บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

1. วัสดุอุปกรณ์

1.1 ขวดรูปชมพู่

1.2 ชุดเครื่องแก้วกลั่นระเหย (Evaporation flask)

1.3 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

1.4 หลอดทดลอง

1.5 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.6 ลูป (Loop)

1.7 สไลด์และแผ่นปิดสไลด์

1.8 ไม้บรรทัด

1.9 ไม้พันสำลี

1.10 หัวกรองขนาด 0.20 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Minisart RC 25 ประเทศเยอรมนี

1.11 กระดาษกรอง Whatman filter No.1 ประเทศอังกฤษ

1.12 กระบอกตวง (Cylender)

1.13 บีกเกอร์ (Beaker)

1.14 แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)

2. เครื่องมือ

2.1 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler รุ่น PG 802-S ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

2.2 ไมโครปิเปต (Micropipette) ยี่ห้อ Gilson รุ่น N21808C ประเทศฝรั่งเศส

2.3 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ยี่ห้อ Tomy autoclave รุ่น SS-325 ประเทศญี่ปุ่น

2.4 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น KG 8540 ประเทศเยอรมนี

2.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE400 ประเทศเยอรมนี

2.6 กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Olympus รุ่น CH30RE200 ประเทศเยอรมนี

2.7 เครื่องกรองแบบสุญญากาศ (Vacuum pump) ยี่ห้อ Thomas รุ่น DOA-V130-BN ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.8 เครื่องปั่นผสม (Vortex) ยี่ห้อ Genie-2 รุ่น G-560E ประเทศอังกฤษ

2.9 เครื่องปั่น (Blender) ยี่ห้อ Moulinex รุ่น AW9 ประเทศอินโดนีเซีย

2.10 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น 854 Schwabach ประเทศเยอรมนี

2.11 เครื่องกลั่นระเหยแห้ง (Rotary evaporator) ยี่ห้อ Buchi รุ่น R-205/V Basic ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

2.12 Laminar flow biological safety cabinet ยี่ห้อ Super Clean รุ่น 150 VC ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.13 เครื่องเขย่า (Shaker) ยี่ห้อ PNP Green SSeriker II ประเทศไทย

2.14 เครื่องตีผสมอาหาร (Stomacher) ยี่ห้อ AES รุ่น 03561284 ประเทศฝรั่งเศส

2.15 ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. สารเคมี

3.1 Gram's crystal violet solution

3.2 Gram's safranin O solution

3.3 Gram's iodine solution

3.4 Gram's alcohol solution

3.5 Alcohol 70% และ 95%

3.6 Catalase reaction

3.7 Oxidase reaction

3.8 NaCl 7.5% (w/v)

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย

4.1.1 0.1% (w/v) Peptone water ยี่ห้อ HiMedia ประเทศอินเดีย

4.1.2 Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) agar ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.1.3 Plate count agar (PCA) ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.1.4 Baird-Parker RPF agar (BPA) ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.1.5 Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.1.6 MacConkey Agar ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.1.7 Violet Red Bile Lactose Agar (VRBA) ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

4.2.1 Triple Sugar Iron (TSI) agar

4.2.2 Lysine Iron Agar (LIA)

4.2.3 Urea agar ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.2.4 Semisolid Indole Motility Test (SIM) medium ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.2.5 EC broth ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.2.6 ชุดทดสอบ API 20E system (BioMeriexeux, Marcy l'Etoile, France)

4.2.7 ชุดทดสอบ API Staph system (BioMeriexeux, Marcy l'Etoile, France)

4.2.8 ชุดทดสอบ API 20E kit (BioMeriexeux, Marcy l'Etoile, France)

4.2.9 *Salmonella* Sero-Quick ID kit

วิธีดำเนินการทดลอง

จากการศึกษาภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์ และแบคทีเรียก่อโรค" ที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 ได้ค้นพบองค์ความรู้ในการประยุกต์ใช้พืชสมุนไพรท้องถิ่นมากมาย ดังนั้นในการศึกษาของโครงการวิจัยนี้คณะผู้วิจัยจะดำเนินการศึกษาต่อเนื่อง เพื่อประโยชน์ทางการค้าของจังหวัดชลบุรี และเพื่อให้อาหารทะเลและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งเป็นอัตลักษณ์ของจังหวัดชลบุรีต่อไป โดยการประยุกต์ใช้สมุนไพรชนิดอื่นที่ได้ทำการทดสอบคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสเบื้องต้นว่าเหมาะสมต่อผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคตามผลการศึกษาของโครงการดังกล่าว รวมทั้งมีกลิ่นที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคเมื่อนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

1. การคัดเลือกพืชสมุนไพรที่เหมาะสม

จากการศึกษาภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์และแบคทีเรียก่อโรค" ที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 และจากผลการศึกษาที่ผ่านมาของสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ (2553ค) พบว่าพืชสมุนไพร 5 ชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้บางส่วน ดังนั้นจึงนำสารสกัดของพืชสมุนไพรเหล่านี้มาศึกษาต่อในโครงการวิจัยนี้ เนื่องจากอาจจะมีการพัฒนาเพื่อการจดอนุสิทธิบัตร/สิทธิบัตร จึงได้ทำการปกปิดชื่อสมุนไพร

2. การทดสอบผลของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารทะเลแห้ง

(Lin et al., 2005; Zhang et al., 2009)

ตัดตัวอย่างหมึกแห้งแปรรูปขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 2 x 2 เซนติเมตร จากนั้นแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ดังนี้ ชุดที่ 1 ไม่เติมสารสกัดพืชสมุนไพร (ชุดควบคุม) ชุดที่ 2 เติมสารสกัดพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 5, 20 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ได้จากการศึกษาในโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนตัวอย่างหมึกแห้งแปรรูป นำตัวอย่างมาผึ่งให้แห้งในตู้ Laminar flow biological safety carbinet เป็นเวลา 15 นาที ส่วนชุดควบคุมให้เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนสารสกัดพืชสมุนไพร

นำตัวอย่างหมึกแห้งแปรรูปมาเก็บรักษาในถุงพลาสติก (ถุงละ 1 ตัวอย่าง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนข้าม (Cross contamination)) แล้วนำมาแช่เย็นในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยนำตัวอย่างหมึกแห้งแปรรูปมาตรวจนับปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรป แบคทีเรียกลุ่มทนเกลือ กลุ่มราและยีสต์ แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มและ *E. coli* แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียกลุ่ม *Salmonella* spp. ในวันที่ 0, 2, 5, 8, 11 และ 17 ของการทดลอง โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

2.1 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (Total heterotrophic bacteria; Jeyasekaran et al., 2004)

ใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดตัวอย่างอาหารให้ละเอียด นำตัวอย่างอาหารจำนวน 3 ชิ้น (ชิ้นละประมาณ 0.5 กรัม) ใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อจำนวน 3 ถุง เติมสารละลาย 0.1% (w/v) Peptone water ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ลงในถุงบรรจุตัวอย่าง ตีผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องตีผสมอาหาร (Stomacher) เป็นเวลา 60 วินาที จะได้ตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 10^{-1} จากนั้นใช้ไมโครปิเปตถ่ายตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 0.1% (w/v) Peptone water ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) จะได้ตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 10^{-2} แล้วเจือจางตัวอย่างด้วยวิธีเดียวกันจนได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-6}

ปิเปตสารละลายตัวอย่างของแต่ละระดับความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-6} ปริมาตรละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วด้วยวิธีเกลี่ยเชื้อ (Spread plate) นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและบันทึกผลเป็น CFU/g และจำแนกแบคทีเรียกลุ่มเฮท-เทอโรโทรปโดยนำโคโลนีที่แตกต่างกันที่พบอาหารเลี้ยงเชื้อไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตามวิธีการของ Holt at al. (1994)

2.2 การตรวจนับราและยีสต์ (Bacteriological Analytical Manual [BAM], 1998)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.1 ของแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน (ไม่ต้องคว่ำจานเพาะเชื้อ) นับจำนวนโคโลนีของราและยีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในช่วง 10-150 โคโลนี และบันทึกผลเป็น CFU/g

2.3 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มทนเกลือ (Salt tolerant bacteria; Fontan et al., 2007)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.1 ของแต่ละระดับความเจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 7.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและบันทึกผลเป็น CFU/g และจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มทนเกลือโดยนำโคโลนีที่แตกต่างกันที่พบอาหารเลี้ยงเชื้อไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามวิธีการของ Holt at al. (1994)

2.4 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มและ *E. coli* (Leclercq et al., 2002)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.1 ที่ระดับความเจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Violet Red Bile Lactose Agar (VRBA) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและคำนวณเป็น CFU/g โดยจะมีโคโลนีสีแดงอมม่วงและมีวงขุ่นรอบโคโลนี (Presumptive coliform)

เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียโคลิฟอร์มมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth บ่มที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเชื้อที่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซมาย้อมแกรมเพื่อให้แน่ใจว่าก๊าซที่เกิดขึ้นเกิดจาก *E. coli* ยืนยันผลอีกครั้งด้วยชุดทดสอบ API 20E system (BioMeriexeux, Marcy l'Etoile, France) คำนวณปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มและ *E. coli* โดยพิจารณาจากผลการทดลองที่เกิดขึ้น

2.5 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae; Finney et al., 2003)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.1 ที่ระดับความเจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey Agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่งโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและบันทึกผลเป็น CFU/g และจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีโดยนำโคโลนีที่แตกต่างกันที่พบอาหารเลี้ยงเชื้อไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตามวิธีการของ Holt at al. (1994)

2.6 การตรวจนับ *Staphylococcus aureus* (Normanno et al., 2005)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.1 ที่ระดับความเจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker RPF agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่งโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและบันทึกผลเป็น CFU/g และเลือกโคโลนีเฉพาะของ *S. aureus* บนจานเพาะเชื้อ ได้แก่ โคโลนีขนาด 1.5 มิลลิเมตรหรือใหญ่กว่า ผิวเรียบ นูน ขอบเรียบ สีดำ น้ำตาลหรือเทาเข้ม มีวงขุ่นรอบโคโลนี และ/หรือ มีวงใสใต้วงขุ่น มาย้อมแกรมและทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลส จากนั้นยืนยันผลอีกครั้งด้วยชุดทดสอบ API Staph system (BioMeriexeux, Marcy l'Etoile, France)

2.7 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Salmonella* spp. (Skandamis et al., 2002)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.1 ที่ระดับความเจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่งโมง นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *Salmonella* คือมีโคโลนีสีชมพู อาจมีหรือไม่มีจุดดำตรงกลาง หรืออาจเป็นสีดำหมดทั้งโคโลนี บันทึกผลเป็น CFU/g และนำเชื้อที่ได้มายืนยันผลด้วยชุดทดสอบ API 20E kit (BioMeriexeux, Marcy l'Etoile, France) และจัดจำแนกซีโรไทป์ด้วย *Salmonella* Sero-Quick ID kit