

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. กระเทียมและหอมหัวใหญ่ จากตลาดสดบางคอแหลม กรุงเทพมหานคร
2. เชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* sp. จาก ศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar, nutrient broth, plate count agar และ peptone (ยี่ห้อ Himedia ประเทศอินเดีย) และ Mueller hinton agar (ยี่ห้อ Oxoid ประเทศอังกฤษ)
4. Kanamycin (antibiotic) (ยี่ห้อ Thai meiji ประเทศไทย)
5. เครื่องบด (blender) (ยี่ห้อ pensonic รุ่น PB-330 บริษัท ไลฟ์ โอเรียนท์ จำกัด ประเทศมาเลเซีย)
6. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (ยี่ห้อ Memmert รุ่น UFE 600 ประเทศเยอรมัน)
7. เครื่องอัลตราโซนิก (ultrasonic) (ยี่ห้อ Elma รุ่น E100H ประเทศเยอรมัน)
8. เครื่องเขย่าผสมสาร (shaker) (ยี่ห้อ IKA รุ่น KS130 ประเทศเยอรมัน)
9. เครื่อง Rotary evaporator (ยี่ห้อ Buchi รุ่น R-200, vacuum controller V-800 ประเทศ สวิตเซอร์แลนด์)
10. เครื่องวัดสี (MiniScan[®] EZ) (ยี่ห้อ Hunter Lab รุ่น MiniScan[®] EZ ประเทศสหรัฐอเมริกา)
11. เครื่อง Gas Chromatography – Mass Spectrometer (GC-MS) (ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7890A MS คอลัมน์ DB-5MS capillary column (ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร หน้า 0.25 ไมโครเมตร) บริษัท J&W Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา)
12. เครื่องวัดค่าหักเหแสง (hand-held refractometer) (ยี่ห้อ Atago รุ่น R-5000 ประเทศญี่ปุ่น) (วัดการหักเหแสง (Refractive Index) Measurement Range (nD) 1.333 ถึง 1.520)
13. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) (ยี่ห้อ Thermo electron corporation รุ่น Genesys 10-S ประเทศสหรัฐอเมริกา)
14. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave) (ยี่ห้อ HIRAYAMA รุ่น HVE-25/50 ประเทศญี่ปุ่น)
15. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) (ยี่ห้อ Faster รุ่น BH-EN 2004 ประเทศอิตาลี)
16. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) (ยี่ห้อ MMM รุ่น ECOCELL III ประเทศไทย)
17. อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง (beaker, erlenmeyer flask, test tube, petri dish, spreader glass) กระดาษกรอง (paper disc) ขนาด 6 มิลลิเมตร (ยี่ห้อ Whatman ประเทศอังกฤษ) และเครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น Dragon 303 ประเทศเยอรมัน) เป็นต้น

18. สารเคมีต่างๆที่ใช้ในการทดลอง เช่น ethanol ร้อยละ 95 (commercial grade), petroleum ether (commercial grade), dimethyl sulfoxide (DMSO) (ยี่ห้อ Sigma-aldrichประเทศสหรัฐอเมริกา), folin-Ciocalteu phenol reagent (AR gradeยี่ห้อ Loba Chemieประเทศอินเดีย), sodium carbonate (AR gradeยี่ห้อ Univar ประเทศออสเตรเลีย), gallic acid (AR gradeยี่ห้อ Sigma-aldrichประเทศสหรัฐอเมริกา), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (AR gradeยี่ห้อ Sigma-aldrichประเทศสหรัฐอเมริกา), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) (AR gradeยี่ห้อ Flukaประเทศเยอรมัน) และ potassium persulfate (AR gradeยี่ห้อ Analaarประเทศอังกฤษ)

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

นำกระเทียมและหอมหัวใหญ่มาล้างให้สะอาดและผึ่งให้แห้ง จากนั้นแบ่งตัวอย่างเป็น 2 ส่วน คือ ตัวอย่างสดและทำเป็นตัวอย่างอบแห้ง โดยตัวอย่างสดนำกระเทียมและหอมหัวใหญ่มาบดให้ละเอียด สำหรับตัวอย่างแห้งนำพืชทั้งสองชนิดมาอบด้วยเครื่องอบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง

3.2.1 การสกัดสารจากกระเทียมและหอมหัวใหญ่

นำตัวอย่างกระเทียมและหอมหัวใหญ่สดและแห้งที่เตรียมไว้ในขั้นตอนข้างต้น มาบดให้ละเอียด ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติมตัวทำละลายต่างกัน 3 ชนิด คือ น้ำ เอทานอล และปิโตรเลียมอีเทอร์ (สัดส่วน 1:2) เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำมาสกัดด้วยวิธีการ 2 วิธี คือวิธีการแช่ (merceration) นาน 3 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก ชีระพงษ์ขันตเจริญ, 2554) และใช้คลื่นอัลตราโซนิค (ultrasonic extraction) นาน 1 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Sanghi และ Kannamkumarath, 2004) นำสารสกัดที่ได้มากรองกากออกด้วยผ้าไนลอนขนาด 80 mesh และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator condensation ได้ crude extracts เก็บใส่ขวดสีชา เพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.2.1.1 ร้อยละปริมาณของสารสกัดกระเทียมและหอมหัวใหญ่ (%yield)

$$\% \text{yield (dry basis)} = \frac{\text{ปริมาณของสารที่สกัดได้ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)}}$$

3.2.1.2 ค่าดัชนีหักเหคลื่นแสง

วิเคราะห์ดัชนีหักเหคลื่นแสง (refractive index; RI) โดยใช้เครื่อง hand-held refractometer (วัดการหักเหคลื่นแสง (Refractive Index) ช่วงการวัดเท่ากับ (nD, refractive indices) 1.333 ถึง 1.520) นำหลอดหยด (dropper) หยดตัวอย่างสารสกัดกระเทียมและหอมหัวใหญ่ หยดลงบนแผ่นปริซึมของตัวเครื่องประมาณ 1 หยด ปรับค่าจนเห็นเส้นแบ่งแถบมืดแถบสว่างได้อย่างชัดเจน อ่านค่าการหักเหคลื่นแสงของสารสกัดที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส บันทึกค่าที่วัดได้

3.2.1.3 ลักษณะปรากฏ

วิเคราะห์ลักษณะปรากฏของสารสกัดกระเทียมและหอมหัวใหญ่ด้วยสายตา และรายงานลักษณะปรากฏ (สี ความหนืด ความขุ่นและใส) ของสารสกัดที่สังเกตได้

3.2.1.4 ค่าสี

นำสารสกัดกระเทียมและหอมหัวใหญ่มาวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี Hunter Lab อ่านค่าตามระบบ CIE ได้แก่ L^* , a^* , b^* , C และ H° โดยนำสารสกัดตัวอย่าง 3 มิลลิลิตร เทลงในเซลล์แก้ว วัดค่าสี บันทึกค่าที่วัดได้ โดยค่า

L^* เป็นค่าที่รายงานความเข้มและสว่างของสีมีค่า 0-100

ซึ่งค่า 100 หมายถึง สีขาว และค่า 0 หมายถึง สีดำ

a^* เป็นค่าที่รายงานความการเปลี่ยนแปลงของสีในช่วงสีเขียวถึงสีแดง

ซึ่งค่า a^* เป็น - (ลบ) หมายถึงช่วงสีน้ำเงิน-เขียว และค่า a^* เป็น + (บวก) หมายถึงช่วงสีแดง-ม่วง

b^* เป็นค่าที่รายงานความการเปลี่ยนแปลงของสีในช่วงสีน้ำเงินถึงสีเหลือง

ซึ่งค่า b^* เป็น - (ลบ) หมายถึง ช่วงสีน้ำเงิน และค่า b^* เป็น + (บวก) หมายถึง ช่วงสีเหลือง

C (chroma) เป็นค่าที่แสดงความบริสุทธิ์ของสี

ค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึงวัตถุมีสีซีดจาง (เทา) และค่าเข้าใกล้ 60 หมายถึงวัตถุมีสีเข้ม

H° (hue angle) เป็นค่าที่แสดงถึงสีแท้จริงที่ปรากฏให้เห็นซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0-360° โดยแต่ละช่วงองศาสามารถแสดงสีแตกต่างกันคือ

0-45° แสดงสีม่วงแดงถึงสีส้มแดง

45-90° แสดงสีส้มแดงถึงสีเหลือง

90-135° แสดงสีเหลืองถึงเหลืองเขียว

135-180° แสดงสีเหลืองเขียวถึงเขียว

180-225° แสดงสีเขียวถึงสีน้ำเงิน

225-270° แสดงสีน้ำเงินเขียวถึงน้ำเงิน

270-315° แสดงสีน้ำเงินถึงม่วง

315-360° แสดงสีม่วงถึงม่วงแดง

3.2.1.5 วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolics) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent (ตามวิธีของ Singleton และ Rossi, 1965) โดยใช้ตัวอย่างสารสกัด 6.6 ไมโครลิตร: น้ำกลั่น 993.4 ไมโครลิตรเติม Folin-Ciocalteu phenol ร้อยละ 10 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 8 นาที เติมสารละลาย sodium carbonate 4 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบผลกับกราฟของสารละลายมาตรฐาน กรดแกลลิก (gallic acid) ความเข้มข้น 0-100 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.2.1.6 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดกระเทียมและหอมหัวใหญ่ด้วยเครื่อง Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (ดัดแปลงจากอมรรัตน์ ตั้งสกุล, 2550) โดยนำตัวอย่างสารสกัดใส่ขวด vial ปริมาณ 1 มิลลิลิตร โดยใช้คอลัมน์ชนิด DB-5 มี helium เป็นแก๊สตัวพา ฉีดตัวอย่างแบบ headspace ที่อุณหภูมิ injector 230 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิเริ่มต้น 60 องศาเซลเซียส คงไว้นาน 2 นาที เพิ่ม อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ต่อ นาที จนถึงอุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที วิเคราะห์องค์ประกอบและคำนวณ retention time index (RI) เทียบกับ สารมาตรฐานอัลเคน (C₈-C₂₀) เทียบกับ library Wiley ที่ quality match มากกว่าร้อยละ 80 และคำนวณ %peak area ดังสมการ

คำนวณ retention time index (RI)

$$RI = 100 \times \frac{[Rt(x) - Rt(z)]}{[Rt(z+1) - Rt(z)]} + 100z$$

โดยที่ Rt(x) คือ retention time (นาที) ของสารที่สนใจ

Rt(z) คือ retention time (นาที) ของ normal alkanes ก่อนสารตัวอย่าง

Rt(z+1) คือ retention time (นาที) ของ normal alkanes หลังสารตัวอย่าง

z คือ จำนวนของ carbon atoms

คำนวณ %peak area

$$\text{peak area} = \text{corrected peak area (corr. area)} \times 10^7$$

3.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

3.2.2.1 การวิเคราะห์สมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity method

วิเคราะห์คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการ DPPH radical scavenging activity assay (ตามวิธีของ Bois, 1958) โดยใช้ตัวอย่างสารสกัด 10 ไมโครลิตรเติมน้ำกลั่น 990 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 0.1mMDPPH 3 มิลลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณ % DPPH scavenging effect จากค่าการดูดกลืนแสงดังสมการ

$$\text{DPPH}^{\cdot} \text{ scavenging effect (\%)} = \left(\frac{A_{\text{cont}} + A_{\text{blank}} - A_{\text{test}}}{A_{\text{cont}}} \right) \times 100$$

โดยที่ A_{cont} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control (น้ำกลั่น + DPPH $^{\cdot}$)

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (ตัวอย่างสารสกัด + น้ำกลั่น + เอทานอล)

A_{test} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (ตัวอย่างสารสกัด + น้ำกลั่น + DPPH $^{\cdot}$)

3.2.2.2 การวิเคราะห์สมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระวิธี ABTS $^{++}$ scavenging activity assay

เตรียมสารละลาย ABTS $^{++}$ (ตามวิธีของ Re และคณะ, 1999) โดยผสมสารละลาย 7.0mM ABTS และ 2.54 mM potassium persulfate (สัดส่วน 2:1) ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางด้วยเอทานอลร้อยละ 80 วัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 0.670-0.730 นาโนเมตร โดยใช้ตัวอย่างสารสกัด 5 ไมโครลิตร เติมเอทานอลร้อยละ 80 ปริมาตร 995 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS $^{++}$ 4 มิลลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 6 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร คำนวณ % ABTS $^{++}$ scavenging effect จากค่าการดูดกลืนแสงดังสมการ

$$\text{ABTS}^{++} \text{ scavenging effect (\%)} = A_{\text{cont}} \left[\frac{A_{\text{cont}} + A_{\text{blank}} - A_{\text{test}}}{A_{\text{cont}}} \right] \times 100$$

โดยที่ A_{cont} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control (น้ำกลั่น + ABTS $^{++}$)

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank (ตัวอย่างสารสกัด + น้ำกลั่น + เอทานอล)

A_{test} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (ตัวอย่างสารสกัด + น้ำกลั่น + ABTS $^{++}$)

3.2.3 ศึกษาประสิทธิภาพการเป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ

3.2.3.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* sp.) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเชี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (shaker) ใช้ความเร็ว 240 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงไว้ใน NB มาวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับสารละลาย Mcfarland No.0.5 ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตรโดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (เจือจางเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ NB) จากนั้นนำเชื้อมาทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

3.2.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Disc diffusion

การทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion (ตามวิธีของ Gomez และคณะ, 2010) ใช้ไมโครปิเปตดูดเชื้อแบคทีเรียมา 100 ไมโครลิตร spread ลงบนอาหาร MullerHinton agar (MHA) ให้ทั่ว จากนั้นวาง paper disc เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ใน plates ที่มีเชื้อแบคทีเรียต่างชนิดกัน แปรความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 4 ความเข้มข้น คือ 0, 500, 5000 และ 50,000 พีพีเอ็มหยดสารสกัดกระเทียมและหอมหัวใหญ่ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบน paper disc เปรียบเทียบกับสาร antibiotic (Kanamycin) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้งได้ (มิลลิเมตร)

3.2.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar diffusion

การทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี agar diffusion (ดัดแปลงจาก Kapoor และคณะ, 2009) ใช้ไมโครปิเปตดูดเชื้อแบคทีเรียมา 100 ไมโครลิตร spread ลงบนอาหาร Muller Hinton agar (MHA) ให้ทั่ว จากนั้นใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรเจาะเพื่อเอา agar ออก แปรความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 4 ความเข้มข้น คือ 0, 500, 5000 และ 50,000 พีพีเอ็มหยดสารสกัดปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงบน well เปรียบเทียบกับสาร antibiotic (Kanamycin) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้ง (มิลลิเมตร)

3.2.4 การประยุกต์สารสกัดกระเทียมและหอมหัวใหญ่กับเนื้อหมูปด

3.2.4.1 ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดกระเทียมและหอมหัวใหญ่ร่วมกับเนื้อหมูปด

ชั่งเนื้อบดหมู 25 กรัม ใส่ถุง zip lock เดิมเชื้อ *Escherichia coli* (*E.coli*) และ *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) ความเข้มข้น 10^5 CFU ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

จากนั้นเติมสารสกัดกระเทียมและหอมหัวใหญ่ที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลโดยใช้กลั่นอัลตราโซนิกที่ความเข้มข้น 5,000 พีพีเอ็ม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ลงในถุงที่มีตัวอย่างเนื้อหมูปดที่เดิมเชื้อแบคทีเรีย (เดิมเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ปริมาตร 10^5 CFU) และตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ไม่เติมเชื้อแบคทีเรีย ปิดปากถุงให้สนิท เก็บรักษาในตู้เย็นนาน 5 วัน (เก็บตัวอย่างอาหารมาทดสอบวันที่ 1, 3 และ 5) โดยนำตัวอย่างอาหารทดสอบหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด หาปริมาณเชื้อ *E.coli* และ *S.aureus*

3.2.4.2 ตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count)

ตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (ดัดแปลงจาก Massa และคณะ, 1998) โดยเจือจางสารละลายตัวอย่างเนื้อหมูให้มีระดับความเจือจางเท่ากับ 10^{-1} - 10^{-6} ของสารละลายตัวอย่าง (นำตัวอย่างเนื้อหมูที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.4.1 มาเติมสารละลายเพปโตนร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันได้สารละลายตัวอย่างเนื้อหมูที่มีระดับความเจือจางเท่ากับ 10^{-1} ของสารละลายตัวอย่าง จากนั้นปิเปตตัวอย่างสารละลายตัวอย่างเนื้อหมูที่มีระดับความเจือจาง 10^{-1} ของสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายเพปโตน 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ได้สารละลายตัวอย่างเนื้อหมูที่มีระดับความเจือจางเท่ากับ 10^{-2} ของสารละลายตัวอย่าง เจือจางสารละลายตัวอย่างเนื้อหมู จนมีระดับความเจือจางเท่ากับ 10^{-6} ของสารละลายตัวอย่าง) โดยใช้เทคนิค spread plate เตรียม total plate count agar ละลายในน้ำกลั่นให้สารละลายมีลักษณะใส นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave จากนั้นเทใส่ plate ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นและมีลักษณะแข็งเป็นวุ้น จากนั้นหยดสารละลายตัวอย่างอาหารที่มีระดับความเจือจางต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร spread ให้ทั่ว plate จนสารละลายตัวอย่างอาหารแห้ง ปิดฝา plate นำไปบ่มในตู้อบเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เลื่อนนับจำนวนโคโลนีในระดับความเจือจางที่ขึ้นใน plate ให้ค่า 25-250 โคโลนี จากนั้นคำนวณโคโลนีที่นับได้มีหน่วยเป็น CFU/g (colony forming unit/gram)

3.2.4.3 วิธีตรวจหาปริมาณ *E.coli* และ *S.aureus*

ตรวจหาปริมาณ *E.coli* และ *S.aureus* (ตามวิธีของ Nissui, 2004) โดยเจือจางสารละลายตัวอย่างเนื้อหมู ให้มีระดับความเจือจางเท่ากับ 10^{-1} - 10^{-6} ของสารละลายตัวอย่าง (นำตัวอย่างเนื้อหมูที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.4.1 มาเติมสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันได้ สารละลายตัวอย่างเนื้อหมูที่มีระดับความเจือจางเท่ากับ 10^{-1} ของสารละลายตัวอย่างจากนั้นปิเปตตัวอย่างสารละลายตัวอย่างเนื้อหมูที่มีระดับความเจือจาง 10^{-1} ของสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายเปปโตน 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันได้ สารละลายตัวอย่างเนื้อหมูที่มีระดับความเจือจางเท่ากับ 10^{-2} ของสารละลายตัวอย่างเจือจางสารละลายตัวอย่างเนื้อหมู จนมีระดับความเจือจางเท่ากับ 10^{-6} ของสารละลายตัวอย่าง) จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงใน compact dry สำหรับตรวจหาปริมาณเชื้อ *E.coli* ใช้ compact dry EC และตรวจหาปริมาณเชื้อ *S.aureus* ใช้ compact dry X-SA (บริษัท Nissui pharma จำกัด) ปิดฝา นำไปบ่มในตูบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงโดยการนับเชื้อ *E.coli* นับได้จากโคโลนีมีสีฟ้า ส่วนโคโลนีมีสีฟ้าม่วงหรือสีแดงเป็นเชื้อ Coliform และการนับจำนวน *S.aureus* นับได้จากโคโลนีที่มีสีฟ้าหรือสีฟ้าเขียว โดยโคโลนีมีลักษณะโค้งมน เป็นขอบและจุด center ชัดเจน เลื่อนนับจำนวนโคโลนีในระดับความเจือจางที่ขึ้นใน compact dry ที่ให้ค่า 25-250 โคโลนี จากนั้นคำนวณโคโลนีที่นับได้มีหน่วยเป็น CFU/g

3.3 สถานที่และระยะเวลาในการทดลอง

สถานที่: ห้องปฏิบัติการ Plant Science and Analysis สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร
ระยะเวลา: เมษายน 2555 ถึง สิงหาคม 2557