 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

**3.4.4.3 เตรียมแบคทีเรียทดสอบ**

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (pure culture) ลงในหลอดอาหารเหลว TSBYE สำหรับแบคทีเรีย และ MRS broth ใช้เลี้ยงแบคทีเรียแลกติก (lactic acid bacteria, LAB) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง โดยถ่ายเชื้อต่อเนื่อง 2 ครั้ง

**3.4.4.3 การเตรียมจานเพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบ (seed plate)**

โดยใช้เทคนิค pour plate เตรียมจานเพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบโดยหลอมอาหาร TSAYE สำหรับแบคทีเรียที่ก่อความเสื่อมเสียได้แก่ *E. coli*, *S.* Anatum, *Staph. aureus* และ *L. innocua* และMRS agar สำหรับ LAB ได้แก่ *Lb. plantarum* และ *P. pentosaceus* ใช้ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อจานเพาะเลี้ยง เทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ปิเปตสารแขวนลอยของเซลล์ $10^6$ เซลล์ รอให้อาหารแข็ง แล้วใช้ cork borer เบอร์ 3 เจาะหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ หยอดสารละลายสารสกัดที่จะทดสอบปริมาณ 150 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้สารแพร่ในชั้นอาหารเลี้ยงเชื้อ ก่อนนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับแต่ละความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดที่ทดสอบต่อเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด การแปรผลทดสอบใช้เวอร์เนียวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส (inhibition zone) ซึ่งแสดงถึงบริเวณที่เชื้อไม่เจริญรอบหลุมโดยต้องแสดงผลที่สอดคล้องกับมาตราฐาน ทำการวัด 2 ระนาบ และรายงานผลค่าเฉลี่ยของโซนใสต้องมีขนาดมากกว่า 1 มิลลิเมตร

**3.4.5 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทรีย์ (minimum bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัด**

ในการวิเคราะห์หา MIC และ MBC จะใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Mims และ คณะ (2004) และ Treagan และ Pulliam (1982) จากสารสกัดทั้ง 3 ชนิด โดยเจือจางสารสกัดในอาหารเหลว (broth dilution method) ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ แล้วใส่เชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ ภายหลังการบ่ม สังเกตความขุ่นใสในอาหารเหลว ดูความเข้มข้นใดที่ต่ำที่สุด (ซึ่งมาจากการเจือจางสูงที่สุด) ที่ไม่มีเชื้อเจริญ ค่าที่ได้ถือว่าเป็นค่า MIC กรณีที่ต้องการตรวจสอบว่าสารสกัดมีสมบัติเป็นชนิดต้าน หรือทำลายจุลินทรีย์ สามารถทดสอบได้โดยนำหลอดตั้งแต่ช่วงค่า MIC ขึ้นไป มาเกลี่ย (spread) บนอาหารวุ้น ภายหลังการบ่มเพาะ ถ้าไม่มีเชื้อเจริญหรือเกือบไม่มีเชื้อเจริญ (99.9% ถูกทำลาย) ถือเป็นค่า MBC

**3.4.5.1 การเตรียมสารละลายสารสกัดที่เหมาะสม**

สุ่มเลือกช่วงความเข้มข้นของสารสกัดที่ควรให้ผลเชิงบวก (positive) จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (ในข้อ3.4.4) โดยแบ่งสารสกัดที่เหมาะสมมาเจือจางในอัตราส่วน 1:2 ด้วยอาหารเหลวจนได้ระดับความเข้มข้น 3 หรือ 6 ระดับ หน่วยเป็นไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีปริมาตรของอาหารเหลว รวมกับสารละลายสารสกัดที่ทดสอบเท่ากับ 2 มิลลิลิตร

**3.4.5.2 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ**

ขั้นตอนการเตรียมแบคทีเรียทดสอบทำเช่นเดียวกันกับข้อ 3.4.4.3 ในการทดสอบจะใส่สารแขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ $10^6$ เซลล์ต่อหลอด

**3.4.5.3 สารที่จะต้องเตรียมในหลอดทดลองของแต่ละสารสกัดที่ทดสอบ**

สารที่ต้องเตรียมในหลอดให้ได้ความเข้มข้นตามข้อ 3.4.5.1 มีดังนี้

ชุดควบคุม (control)

- อาหารเหลว
- อาหารเหลว + สารแขวนลอย (suspension) ของเชื้อ
- อาหารเหลว + สารละลายสารสกัดที่ทดสอบตามลำดับความเข้มข้น

ชุดทดสอบ (test sample)

- อาหารเหลว + สารแขวนลอย (suspension) ของเชื้อ + ลำดับความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดที่ทดสอบ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับแต่ละความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดที่ทดสอบ ต่อเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยสุ่มตรวจทุก 3 ชั่งโมง

**3.4.5.4 ตรวจผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ**

ระหว่างการบ่มจนครบ 24 ชั่วโมง โดยสุ่มตรวจทุก 3 ชั่งโมง ตรวจผลการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วย การสังเกตความขุ่นภายในหลอดด้วยสายตา และตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์โดยเกลี่ย (spread) ลงบนหน้าอาหารแข็ง (อาหาร TSAYE สำหรับแบคทีเรีย และ MRS agar สำหรับ LAB) ทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control)

**3.4.5.5 การแปรผลทดสอบหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัด**

ตรวจผลการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการสังเกตุความขุ่นภายในหลอดด้วยสายตา หลอดที่ใสเกิดขึ้นตรงกับความเข้มข้นใด ถือว่าเป็น ค่า MIC ต่อจากนั้นนำหลอดที่อยู่ในช่วงค่า MIC ขึ้นไปของสารสกัดมาเกลี่ยลงบนหน้าอาหารแข็งเพื่อตรวจนับจุลินทรีย์ (อาหาร TSAYE สำหรับแบคทีเรีย และ MRS agar สำหรับ LAB ) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจผลการทดสอบว่าไม่มีการเจริญหรือมีการเจริญไม่เกิน 5 โคโลนี (99.9 % ถูกฆ่า) แสดงว่าความเข้มข้นของหลอดดังกล่าวที่นำมาเกลี่ย คือ ค่า MBC ของสารสกัด

**3.4.6 การศึกษาผลของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบในสภาวะอาหารเหลวที่เป็นแบบจำลองของแหนม (nham model broth, NMB)**

ศึกษาผลเสริมการออกฤทธิ์ (synergetic) ระหว่างค่า pH ที่ลดลงในระหว่างการหมักกับการใช้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงต่อการต้านการเจริญของ *Staph. aureus* ในสภาวะอาหารเหลวที่เป็นแบบจำลองของแหนม โดยปริมาณการใช้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงตามผลการทดลองข้อ 3.4.5.5 นำมาแบ่งความเข้มข้นเป็น 5 ระดับความเข้มข้น

**3.4.6.1 การเตรียม NMB** (Swetwiwathana *et al.*, 1998)

| | | | |
|---|---|---|---|
| ส่วนประกอบ | meat extract | 10 | กรัม |
| | tryptone | 10 | กรัม |
| | sodium ascorbate | 0.5 | กรัม |
| | sodium tri-polyphosphate | 3 | กรัม |
| | glucose | 10 | กรัม |
| | NaCl | 25 | กรัม |
| | Distilled water | 1 | ลิตร |

การเตรียมอาหาร NMB มีการปรับค่า $a_w$ ด้วยกลีเซอรอล (glyceral) 0.4 % และปรับค่า pH เริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 5.8 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อ (sterilized) 15 นาที (121 องศาเซลเซียส ,15 psi) หลังจากเตรียมชุดทดสอบและถ่ายเชื้อ เทปิดทับด้วย น้ำมันพาราฟิน (paraffin oil) ที่ปลอดเชื้อ

**3.4.6.2 สารที่จะต้องเตรียมในหลอดทดลองของสารสกัดที่ทดสอบ**

ชุดควบคุม (control)

- อาหารเหลวที่เป็นแบบจำลองของแหนม + สารแขวนลอย (suspension) ของเชื้อ *Staph. aureus*

ชุดทดสอบ (test sample)

- อาหารเหลวที่เป็นแบบจำลองของแหนม + สารละลายสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงตามลำดับความเข้มข้น + สารแขวนลอย (suspension) ของเชื้อ *Staph. aureus*

แต่ละความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดที่ทดสอบ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจผลนับการเจริญของเชื้อ *Staph. aureus* ระหว่างการบ่มทุก 3 ชั่วโมง แปรผลค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร นำค่าที่ได้มา plot กราฟอัตราการเจริญเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

# บทที่ 4
# ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

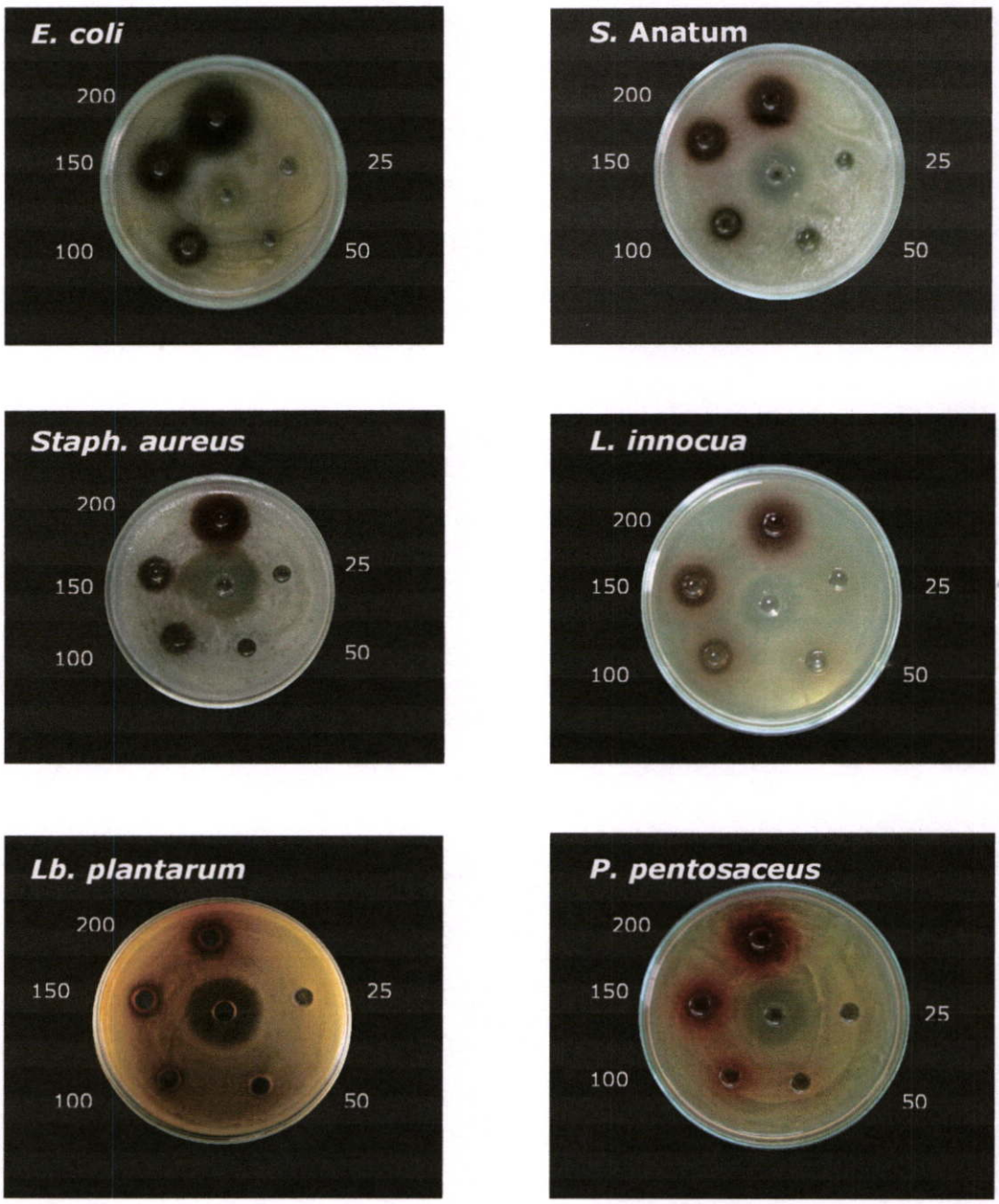
## 4.1 การศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดกระเจี๊ยบแดง เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน

การประเมินประสิทธิภาพการต้านการเจริญหรือการทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารสกัดด้วยวิธี agar-well diffusion method นั้น เป็นวิธีการตรวจสอบเบื้องต้นว่าสารที่ทดสอบมีฤทธิ์ในด้านเชื้อหรือไม่ การต้านเชื้อของสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อในสารสกัดทั้งชนิดต้านการเจริญและทำลายเชื้อจะก่อให้เกิดโซนใสรอบหลุม ในการทดลองนี้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่ก่อความเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 4 สายพันธุ์ ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบอย่างละ 2 สายพันธุ์ได้แก่ *E. coli* , *S.* Anatum , *Staph. aureus* และ *L. innocua* ตามลำดับ และกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก (LAB) ที่ใช้ในการแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 2 สายพันธุ์ คือ *Lb. plantarum* และ *P. pentosaceus* โดยผลการทดสอบสารสกัดชนิดต่างๆเป็นดังนี้

### 4.1.1 สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง

จากการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงด้วยวิธี agar-well diffusion method ซึ่งประเมินผลจากขนาดของโซนใสที่เกิดขึ้นต่อเชื้อทดสอบ 6 สายพันธุ์ โดยเตรียมสารละลายสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงความเข้มข้น 5 ระดับ ดังนี้ 25, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาพที่ 4.1, ตารางที่ 4.1) พบว่า ภายหลังการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่งโมง สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 25มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ผลการต้านกับ *L. innocua* เพียงสายพันธุ์เดียว ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ผลการต้าน *L. innocua* และ *Staph. aureus* ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถต้านการเจริญแบคทีเรียที่ก่อความเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ทั้งหมด และที่ระดับความเข้มข้น 150 และ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่เพียงแต่ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้งหมดแล้วยังให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียแลกติกอีกด้วย เมื่อพิจารณาโดยรวมถึงขนาดของโซนใสที่เกิดขึ้น พบว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงมีผลความไวต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียเอง โดยเฉพาะคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของแบคทีเรีย เช่น คุณสมบัติของผนังเซลล์ จากผลการทดลองที่ได้อาจกล่าวได้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงในระดับ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารหมักที่มีการหมักโดยแบคทีเรียแลกติก ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงในระดับความเข้มข้น

ดังกล่าวมีผลเฉพาะต่อแบคทีเรียที่ก่อโรคแต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียแลกติกสองสายพันธุ์ที่พบมากในการหมักผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก




**ภาพที่ 4.1** ลักษณะโซนใสที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง

หลุมกลาง คือ คลอแรมเฟนิคอล 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
หลุมอื่นๆ ที่มีตัวเลขกำกับหมายถึงความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงเป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.1 โซนใสที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง

| ตัวอย่าง | ค่าเฉลี่ยของโซนใส (มิลลิเมตร) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *E. coil* | *S.* Anatum | *Staph. aureus* | *L .innocua* | *Lb. plantalum* | *P. pentosaceus* |
| RE 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | – | – | – | 1.21 ± 0.24 | – | – |
| RE 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | – | – | 1.72 ± 0.73 | 1.96 ± 0.75 | – | – |
| RE 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | 2.47 ± 1.08 | 3.14 ± 0.74 | 7.49 ± 1.24 | 7.25 ± 1.46 | – | – |
| RE 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | 6.39 ± 1.12 | 6.89 ± 1.29 | 10.63 ± 1.54 | 10.02 ± 1.47 | 1.22 ± 0.49 | 1.01 ± 0.51 |
| RE 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | 10.16 ± 1.37 | 10.85 ± 1.37 | 12.87 ± 1.14 | 14.58 ± 1.37 | 3.06 ± 0.87 | 2.91 ± 0.48 |
| น้ำกลั่น | – | – | – | – | – | – |
| chloramphenicol | 7.59 ± 0.49 | 8.22 ± 0.34 | 11.35 ± 0.79 | 14.38 ± 0.69 | 15.44 ± 0.76 | 15.18 ± 0.91 |

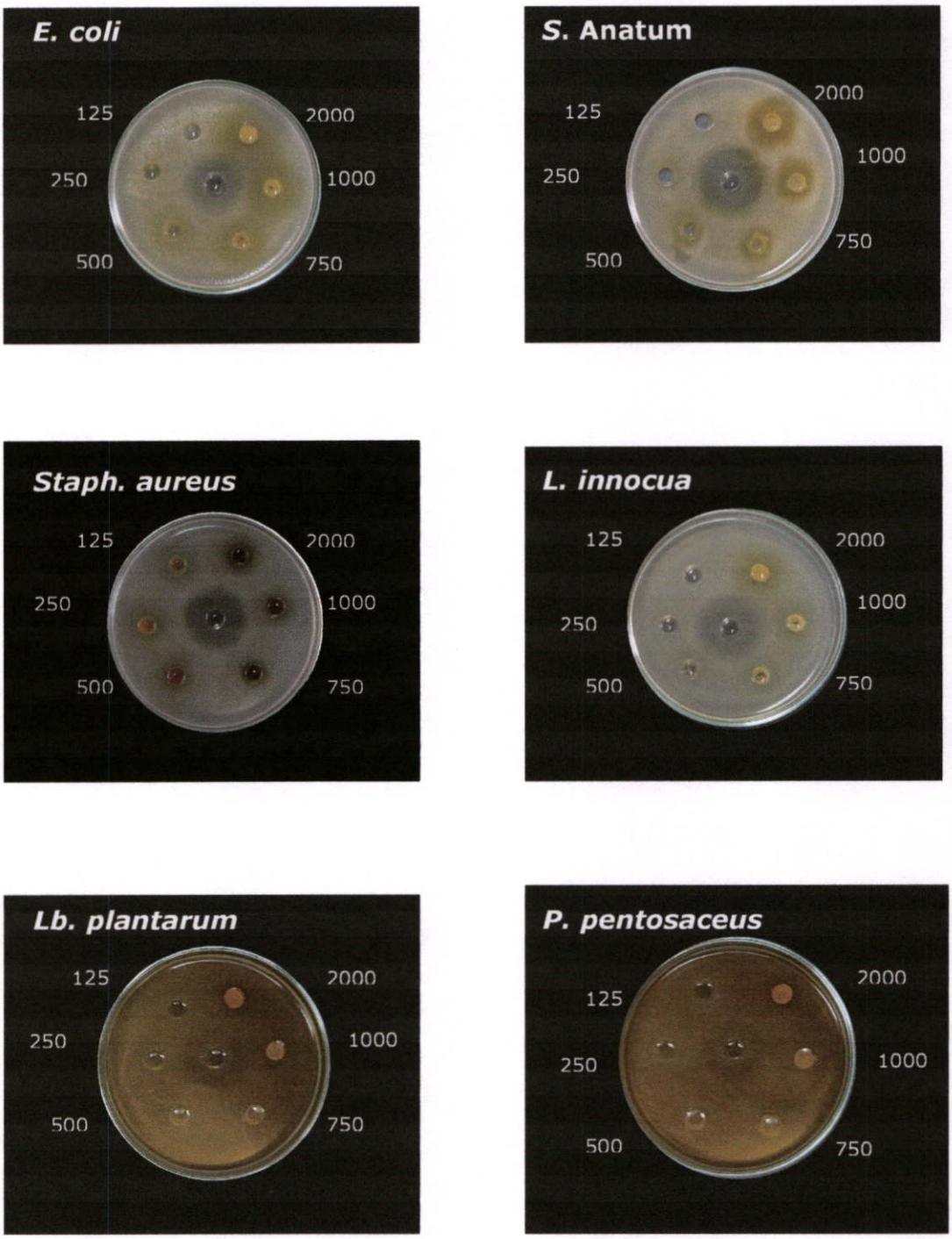
RE = สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง - ไม่เกิดโซนใส

**4.1.2 สารสกัดจากเปลือกส้มและเมล็ดส้มเขียวหวาน**

ในการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานด้วยวิธี agar-well diffusion method ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่ก่อความเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 4 สายพันธุ์คือ *E. coli* , *S.* Anatum , *Staph. aureus* และ *L. innocua* และกล้าเชื้อแลกติกเอสิดแบคทีเรีย (LAB) ที่ใช้ในการแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 2 สายพันธุ์ คือ *Lb. plantarum* และ *P. pentosaceus* โดยเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดดังกล่าวเป็น 5 ระดับ ดังนี้ 250, 500, 750, 1000 และ 2000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ภาพที่ 4.2 และตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบพบว่า ภายหลังการบ่ม 24 ชั่วโมง สารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวาน 1000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ผลการต้าน *Staph. aureus* เพียงสายพันธุ์เดียว และที่ความเข้มข้น 2000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรสามารถต้านการเจริญของ *Staph. aureus* และ *L.innocua* เมื่อพิจารณาจากขนาดของโซนใสที่เกิดขึ้นพบว่า *Staph. aureus* เป็นเชื้อที่ไวต่อสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานมากที่สุด นอกจากนี้สารสกัดดังกล่าวยังไม่มีผลการต้านแบคทีเรียแลกติก (ภาพที่ 4.2) อีกด้วย เนื่องจากผลการประเมินประสิทธิภาพการต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นด้วยวิธี agar-well diffusion method ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานให้ลักษณะโซนที่ไม่คมชัด (sharp zone) และโซนใส (clear zone) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ได้เพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง

สำหรับผลการทดสอบการต้านการเจริญของสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวาน (ภาพที่ 4.3, ตารางที่ 4.3) ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่า สารสกัดเมล็ดส้มเขียวหวานทุกระดับความเข้มข้นไม่เกิดโซนหรือไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบใส อาจเป็นผลเนื่องจากสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวานที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีนี้มีสารประกอบที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ออกมาน้อยมากหรือไม่มีเลย รวมทั้งคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีในสารสกัดอาจมีโมเลกุลใหญ่หรือแพร่ซึมยากจึงมีผลต่ออัตราการแพร่ซึมผ่านอาหารวุ้นไปสู่ตัวเซลล์แบคทีเรียได้น้อยไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้




**ภาพที่ 4.2** ลักษณะโซนใสที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวาน

หลุมกลาง คือ คลอแรมเฟนิคอล 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

หลุมอื่นๆ ที่มีตัวเลขกำกับหมายถึงความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานเป็นมิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.2 โซนใสที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวาน

| ตัวอย่าง | ค่าเฉลี่ยของโซนใส (มิลลิเมตร) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *E. coil* | *S.* Anatum | *Staph. aureus* | *L. innocua* | *Lb. plantalum* | *P. pentosaceus* |
| TPE 125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | – | – | – | – | – | – |
| TPE 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | – | – | – | – | – | – |
| TPE 500 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | – | – | – | – | – | – |
| TPE 750 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | – | – | – | – | – | – |
| TPE 1000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | – | – | 2.58 ± 0.76 | – | – | – |
| TPE 2000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | – | – | 3.74 ± 0.99 | 2.47 ± 0.75 | – | – |
| DMSO 10 % | – | – | – | – | – | – |
| chloramphenicol | 7.78 ± 1.16 | 10.42 ± 0.93 | 16.61 ± 0.96 | 14.89 ± 1.09 | 16.46 ± 0.72 | 15.80 ± 0.98 |

TPE = สารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวาน DMSO = ไดเมทธิลลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide) - ไม่เกิดโซนใส

**ภาพที่ 4.3** ลักษณะโซนใสที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ของสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวาน

หลุมกลาง คือ คลอแรมเฟนิคอล 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
หลุมอื่นๆ ที่มีตัวเลขกำกับหมายถึงความเข้มข้นของสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวานเป็นมิลลิกรัม/มิลลิลิตร

## 4.2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทรีย์ (minimum bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงและเปลือกส้มเขียวหวาน

จากผลการตรวจสอบเบื้องต้นถึงสมบัติการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงและเปลือกส้มเขียวหวานในข้อ 4.1 จึงดำเนินการทดสอบต่อโดยใช้วิธีการเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution method) เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทรีย์ (minimum bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรียที่ก่อความเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* , *S.* Anatum , *Staph. aureus* และ *L. innocua* ผลการทดสอบเป็นดังนี้

### 4.2.1 สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง

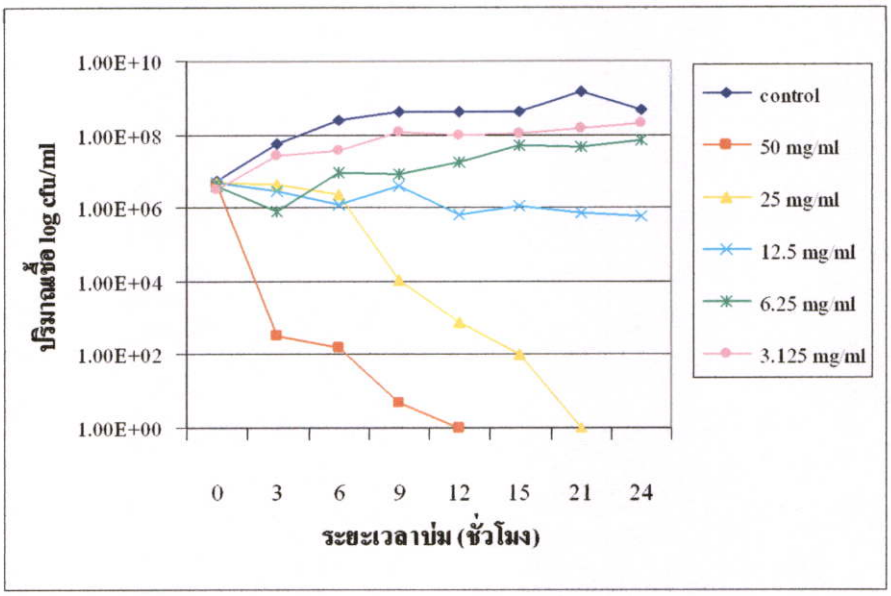
จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC) ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง โดยวิธีเจือจางสารสกัดในอาหารเหลว ได้ความเข้มข้น 6 ระดับได้แก่ 100, 75, 50, 25, 12.5 และ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ภายหลังการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และสังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 4.3) พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีการเจริญของเชื้อ คือ ค่า MIC ที่สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coil* , *S.* Anatum , *Staph. aureus* และ *L. innocua*

**ตารางที่ 4.3** ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง

| เชื้อจุลินทรีย์ | MIC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) | ลักษณะที่สังเกตด้วยสายตา |
|---|---|---|
| *E. coil* | 12.5 | ไม่มีความขุ่นถึงลักษณะการเจริญของเชื้อ |
| *S.* Anatum | 12.5 | ไม่มีความขุ่นถึงลักษณะการเจริญของเชื้อ |
| *Staph. aureus* | 12.5 | ไม่มีความขุ่นถึงลักษณะการเจริญของเชื้อ |
| *L. innocua* | 12.5 | ไม่มีความขุ่นถึงลักษณะการเจริญของเชื้อ |

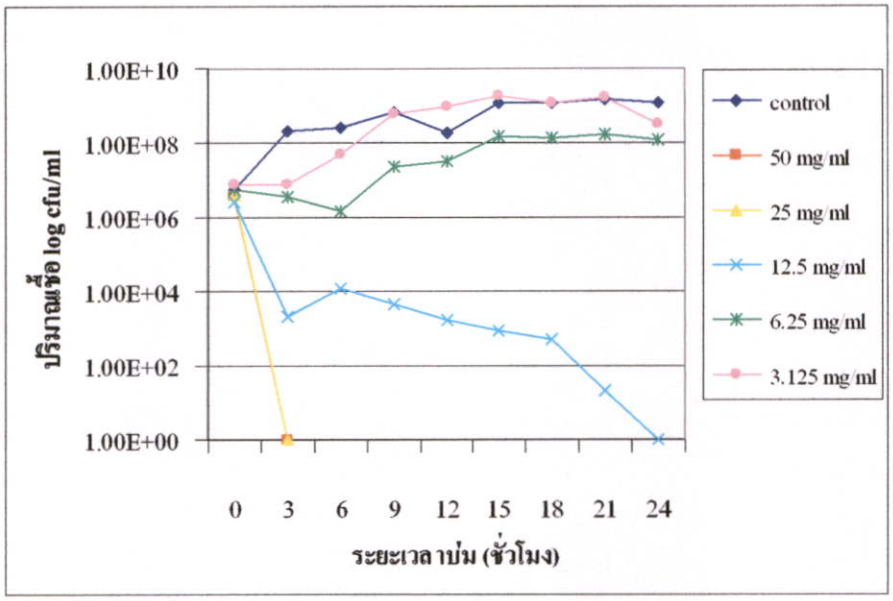
จากนั้นทำการตรวจสอบว่าสารสกัดมีฤทธิ์เฉพาะต้านการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์ โดยวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำลายจุลินทรีย์ (MBC) ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงโดยเลือกระดับความเข้มข้นที่สูงและต่ำกว่าค่า MIC อยู่ 2 ระดับ รวมเป็น 5 ระดับ ดังนี้ 50, 25, 12.5,

6.25 และ 3.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทดสอบกับจุลินทรีย์ดังกล่าว บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจหาปริมาณเชื้อทดสอบที่มีชีวิตอยู่ทุก 3 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองเป็นดังนี้



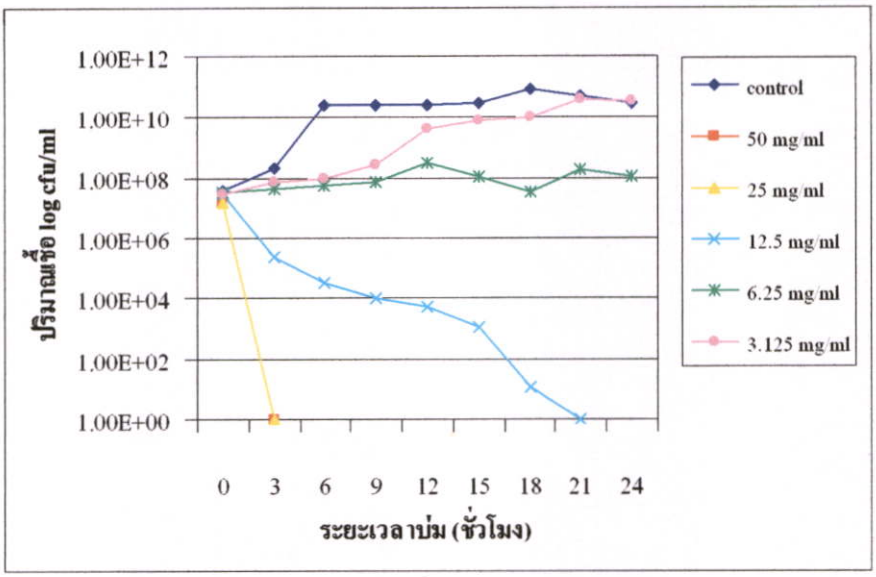

**ภาพที่ 4.4** การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่มีต่ออัตราการเจริญของ *E. coli*

ผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงต่อ *E. coli* (ภาพที่ 4.4) พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยที่ระยะเวลาบ่ม 6 ถึง 9 ชั่วโมง มีอัตราการลดลงของเชื้ออย่างรวดเร็วประมาณ 2 log cycles เมื่อเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น จากนั้นมีอัตราการลดลงเรื่อยๆ จนไม่มีการเจริญของเชื้อเกิดขึ้นที่ระยะเวลาบ่ม 21 ชั่วโมง จึงกล่าวได้ว่า ความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร. เป็นความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อ (MBC) และความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่เป็นค่า MIC พบว่าช่วงระยะเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมงมีอัตราการเจริญของเชื้อลดลงช้ามาก



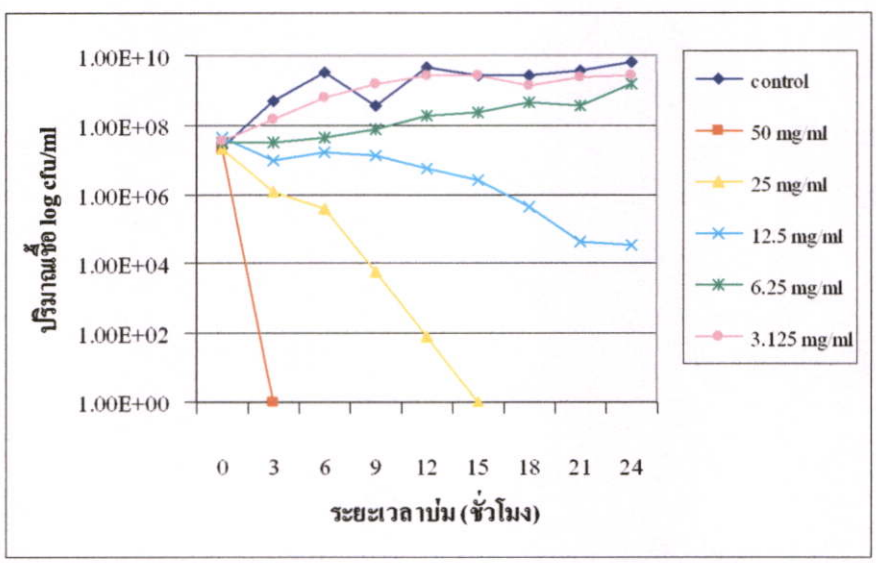

**ภาพที่ 4.5** การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่มีต่ออัตราการเจริญของ *S.* Anatum

ผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงต่อ *S.* Anatum (ภาพที่ 4.5) พบว่า ระยะเวลาบ่ม 3 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 25 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบการเจริญของเชื้ออยู่เลย และความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีอัตราการเจริญที่ลดลงอย่างรวดเร็วประมาณ 3 log cycles เมื่อเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น จากนั้นอัตราการเจริญลดลงอย่างช้าๆ จนไม่มีการเจริญของเชื้อเกิดขึ้นที่ระยะเวลาบ่ม 24 ชั่วโมง จึงกล่าวได้ว่า ความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อ (MBC) ซึ่งได้ค่าตรงกับค่า MIC จากตารางที่ 4.4 แต่ผลอัตราการเจริญของเชื้อที่ได้จากกราฟบอกได้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดนี้มีผลออกฤทธิ์แบบทำลายเชื้อ *S.* Anatum ไม่ใช่การต้านการเจริญของเชื้อดังกล่าว




**ภาพที่ 4.6** การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่มีต่ออัตราการเจริญของ *Staph. aureus*

ผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงต่อ *Staph. aureus* (ภาพที่ 4.6) พบว่า ระยะเวลาบ่ม 3 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 25 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบการเจริญของเชื้ออยู่เลย และความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีอัตราการเจริญที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง จนระยะเวลาบ่ม 21 ชั่วโมง ไม่พบการเจริญของเชื้อเกิดขึ้น จึงกล่าวได้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่ต่ำสุดมีฤทธิ์ทำลายเชื้อ (MBC) เช่นเดียวกับ *S.* Anatum ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของมาลิน และคณะ(2535) ที่พบว่า ความเข้มข้นของกระเจี๊ยบแดง 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นค่า MBC ที่มีผลต่อ *Staph. aureus*




**ภาพที่ 4.7** การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่มีต่ออัตราการเจริญของ *L. innocua*

ผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงต่อ *L. innocua* (ภาพที่ 4.7) พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยที่ระยะเวลาบ่ม 6 ถึง 9 ชั่วโมง มีอัตราการลดลงของเชื้ออย่างรวดเร็วประมาณ 2 log cycles จากนั้นมีอัตราการลดลงเรื่อย ๆ จนไม่มีการเจริญของเชื้อเกิดขึ้นที่ระยะเวลาบ่ม 15 ชั่วโมง จึงกล่าวได้ว่า ความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อ(MBC) และความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่เป็นค่า MIC มีอัตราการเจริญของเชื้อลดลงอย่างช้าๆ พบว่าที่เวลาการบ่ม 24 ชั่วโมง การลดลงของเชื้อลดลง 2 log cycles เมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้น

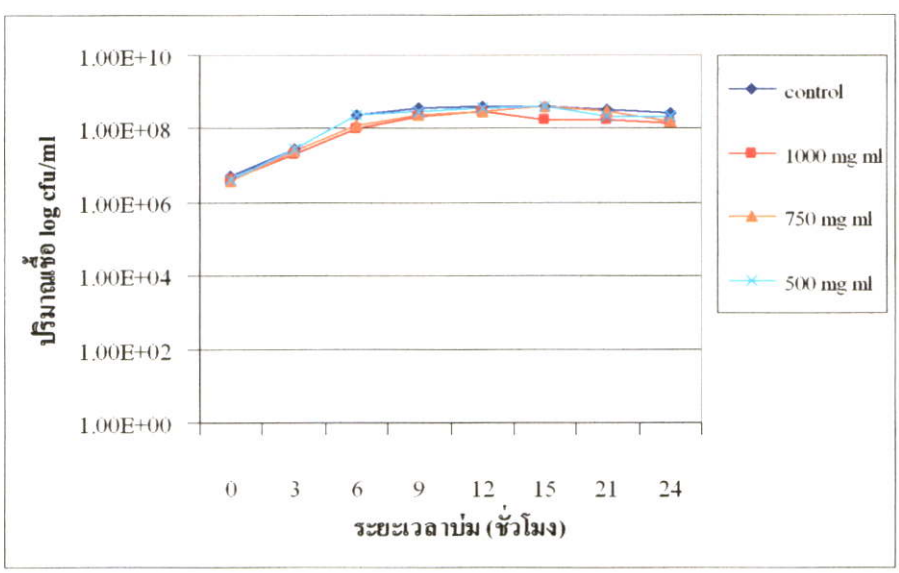
จากผลการประเมินประสิทธิภาพถึงสมบัติการต้านการเจริญของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงเบื้องต้นด้วยวิธี agar-well diffusion method พบว่า สารละลายสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หรือ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ต่อจุลินทรีย์บางสายพันธุ์) เป็นความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่มีผลต้านการเจริญของเชื้อทดสอบจึงไม่เกิดโซนใส แต่ในการทดสอบความไวของสารสกัดด้วยวิธีการเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution method) กลับให้ผลการต้านการเจริญหรือทำลายเชื้อทดสอบได้ เป็นเพราะว่าสารออกฤทธิ์เฉพาะบางอย่าง อาจไม่สามารถแพร่ซึมในอาหารวุ้น หรือมีโมเลกุลขนาดใหญ่แพร่ซึมยากในอาหารวุ้นและเข้าในตัวเซลล์ของเชื้อทดสอบ (มาลิน, 2542) รวมทั้งวิธีการเจือจางสารสกัดในอาหารเหลว ทำให้สารสกัดที่ทดสอบละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นการทำให้สารออกฤทธิ์ละลายและสัมผัสกับเชื้อทดสอบโดยตรง (direct contract) นอกจากนี้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่นำมาทดสอบเป็นสารสกัดที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์จนเป็นสารประกอบเชิงเดี่ยว หรือยังคงเป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) ซึ่งสารสกัดที่ได้นี้นอกจากมีสารประกอบที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแล้วยังมีสารประกอบอื่นผสมร่วมด้วยทำให้กลไกการออกฤทธิ์ไม่เลือกสรร

รายงานการวิจัยของ Somaatmadja และคณะ (1964) กล่าวว่า แอนโธไซยานินที่พบมากในกระเจี๊ยบแดงมีสมบัติในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้นั้น เนื่องจากโครงสร้างของสารประกอบที่เป็น double-ring benzopyran มีประจุบวกจึงทำให้ว่องไวต่อการเกิดคีเลท (chelate) ของโลหะอิออน ซึ่งจะมีผลไปรวมตัวกับหมู่ซัลฟ์ไฮดริลของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานของแบคทีเรีย เมื่อเอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงาน จึงมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ และตายไปในที่สุด นอกจากนี้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงยังประกอบด้วยกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ จำนวนมาก เช่น กรดฮิบิสซิด (hibiscic acid) 23% กรดซิตริก (citric acid) 12-17% (วีรสิงห์, 2522) ซึ่งกรดเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดยมีผลไปลดพีเอช รบกวนการขนส่งสารผ่านเข้าออกของผนังเซลล์ และไปทำลายเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานเพื่อใช้ในการดำรงชีวิต (Naidu, 2000)

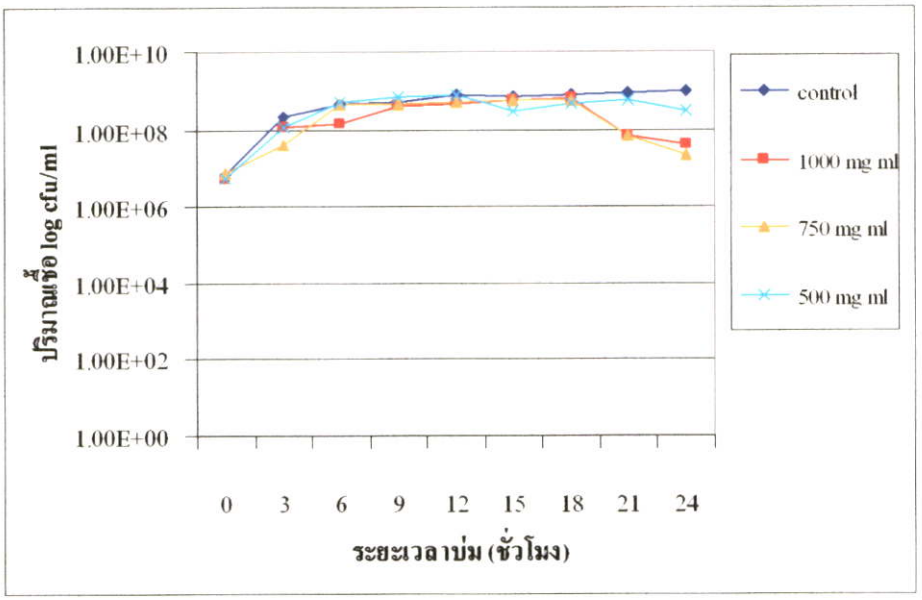
### 4.2.2 สารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวาน

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration, MIC) ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานต่อเชื้อแบคทีเรียที่ก่อความเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* , *S.* Anatum , *Staph. aureus* และ *L. innocua* โดยเจือจางในอาหารเหลวได้ลำดับความเข้มข้นเป็น 3 ระดับคือ 1000, 750 และ 500 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ภายหลังการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากการสังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้น พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานทุกระดับความเข้มข้นมีการเจริญของเชื้อ ทั้งนี้เนื่องจากผลการประเมินประสิทธิภาพการต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นด้วยวิธี agar-well diffusion ให้ลักษณะโซนที่ไม่คมชัด (sharp zone) และโซนใสขนาดเล็ก แสดงว่ามีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์เพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่เพียงพอต่อการต้านการเจริญของเชื้อทดสอบในอาหารเหลว จึงได้ทำการตรวจสอบว่าสารสกัดมีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อย่างไร โดยการตรวจหาปริมาณเชื้อทดสอบที่มีชีวิตอยู่ทุก 3 ชั่วโมง โดยเตรียมสารสกัดมาเจือจางในอาหารเหลวตามระดับความเข้มข้น 3 ระดับคือ 1000, 750 และ 500 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองเป็นดังนี้

ผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานต่อ *E. coli* (ภาพที่ 4.8) พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกส้มทุกความเข้มข้นไม่สามารถต้านการเจริญของ *E. coli* ได้เลยเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

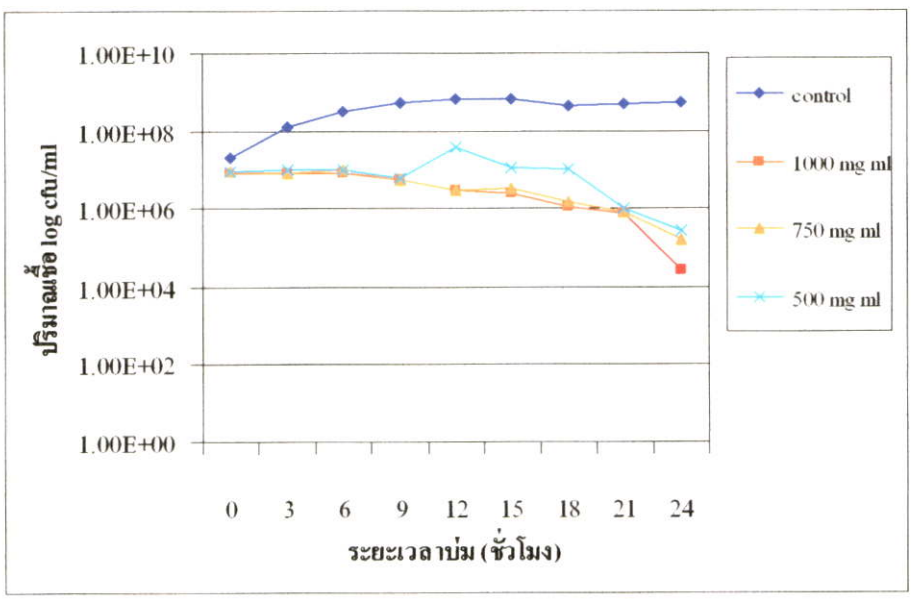



**ภาพที่ 4.8** การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานที่มีต่ออัตราการเจริญของ *E. coli*



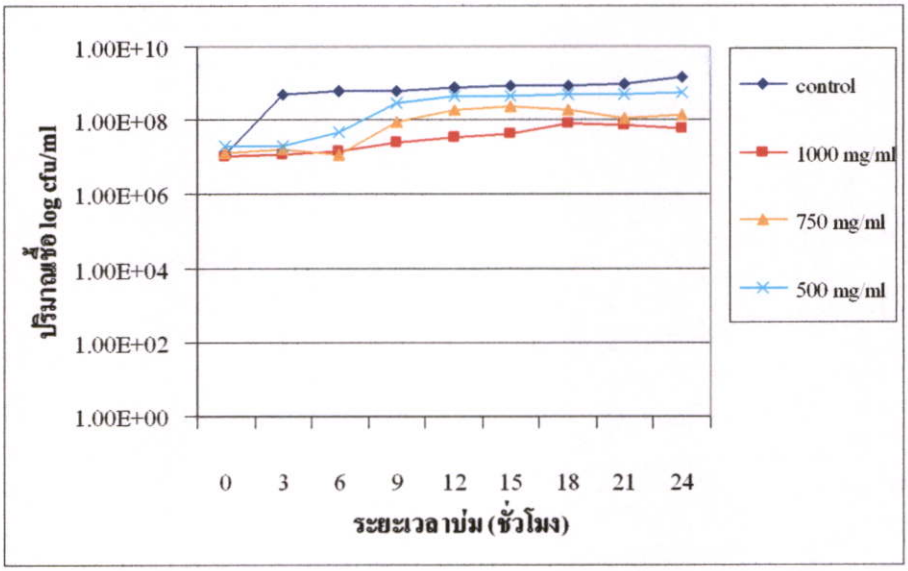

**ภาพที่ 4.9** การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานที่มีต่ออัตราการเจริญของ *S.* Anatum

ผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานที่มีต่ออัตราการเจริญของ *S.* Anatum (ภาพที่ 4.9) พบว่า อัตราการเจริญของ *S.* Anatum เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนถึงระยะเวลาบ่ม 21 และ 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวาน 750 และ 1000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรมีอัตราการเจริญลดลงคือ $2.3x10^7$ และ $2.1x10^7$CFU/ml ตามลำดับ สามารถลดจำนวนเชื้อลงได้ประมาณ 1 log cycle เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ($9.85x10^8$ CFU/ml)




**ภาพที่ 4.10** การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานที่มีต่ออัตราการเจริญของ *Staph. aureus*

ภาพที่ 4.10 แสดงผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานที่มีต่ออัตราการเจริญของ *Staph. aureus* โดยพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานทั้ง 3 ระดับคือ 500, 750 และ 1000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดอัตราการเจริญของเชื้อได้อย่างต่อเนื่องจนถึงระยะเวลาบ่มที่ 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวาน 1000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ($2.69x10^4$ CFU/ml) สามารถลดจำนวนเชื้อได้ถึง 2 log cycles และเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ($5.3x10^8$ CFU/ml) จะมีปริมาณเชื้อน้อยกว่า 4 log cycles ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Jayaprakasha (2000) ที่ศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulata*) มีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรีย แกรมบวกเช่น *Staph. aureus* ได้ดีที่สุด และตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัด พบสารประกอบโพลีเมธอกซีเลตเตดฟลาโวน 3 ชนิดคือ เดสเมธิลโนบิเลติน โนบิเลติน และแทนเจเรติน




**ภาพที่ 4.11** การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานที่มีต่ออัตราการเจริญของ *L.innocua*

ภาพที่ 4.11 แสดงผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานที่มีต่ออัตราการเจริญของ *L. innocua* โดยพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานทั้ง 3 ระดับ คือ 500, 750 และ 1000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีผลชะลอระยะการเจริญของ *L. innocua* เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม

การทดลองที่ศึกษาผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานยังมีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ไม่ดีเท่าที่ควร นั่นหมายถึงจำนวนของจุลินทรีย์ที่ลดลงเมื่อเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นยังมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตในปริมาณสูงพอที่สามารถสร้างสารพิษ

(toxin) และก่อความเสื่อมเสียแก่ผลิตภัณฑ์ได้ ถึงอย่างไรก็ดีการทดลองนี้อาจเป็นแนวทางในการนำสารส่งเสริม (synergistic) ที่มีผลต่อการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ตัวอื่นมาใช้ร่วมกันเพื่อส่งเสริมการต้านจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงและเปลือกส้มเขียวหวานที่นำมาทดสอบเบื้องต้นถึงสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ หรือการทดสอบความไว ทั้ง 2 วิธี พบว่า สารสกัดทั้ง 2 ชนิดมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ทั้งนี้เนื่องด้วย ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีสารประกอบที่มีการเรียงตัวอย่างง่ายๆ ไม่ซับซ้อน และมีลิปิด (0-0.2%)น้อยกว่าแบคทีเรียแกรมลบที่มีลิปิดที่ผนังเซลล์ถึง 10-20 % และมีการเรียงตัวของสารประกอบอย่างซับซ้อนเป็นไลโปโปรตีน (lipoprotein) และไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ด้วยสมบัติและสารประกอบของผนังเซลล์ที่แตกต่างกันดังกล่าว จะมีผลต่อการผ่านเข้าออกของสาร (cell permeability) จึงทำให้แบคทีเรียแกรมบวกมีความไวต่อสารสกัดมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และจากการรายงานของ Davidson (1993) กล่าวว่า การเปลี่ยนแปลงสมบัติของผนังเซลล์เพียงเล็กน้อยด้วยสารประกอบฟีนอลิค (phenolic compound) ก็สามารถยับยั้งการเจริญได้ แต่ถ้าเปลี่ยนแปลงไปมากจะทำให้เซลล์ตาย และพบอีกว่าแบคทีเรียแกรมบวกมีความไวต่อสารประกอบฟีนอลิคมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

จากผลการประเมินค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC) ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงและเปลือกส้มเขียวหวาน พบว่าสารสกัดที่มีประสิทธิภาพต่อการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีคือสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง และเชื้อที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุดคือ *Staph. aureus* จึงได้นำมาศึกษาในหัวข้อต่อไป

## 4.3 การศึกษาผลของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงในการต้านการเจริญของ *Staph. aureus* ในสภาวะอาหารเหลวที่เป็นแบบจำลองของแหนม (nham model broth, NMB)

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงต่อการต้านการเจริญของเชื้อ *Staph. aureus* ในสภาวะอาหารเหลวที่เป็นแบบจำลองของแหนม (NMB) โดยเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงเป็น 5 ระดับความเข้มข้นดังนี้ 3.125, 6.25, 12.5, 25 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยตรวจนับเชื้อที่รอดชีวิตทุก 3 ชั่วโมง

ในอาหารเหลว NMB มีองค์ประกอบของโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (sodium tri-polyphosphate) เป็นส่วนผสมเพื่อทำหน้าที่ทำให้เป็นกลาง (neutralize) ให้ระบบทดสอบ จึงต้องตรวจวัดค่า pH ของชุดตัวอย่างทดสอบ ตารางที่ 4.4 แสดงค่า pH ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างๆใน NMB พบว่า ที่ระดับความเข้มของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่สูงขึ้นจะมีค่า pH ที่ต่ำลง (ความเป็นกรดสูง) แสดงว่าโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตที่มีอยู่ในอาหาร NMB ไม่สามารถ neutralize ให้ระบบมี pH เท่ากับ NMB ปกติได้

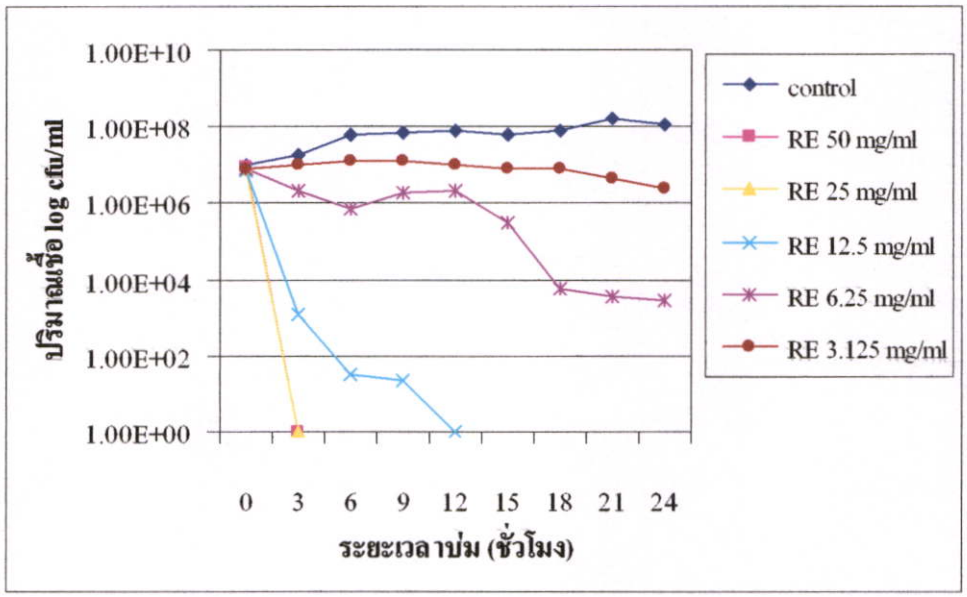
**ตารางที่ 4.4** ค่า pH ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้นต่างๆในNMB

| ตัวอย่าง | ค่า pH |
|---|---|
| NMB (control) | 5.81 |
| RE 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | 2.49 |
| RE 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | 2.89 |
| RE 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | 3.51 |
| RE 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | 4.26 |
| RE 3.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร | 4.97 |

RE สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง

แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงไม่ใช่เป็นผลจากค่า pH ที่ต่ำเท่านั้น แต่เป็นผลเนื่องมาจากสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ ที่มีอยู่ในกระเจี๊ยบแดง ดังการศึกษาของ Angsujinda และคณะ(2004) ที่ศึกษาสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่มีความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ที่ต่ำของสารสกัดโดยเปรียบเทียบกับสารละลายกรดซิตริกในระดับค่า pH ที่เท่ากันของแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 100 , 150 และ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ ทดสอบกับเชื้อ 6 สายพันธุ์(แบคทีเรียที่ก่อความเสื่อมเสียที่พบในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักได้แก่ *E. coli* , *S.* Anatum , *Staph. aureus* และ *L. innocua* และกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก (LAB) ที่ใช้ในการแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 2 สายพันธุ์ คือ *Lb. plantarum* และ

*P. pentosaceus*) ประเมินความไวของสารสกัดด้วยวิธี agar-well diffusion พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงทั้ง 3 ระดับ มีโซนใสที่กว้างกว่าสารละลายกรดซิตริกที่ระดับค่า pH เดียวกัน จึงแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงมีองค์ประกอบของสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ ที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์อยู่ด้วย




**ภาพที่ 4.12** การออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่มีต่ออัตราการเจริญของ *Staph. aureus* ในสภาวะอาหารเหลวที่เป็นแบบจำลองของแหนม

จากผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่มีต่ออัตราการเจริญของ *Staph. aureus* ใน NMB (ภาพที่ 4.12) พบว่า ระยะเวลาบ่ม 3 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 25 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบการเจริญของเชื้ออยู่เลย และความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีอัตราการเจริญที่ลดลงอย่างรวดเร็ว จนระยะเวลาบ่ม 12 ชั่วโมง ไม่พบการเจริญของเชื้อเกิดขึ้นและที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีอัตราการเจริญของเชื้อลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงระยะเวลาบ่ม 12 และ18 ชั่วโมง เชื้อลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วประมาณ 2 log cycles เมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบในอาหาร TSBYE (ภาพที่ 4.6) ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรต้องใช้ระยะเวลาถึง 21 ชั่วโมง จึงสามารถฆ่าเชื้อได้หมดแต่เมื่อทดสอบใน NMB สามารถลดระยะเวลาในการฆ่าเชื้อเร็วขึ้นถึง 9 ชั่วโมง และสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้นต่ำก็มีผลต่อการต้านหรือชะลอการเจริญของเชื้อมากขึ้น จึงกล่าวได้ว่าการใช้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงในสภาวะอาหารเหลวที่เป็นแบบจำลองของแหนมมีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของ *Staph. aureus* ดีขึ้น

# บทที่ 5

# สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

## 5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของหรือการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานด้วยวิธี agar-well diffusion method พบว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงมีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของเชื้อทดสอบดีที่สุดและมีขอบข่ายการออกฤทธิ์กว้าง (broad spectrum) กล่าวคือ สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวก และแกรมลบโดยมีผลการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสามารถเรียงลำดับความไวของเชื้อทดสอบต่อสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงได้ ดังนี้ แบคทีเรียแกรมบวกเชื้อ *Staph. aureus* > *L.innocua* และ แบคทีเรียแกรมลบเชื้อ *S.* Anatum > *E. coli* ส่วนผลของสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น ซึ่งเชื้อ *Staph. aureus* เป็นเชื้อที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุด สำหรับผลของสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวานไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทุกสายพันธุ์

จากผลการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution method) พบว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่า MIC ต่อเชื้อ *E. coli* และ *L. innocua* เป็นการออกฤทธิ์แบบ ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (bacteriostatic) แต่สำหรับความเข้มข้นเดียวกันนี้จะเป็นค่า MBC ที่มีผลต่อ *Staph. aureus* และ *S.* Anatum ซึ่งเป็นการออกฤทธิ์แบบทำลายเชื้อ (bacteriocidol) และที่ระดับความเข้มข้นของกระเจี๊ยบที่สูงกว่า ค่า MIC ของแต่ละเชื้อที่ทดสอบ จะไม่พบการเจริญของเชื้อเกิดขึ้นที่ระยะเวลาบ่ม 24 ชั่วโมง สำหรับสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานมีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อโดยยับยั้งการเจริญของ *Staph. aureus* ได้ดีที่สุดและมีผลยับยั้งการเจริญของ *L. innocua* ในช่วง lag phase ให้ยาวขึ้นเท่านั้น

จากการศึกษาสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงในสภาวะอาหารเหลวที่เป็นแบบจำลองของแหนม (NMB) พบว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่มีผลในการทำลายเชื้อ และที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อที่ดีขึ้น

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการทดลองครั้งนี้แนะนำให้ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรที่มีสมบัติในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อความเสื่อมเสีย รวมทั้งสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงประกอบด้วยรงควัตถุแอนโธไซยานินปริมาณสูงซึ่งเป็นสารที่ให้สีแดง จึงมีความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร (food additive) เพื่อทดแทนหรือลดปริมาณการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักอย่างเช่น ไนไตรท์

# บรรณานุกรม

นิจศิริ เรืองรังษีและพยอม ตันติวัฒน์. 2534. **พืชสมุนไพร.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : โอ. เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

ประเสริฐ ศรีไพโรจน์. 2528. **เทคนิคทางเคมี.** ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มหาสารคาม.

ปาริชาติ สักกะทำนุ. 2543. **ส้มเม็ด ฟลาโวนอยด์และวิตามินซีเสริมสุขภาพ.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพ-มหานคร : สำนักพิมพ์รวมทรรศ์.

พงษ์เทพ วิไลพันธ์. 2540. **จุลชีววิทยาประมงห้องปฏิบัติการและวิธีการตรวจสอบวิเคราะห์.** ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิชัย หฤทัยธนาสันต์. 2517. ผลิตภัณฑ์จากกระเจี๊ยบแดง. **อาหาร.** 6(1) : 34-37.

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

มาลิน จุลศิริ, ปัญญา เต็มเจริญ และ พรทิพา พิชา. 2529. ฤทธิ์ต้านเชื้อและต้านการก่อกลายพันธุ์ของสมุนไพรที่สามารถนำมาปรุงเป็นเครื่องดื่มได้. **รายงานการวิจัยเสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ กรุงเทพ.** สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ 2535.

สุมาลี เหลืองสกุล. 2535. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2544. **เอกสารประกอบคำบรรยาย : Salmonella. WHO. National Salmonella and Shigella center.** สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรทวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรุงเทพฯ.

Abu-Tarboush, H.M. 1994. Antibacterial effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) and its relation the pH. **Egypt J. Food Sci.** 22(2) : 317-322.

Ahmad, I., and Beg, A.Z. 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **J. Ethnopharm.** 74(3) : 113-123.

Angsujinda, S., Swetwiwathana, A., Surapantapisit, Y., and Pinsirodom, P. 2005. Antimicrobial effect of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) fermented meat (Nham). **Book of Abstracts. 51st International Congress of Meat Science and Technology.** Baltimore, Maryland. 7-12 August 2005. pp.65-66.

Askari, A., Mirza, M., and Solangi, M.S. 1996. Toxicological studies of *Hibiscus sabdariffa* L. (roselle). **Pakistan J. Sci. Industrial Res.** 39(1) : 38-42.

Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuno, A., and Del Rio, J.A. 1997. Use and properties of citrus flavonoid. **J. Agric. Food Chem.** 45(12) : 4505-4515.

Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H., and Berset, C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. **J.Agric. Food Chem.** 46(6) : 2123-2129.

Braddock, R.J. 1995. By-product of citrus fruit. **Food Technol.** 49(9) : 74-77.

Braddock, R.J., and Cadwallader, K.R. 1992. Citrus by-products manufacture for food use. **Food Technol.** 46(2) : 105-110.

Bridle, P., and Timberlake, C.F. 1997. Anthocyanins as nature food colours-selected aspects. **Food Chem.** 58(1-2) : 103-109.

Carran, R., Muran, A., Montero, J.M., Fernandozlago, L., and Dominguez, A.1987. **Plantes Med.** et Phytother. 21 : 195-197.

Chulasiri, M., Temcharoen, P., and Picha, P. 1994. *In vrito study antidiarrheal causing bacteria and antimutagenic potential of herbal drinks.* **Report of National research council Bangkok.** National research council.

Chewonarin, T., Kinouchi, T., Kataoka, K., Arimochi, H., Kuwahara, T., Viniketkumnuen, U., and Ohnishi, Y. 1999. Effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn), a Thai medicinal plant, on the mutagenicity of various known mutagens in *Salmonella typhimurium* and on formation of aberrant crypt foci induced by the colon carcinogens azoxymethane and 2-amino-1 methyl-6-phenlimidazo[4,5-*b*] pyridine in F344 Rats. **Food Chem. Toxicol.** 37(6) : 591-601.

Davidson, P.M. 1993. Parabens and phenolic compounds. In **Antimicrobials in foods**, edited by Davidson, P.M., and A.L. Branen. New York : Marcel Dekker. pp.263-306.

Del Rio, J.A., Arcas, M.C., Benavente-Garcia, O., and Ortuno, A. 1998. Citrus polymethoxylated flavones can confer resistance against *Phytophthora citrophthora* , *Penicillium digitatum* , *Geotrichum* species. **J. Agric. Food Chem.** 46(10) : 4423-4515.

Duffy, C.F., and Power, R.F. 2001. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. Letter. **Inter. J. Antimicrobial Agent.** 17(6) : 527-529.

Eley, A.R. 1992. **Microbiol Food Poisoning.** Chapman&Hall. London. pp.211.

El-Shayeb, N.M.A. and Mabrouk, S.S. 1984. Utilisation of some edible and medicinal plants to inhibit aflatoxin formation. **Nutr. Rep. Int.** 29(2) : 273-282.

Gangrade, H., Mishra, S.H., and Kaushal, R. 1979. Antimicrobial activity of the oil and unsaponifiable matter of red roselle. **Indian Drugs.** 16(2) : 147-148.

James, G., and Cappuccino., N.S. In **Microbiology A Laboratory manual.** 1998. New York : Benjamin Cummings. pp.67-71.

Jayaprakasha, G.K., Negi, P.S., Sikder, S., Mohanrao, L.J., and Sakariah, K.K. 2000. Antibacterial activity of *Citrus reticula* peel extracts. **Zeitschrift fur Naturforschung C-A J. of Bioscience.** 55(11-12) : 1030-1034.

Jusoh, A.Z., Radzali, M., Ramli, J., and Sukari, M.A. 2002. Antimicrobial property of methanolic extract of Citrus mitis seeds. **Towards modernisation of the seminar on medicinal and aromatic plants.** 24-25 July 2001. pp.102-105.

Kandaswami, C., perkins, E., Solonium, D.S., Drzewiecki, G., and Middleton, E. 1991. Antiproliferative effects of citrus flavonoids on homan squamous cell caricinnoma *in vitro.* **Cancer Lett.** 56 :147-152.

Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produces by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol.** 12 : 39-86.

Macheix, J.J., Fleuriet, A., and Billot, J. 1990. **Fruit phenolisc.** Florida. CRC press.

Milic, B.L., Dkilas, S.M. and Canadanovic-Brunet, J.M. 1998. Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. **Food Chem.** 61(4) : 443-447.

Mims, C.A., Dockrell, H.M., Goering, R.V., Roitt, I., Wakelin, D., and Zuckerman, M.2004. **Medical microbiology.** Philadelphia : Mosby. pp. 497-499.

Mishra, M.,Shukla, Y.N., Jain, S.P. and Kumar, S. 1999. Chemistry and pharmacology of some *Hibiscus spp.*- a review. **J. of Medicinal and Aromatic Plant Science.** 21(4): 1169-1186.

Naidu, A.S. 2000. Overview. In **Natural food antimicrobial system.** edited by Naidu, A.S. New York : CRC press. pp.1-14.

Nelrotti, E., Moscatelli, M., and Tiscornia, S. 1996. Antimicrobial activity of the limonene. **Arquivos de Biologia e Tecnologia.** 39(2) : 233-237.

Perez, C., Pauli, M., and Bazerque, P. 1990. An antibiotic assay by the well agar method. **Acta Biologiae et Medicine Experimentalis.** 15 : 113-115.

Pratt, D.E., Powers, J.J., and Somaatmadja, D. 1960. Anthocyanins I. The influence of strawberry and grape anthocyanins on the growth of certain bacteria. **Food Res.** 25(1) : 26-32.

Quintero, A., Gonzalez, C.N., Sanchez, F., Usubillago, A., and Rojas, L., 2003. Constituents and biological activity of *Citrus auantium amara* L. essential oil. **Proceedings of the**

**international conference on medicinal and aromatic plants**, Budapest, Hungary, 8-11 July 2001. Part II, Acta-Horticulture. No.597 : 115-117.

Ramaswamy, A.S., and Jayarman, S. 1971. Antibacterial action of some naturally occurring citrus bioflavonoides. **Indian J.Eex. Biol.** 10 (1) :72-73.

Rice-Evans, C.A., Miller,N.J. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Sci.** 2(4) : 152-159.

Ryser, E.T., and Marth, E.H. 1991. **Listeria, Listeriosis and food safety.** Marcel Dekker. Inc., New York. pp.632.

Saleem, M., Afza, N., Anwar, M.A., Hai, S.M., and Ali, M.S. 2003. A comparative study of essential oils of cymbopogon citratus and some members of the genus citrus. **Nat. Prod. Res.** 17(5) : 369-373.

Sharaf, A., and Gineidi, A. 1962. The pharmacological characteristics of *Hibiscus sabdariffa* L.. **Planta Med.** 10(4) : 48-52.

Shihata, I.M., Hassan, A.B., and El-Mayah, G.Y. 1983. Antibacterial and antifungal activity of *Hibiscus sabdariffa* and *Lawsonia intermia* extracts. **Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr.** 31 (4) : 331-334.

Somaatmadja, D., Power, J.J., and Handy, M.K. 1964. Anthocyanins. VI. Chelation studies on anthocycanins and other related compounds. **J. Food Sci.** 29 : 655-660.

Swetwiwathana, A., Leutz, U., and A. Fischer. 1998. Role of garlic on growth and lactic acid production of starter cultures. **Fleischwirtschaft.** 78 : 294-298,344.

Suri, R., Radzali, M., Mohd, A., Marziah, S., Arif, Z.J., and Samsumaharto, R.A. 2002. Antibacterial assay of *Citrus hystrix* extracts. **J.Tropical Medicinal Plants.** 3 : 35-41.

Tee, P.L., Yusof, S., and Mohamed, S. 2002. Effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) on serum lipids of sprague dawley rats. **Nutr. Food Sci.** 32(4-5) : 190-196.

Tian, Q.C., miller, E.G., Ahmad, H., Lili, T., and Patil, B.S. 2001. Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. **Nutr. cancer.** 40(2) :180-184.

Treagan, L. and L. Pulliam. 1982. **Medical microbiology Laboratory Procedures.** Philadelphia : W.B. Saunders Co.

Wong, P.K., Yusof, S., Ghazali, H.M., and Che Man, Y.B. 2002. Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Nutr. Food Sci.** 32(2) : 68-73.

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก ก

## วิธีการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

### 1. การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ (viable conut) ด้วยเทคนิค spread plate

1.1 เทอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ TSAYE ลงในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้อย่างน้อย 6 ชั่วโมง เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง

1.2 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างสารละลายทดสอบตามระดับความเจือจางที่ต้องการมาหยดลงบนผิวหน้าอาหารเพาะเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 1.1 จานละ 0.1 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 2-4 จาน

1.3 ใช้แท่งแก้วรูปตัวเอล (L-spreader) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการจุ่มแอลกอฮอล์ 95% ผ่านไฟปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้นเกลี่ยตัวอย่างสารละลายทดสอบให้เชื้อกระจายไปทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 1) ซึ่งทำได้โดยใช้มือช่วยหมุนจานเพาะเชื้อ หรือวางบนจานแป้นหมุน (turn table) โดยแตะแท่งแก้วไว้บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมทั้งผลักแป้นหมุนไปรอบๆ

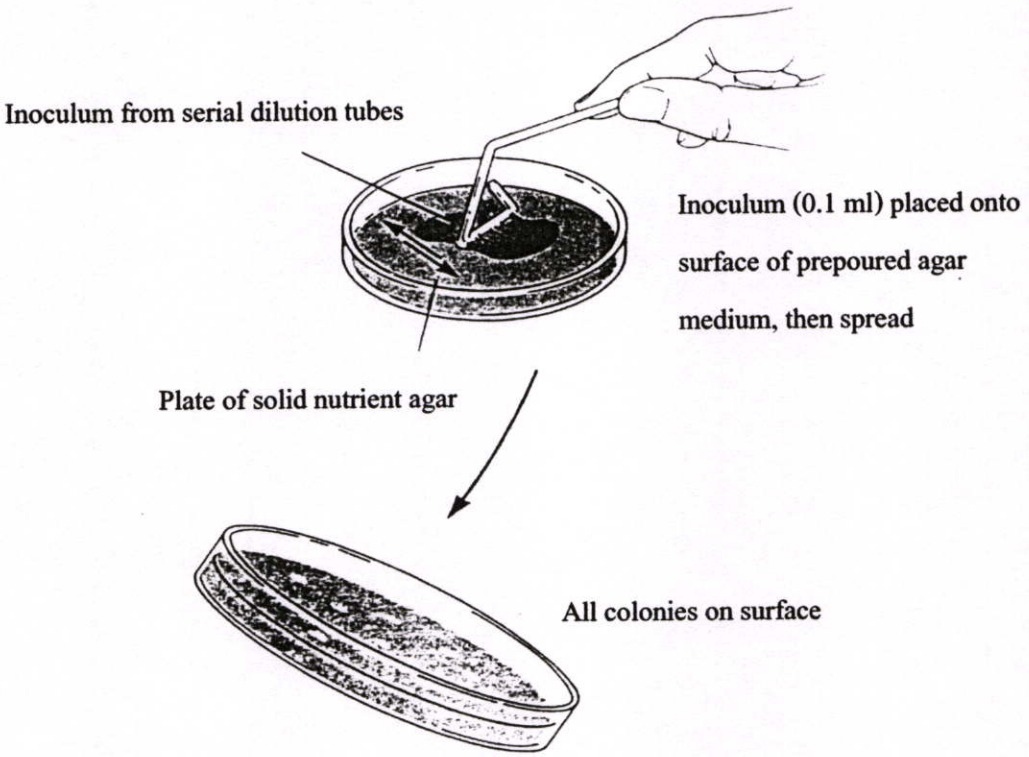
1.4 กลับจานเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.5 นับจำนวนจุลินทรีย์บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี

1.6 รายงานผลการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ต่อมิลลิลิตรของตัวอย่างทดสอบเนื่องด้วยวิธี spread plate ใช้ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ดังนั้นในการคำนวณหาจุลินทรีย์ต่อมิลลิลิตรของตัวอย่างทดสอบได้โดยนำค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อจานคูณกับระดับความเจือจางที่ใช้และคูณเพิ่มอีก 10 เท่าจากระดับความเจือจางที่เตรียมไว้เดิม

<u>ตัวอย่างการคำนวณ</u>

| | | |
|---|---|---|
| จำนวนโคโลนีเฉลี่ยที่นับได้ | X | เซลล์ |
| ค่าระดับความเจือจางที่นับได้สมมุติ | $1 : 10^{A}$ | |
| ในความเจือจางที่ $1 : 10^{A}$ เท่า 1 มิลลิลิตร มีจุลินทรีย์ | X | เซลล์ |
| ในความเจือจาง 1 เท่า 1 มิลลิลิตร จะมีจุลินทรีย์ | $(X)(1 : 10^{A})$ | เซลล์ |
| และในความเจือจาง 1 เท่า 0.1 มิลลิลิตร จะมีจุลินทรีย์ | $(X)(1 : 10^{A})$ | เซลล์ |
| ดังนั้นในตัวอย่างทดสอบ 1 มิลลิลิตร จะมีจุลินทรีย์ | $(X)(1 : 10^{A})(10)$ | เซลล์ |




**ภาพที่ ก1** ขั้นตอนการ spread plate

ที่มา : James, G., and Cappuccino., N.S.(1998)

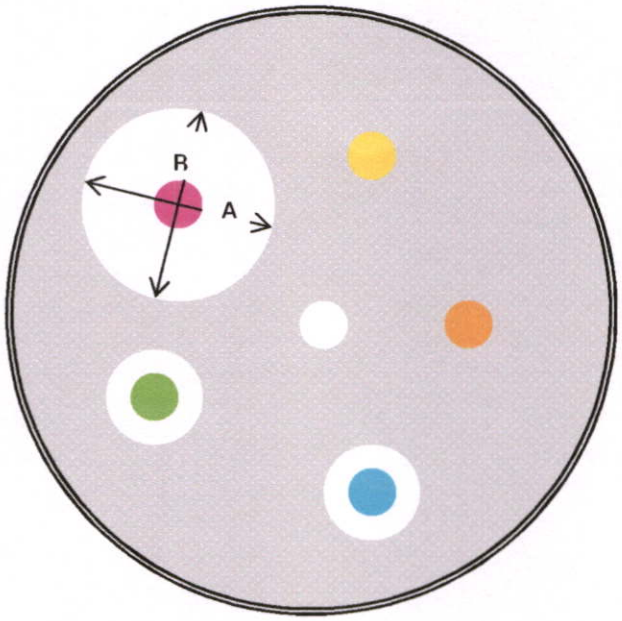
**2. การวัดค่าผลโซนใส (inhibition zone)**

2.1 นำจานเพาะเชื้อทดสอบมาส่องเครื่องขยายเพื่อช่วยในการวัดค่าแม่นยำขึ้น

2.2 ใช้เวอร์เนียร์วัดขนาดของโซนใสที่เกิดขึ้นรอบๆ หลุม (well) โดยทำการวัด 2 ระนาบต่อ 1 หลุมหรือต่อโซนใสที่เกิดขึ้นคิดเป็นค่าเฉลี่ยและหักลบขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม

<u>การคำนวณ</u>

$$\text{ขนาดโซนใส (มิลลิเมตร)} = \frac{A+B}{2} - \text{เส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม}$$




**ภาพที่ ก2** การวัดขนาดของโซนใส

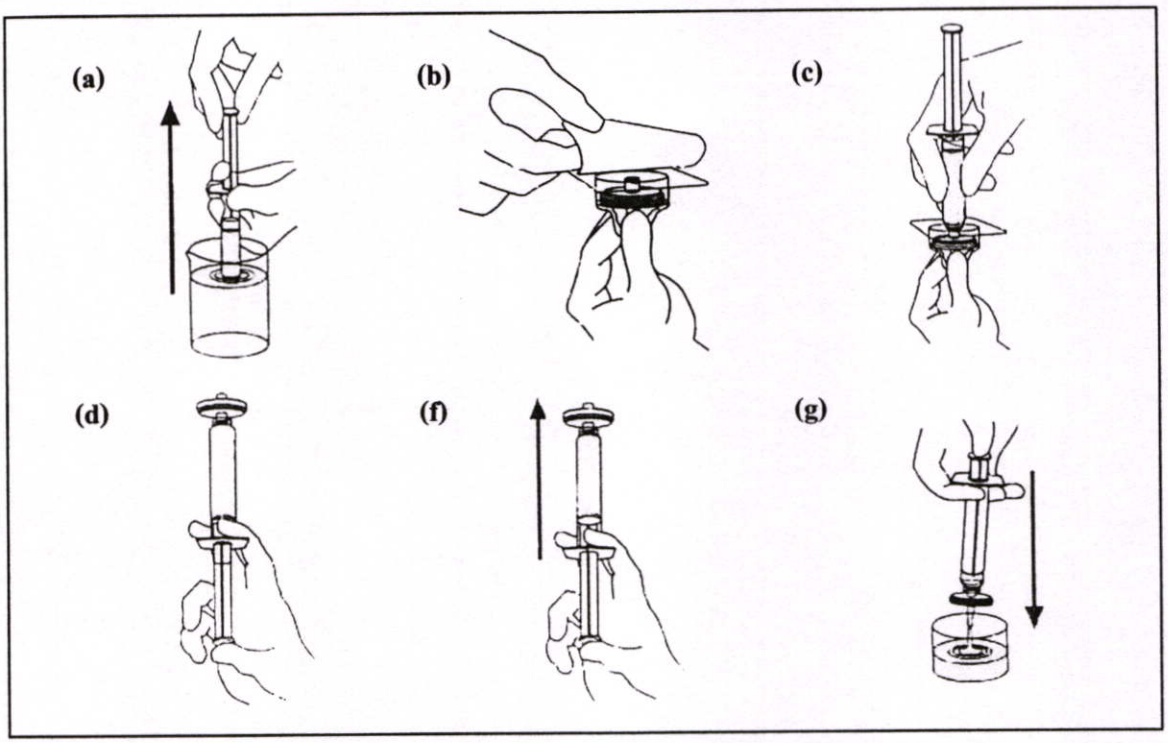
**3. การกรองสารละลายสารสกัดให้ปลอดเชื้อด้วย syringe filter membrane**

3.1 เตรียมบีกเกอร์หรือหลอดทดลองและ syringe ที่ปลอดเชื้อ

3.2 ใช้ syringe ที่ปลอดเชื้อดูดสารละลายสารสกัด (a) จากนั้นแกะ filter membrane (b) ใช้ปลาย syringe เสียบลงไป (c) ขั้นตอนการทำใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technic)

3.3 ค่อยๆ ดันไล่อากาศ (d) ที่มีอยู่ที่ปลาย syringe ออกจนถึงสารละลายสารสกัดผ่านการกรองออกมา (f)

3.4 กรองสารละลายสารสกัดผ่าน filter membrane ลงในบีกเกอร์หรือหลอดทดลอง (g) ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1




**ภาพที่ ก3** ขั้นตอนการกรองด้วย syringe filter membrane

ที่มา : www.millipore.com/millex

# ภาคผนวก ข

## อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

**1. Baird-Parker medium**

| | | |
|---|---|---|
| Tryptone | 10 | g. |
| Beef extract | 5 | g. |
| Yeast extract | 1 | g. |
| Glycine | 12 | g. |
| Sodium pyruvate | 10 | g. |
| Lithium chloride | 5 | g. |
| Ager | 20 | g. |
| pH | 7.0± 0.2 | |

หลังจากฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันแล้ว รอให้อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเหลือประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส เติมสารละลาย egg yolk tellurite enrichment ลงไป 60 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 940 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงจานเพาะเชื้อ

**2. Egg yolk tellurite enrichment**

แช่ไข่ทั้งเปลือกในเอธิลแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใช้คีบคีบซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วคีบไข่ไปวางบนจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้จนแห้งต่อยเปลือกไข่ให้แตกโดยเทคนิคปลอดเชื้อ แยกไข่แดงออกจากไข่ขาว หลังจากนั้นผสมไข่แดงกับสารละลาย normal saline (0.85% NaCl) ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตรผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ส่วนผสมนี้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเทลลูโรท์ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

**3. MRS agar (soft medium)**

| | | |
|---|---|---|
| Peptone from casein | 10 | g. |
| Meat extract | 8 | g. |
| Yeast extract | 4 | g. |
| Glucose | 20 | g. |
| di-ammonium hydrogen citrate | 2 | g. |
| Sodium acetate | 5 | g. |

| | | |
|---|---|---|
| Magnesium sulfate | 0.2 | g. |
| Tween® 80 | 1 | g. |
| Agar | 10 | g. |
| pH | 5.7 ± 0.2 | |

ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร เข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**4. MRS broth**

| | | |
|---|---|---|
| Peptone from casein | 10 | g. |
| Meat extract | 8 | g. |
| Yeast extract | 4 | g. |
| Glucose | 20 | g. |
| di-ammonium hydrogen citrate | 2 | g. |
| Sodium acetate | 5 | g. |
| Magnesium sulfate | 0.2 | g. |
| Tween® 80 | 1 | g. |
| pH | 5.7 ± 0.2 | |

ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร เข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**5. Trypticase soy broth with 0.6% yeast extract**

| | | |
|---|---|---|
| Trypticase peptone | 17 | g. |
| NaCl | 5 | g. |
| Glucose | 2.5 | g. |
| phytone peptone | 3 | g. |
| Dipotassium hydrogen phosphate | 2.5 | g. |
| Yeast extract | 6 | g. |
| pH | 7.3± 0.2 | |

ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร เข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**6. Trypticase soy agar with 0.6% yeast extract (soft medium)**

| | | |
|---|---|---|
| Trypticase peptone | 17 | g. |
| NaCl | 5 | g. |
| Glucose | 2.5 | g. |
| phytone peptone | 3 | g. |
| Dipotassium hydrogen phosphate | 2.5 | g. |
| Yeast extract | 6 | g. |
| Agar | 10 | g. |
| pH | 7.3± 0.2 | |

ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร เข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**7. Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar**

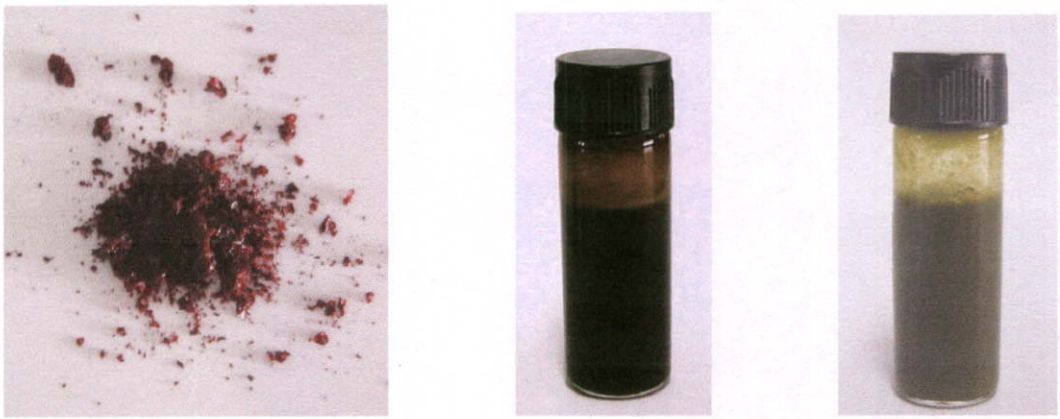
| | | |
|---|---|---|
| Yeast extract | 3 | g. |
| L-Lysine | 5 | g. |
| Xylose | 3.75 | g. |
| Lactose | 7.5 | g. |
| Sucrose | 2.5 | g. |
| Sodium desoxycholate | 2.5 | g. |
| Ferric ammonium citrate | 0.8 | g. |
| Sodium thiosulfate | 6.8 | g. |
| NaCl | 5 | g. |
| Agar | 15 | g. |
| Phenol red | 0.08 | g. |
| pH | 7.4± 0.2 | |

ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือด ปล่อยให้เย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

# ภาคผนวก ค

## ลักษณะของสารสกัดและลักษณะการเจริญของเชื้อทดสอบ

1. ลักษณะของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานก่อนเตรียมใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์



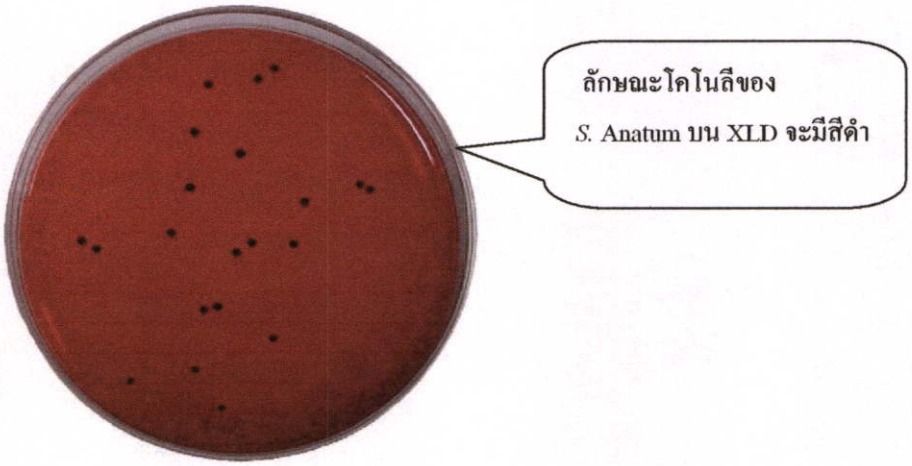
(1) (2) (3)

**ภาพ ค1-3** ลักษณะของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง (1) เปลือกส้ม (2) และเมล็ดส้มเขียวหวาน (3) ที่นำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

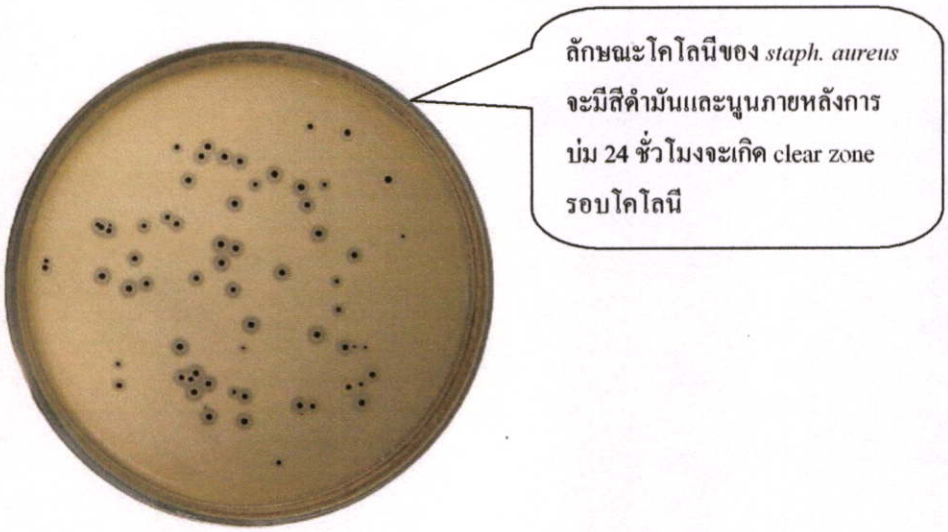
2. ลักษณะการเจริญของเชื้อทดสอบต่าง ๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของสารสกัดต่าง ๆ ต่อเชื้อทดสอบนั้นจำเป็นต้องตรวจสอบเบื้องต้นถึงสายพันธุ์ของเชื้อทดสอบเพื่อยืนยันว่าเป็นสายพันธุ์ที่ต้องการ โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเฉพาะ (selective media) และย้อมแกรมก่อนทำการทดลอง

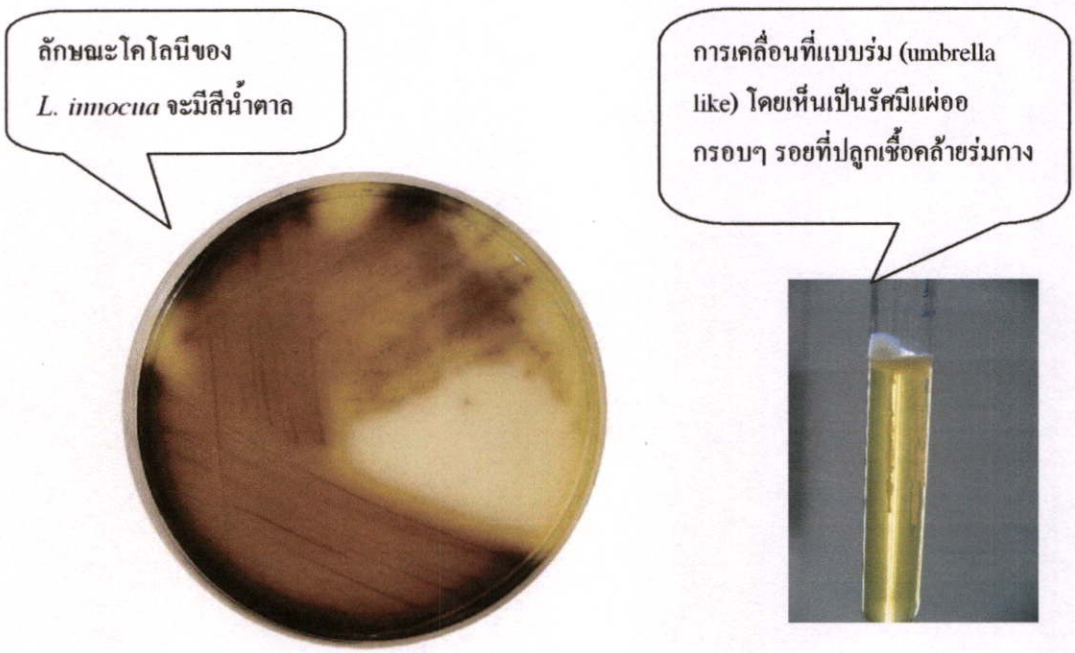
**ภาพ ค4** ลักษณะการเจริญของ *E.coli* JM109 บนอาหาร EMB (Eosin Methyleine-blue Lactose Sucrose Agar)




**ภาค ค5** ลักษณะการเจริญของ *S.* Anatum บนอาหาร XLD agar (Xylose Lysine Deoxycholate)




**ภาค ค6** ลักษณะการเจริญของ *staph. aureus* ATCC 12600 บนอาหารBP (Baird-parker ager)

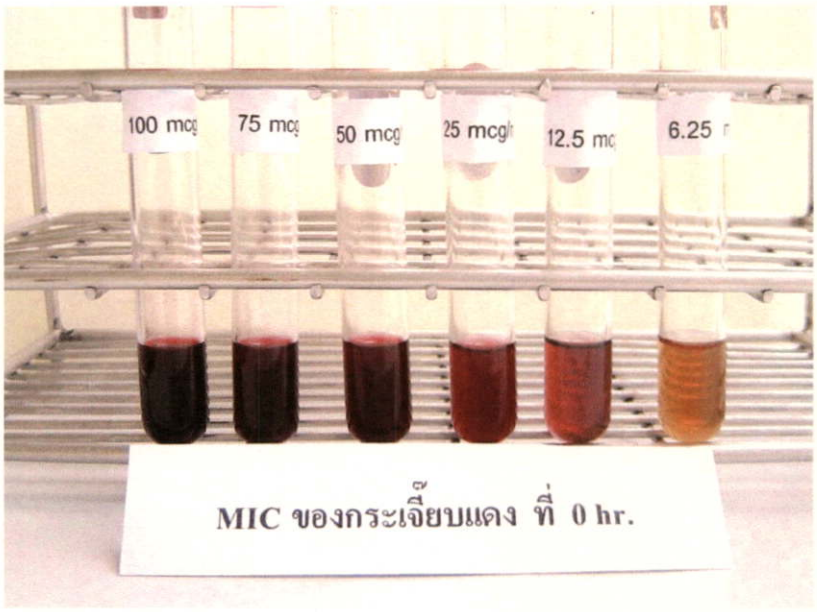


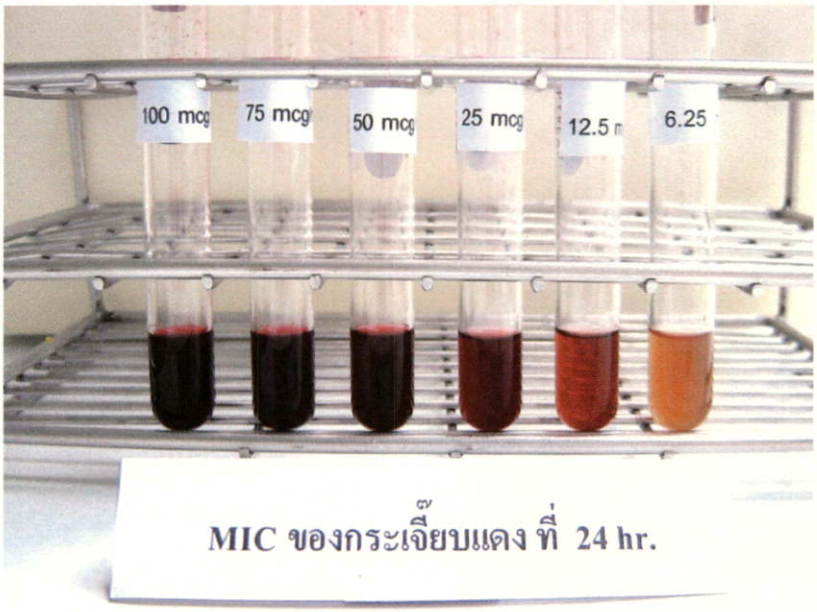

**(1)** **(2)**

**ภาค ค7** ลักษณะการเจริญของ *L. innocua* ATCC 33090 บนอาหาร Oxiod ager (1) และในอาหาร TSAYE-soft agar (2)

# ภาคผนวก ง

## MIC ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงต่อแบคทีเรียทดสอบ




**ภาพที่ ง1** ผลการทดสอบ MIC ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น 100, 75, 50, 25, 12.5 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาบ่ม 0 และ 24 ชั่วโมง

# ประวัติผู้เขียน

นางสาวศุภร อังศุจินดา เกิดวันที่ 3 พฤษภาคม 2523 ที่จังหวัดราชบุรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วทบ.) สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร จากมหาวิทยาลัยหอการค้าไทยเมื่อปี พ.ศ. 2545 และศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วทม.) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในสาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ.2549