โครงการวิจัย

เรื่อง

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.* ของสารสกัดจากหอมหัวใหญ่

โดย

นายธนภพ	โสตรโยม
นางเกศรินทร์	เพ็ชรรัตน์
นายนพพร	สกุลยืนยงสุข
นางสาวดวงกมล	ตั้งสถิตพร
นางสาวดวงรัตน์	แซ่ตั้ง
นายกิตติ	ช้องประเสริฐ

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณรายได้
คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

ชื่อโครงงานพิเศษ การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.* ของสารสกัดจากหอมหัวใหญ่
ชื่อ นามสกุล นายธนภพ โสตรโยม
นางเกศรินทร์ เพ็ชรรัตน์
นายนพพร สกุลยืนยงสุข
นางสาวดวงกมล ตั้งสถิตพร
นางสาวดวงรัตน์ แซ่ตั้ง
นายกิตติ ช้องประเสริฐ
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์
ปี พ.ศ. 2558

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการสกัดสารสกัดหยาบจากหอมหัวใหญ่ ด้วยวิธีการแช่ยุ่ย (marceration) โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือเฮกเซน , เอทานอล และเมทานอล พบว่าการสกัดสารสกัดหยาบจากหอมหัวใหญ่ที่มีน้ำหนักแห้ง 2 กิโลกรัม จะได้ปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด เท่ากับ 1.305 3.260 และ1.306กรัมตามลำดับ จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. ของสารสกัดหอมหัวใหญ่โดยใช้ตัวทำละลาย คือ เอทานอล, เฮกเซน และเมทานอล พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ได้ โดยมีขนาดของวงใสเท่ากับ 6 มิลลิเมตรแต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Salmonella spp.* ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* จากการคัดเลือกผลจากวิธี disc diffusion techniques ซึ่งพบว่าสารสกัดหอมหัวใหญ่ที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ได้ จึงทำการศึกษาหาค่าความข้มข้นต่ำสุด(MIC) ของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ด้วยวิธี Macro broth dilution technique พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหอมหัวใหญ่เท่ากับ 25 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการตกตะกอนของสารสกัด และสารละลายด้านบนมีลักษณะใส แสดงว่า *Escherichia coli* ไม่สามารถเจริญได้ เมื่อเปรียบเทียบกับที่ความเข้มข้นที่น้อยกว่า 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารละลายขุ่นทั้งหลอด แสดงว่า *Escherichia coli* สามารถเจริญได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ : การยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli Salmonella spp.* สารสกัดหอมหัวใหญ่

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัย เรื่อง การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.* ของสารสกัดจากหอมหัวใหญ่ สำเร็จลุล่วงไปได้เป็นอย่างดี ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ คณบดีคณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มทร.พระนคร ผศ.ดร.ชญาภัทร์ กี่อารีโย ที่ได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆมาโดยตลอด พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ คำปรึกษาและคำแนะนำระหว่างการดำเนินงานโครงงานพิเศษ และสร้างความทรงจำดีดีที่มีค่าให้เกิดขึ้นในระหว่างการดำเนินการวิจัยต่อคณะผู้วิจัย

ขอขอบคุณอาจารย์ทุกท่าน เพื่อนๆและน้องๆ คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยเหลือในการตอบแบบสอบถามและข้อเสนอแนะต่างๆ และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร ที่ให้ทุนในการวิจัยและเอื้ออำนวยสถานที่และอุปกรณ์ต่างๆในการปฏิบัติงานโครงงานพิเศษ

ขอกราบขอบพระคุณครอบครัวและเพื่อน ที่คอยให้กำลังใจและให้การสนับสนุนตลอดมาและเป็นอย่างดี จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

นายธนภพ โสตรโยม
นางเกศรินทร์ เพ็ชรรัตน
นายนพพร สกุลยืนยงสุข
นางสาวดวงกมล ตั้งสถิตพร
นางสาวดวงรัตน์ แซ่ตั้ง
นายกิตติ ช้องประเสริฐ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการศึกษา	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 พืชสมุนไพรไทย	3
2.2 หอมหัวใหญ่	4
2.3 *Escherichia coli*	9
2.4 ปจจัยที่มีผลตอการเจริญเติบโต	14
2.5 อาการของโรคอาหารเปนพิษ	15
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
บทที่ 3 วิธีดำเนินการ	
3.1 วัตถุดิบ	19
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	20
3.3 วิธีการดำเนินการทดลอง	20
3.4 สถานที่	20
3.5 ระยะเวลาในการดำเนินการทดลอง	29

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง และอภิปรายผล	
4.1 การศึกษาสารละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรีย	30
4.2 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.*	32
4.3 ศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.*	34
บทที่ 5 สรุปผล และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการทดลอง	36
5.2 ข้อเสนอแนะ	36
เอกสารอ้างอิง	59
ภาคผนวก	
ก คุณลักษณะสารสกัด	45

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันผู้บริโภคเริ่มตระนักและให้ความสำคัญกับสุขภาพโดยการปริโภคอาหารที่มีประโยชน์และปลอดจากสารเคมี โดยหันมาบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพเช่นผักและผลไม้สดที่ปลอดสารเคมีมากขึ้น ผักและผลไม้เป็นวัตถุดิบซึ่งใช้เพื่อการแปรรูปอาหาร เป็นผลิตผลทางการเกษตรที่มีการเสื่อมเสียง่าย (perishable food) เนื่องจากมีปริมาณน้ำสูง มีสารอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ การผลิตในระดับอุตสาหกรรมจึงต้องมีการควบคุมที่ดีโดยเริ่มตั้งแต่แหล่งเพาะปลูก ซึ่งปัจจุบันได้มีการนำ GAP (Good Agricultural Practice) มาใช้จนกระทั่งผลิตออกมาเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมจำหน่าย นอกจากนี้ในปัจจุบันมีความต้องการในการบริโภคผักและผลไม้สดพร้อมบริโภคสูงขึ้น เช่น ผักสลัด ผลไม้บรรจุถาดพร้อมรับประทาน ดังนั้น กระบวนการผลิตจึงต้องผ่านวิธีการที่ทำให้มั่นใจว่าผักและผลไม้นั้น สะอาดและปลอดภัยต่อการบริโภค

จากรายงานการเกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจากการบริโภคผักผลไม้ พบว่าอาหารเป็นพิษที่เกิดขึ้นกับมนุษย์มีสาเหตุมาจากผักและผลไม้สดเป็นส่วนมาก โดยมีสาเหตุหลักจากการปนเปื้อนของเชื้อ แบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. เป็นส่วนใหญ่ โดยมักอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์และปะปนออกมากับอุจาระของสัตว์ และที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งแบคที่เรียทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษในมนุษย์ และการบริโภคผักและผลไม้สดนั้นไม่ผ่านความร้อนในการฆ่าเชื้อ ดังนั้น การใช้ปุ๋ยคอกบำรุงผักและผลไม้อาจทำให้เกิดการปนเปื้อนสู่อาหาร เช่น มีการตรวจพบแบคทีเรีย *Salmonella* spp. ที่ใบและรากของผักและผลไม้ที่ปลูกโดยการใช้ปุ๋ยคอก (Natving และคณะ , 2002) นอกจากนี้ยังพบว่า *Salmonella* spp., *Escherichia coli* สามารถรอดชีวิตอยู่ในปุ๋ยคอกได้เป็นระยะเวลานาน (Tauxe, 1997; Brackett, 1999) ผักผลไม้ต่างชนิดกันจะมีจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนต่างกัน จำนวนปนเปื้อนเริ่มต้นจะบ่งถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยหากมีจุลินทรีย์เริ่มต้นปนเปื้อนในวัตถุดิบมาก จะทำให้ผักและผลไม้มีคุณภาพที่ด้อยลงและมีอายุการเก็บที่สั้นกว่าปกติ (Zagory, 1999) โดยในปัจจุบันมีการใช้สารเคมีบางชนิดเพื่อยืดอายุการเก็บและยับยั้งการเจริญเติบโตรวมถึงกำจัดแบคทีเรียนี้ เช่น Sodium orthophenyl phenate หรือ SOPP , Potassium sorbate และBotran เป็นต้น สารเคมีเหล่านี้มีคุณสมบัติในการดูดซึมบางส่วน (Partially systemic) และมีพิษตกค้างในเนื้อเยื่อที่มีชีวิต ซึ่งมีพิษตกค้างที่อาจจะหลงเหลือในขณะบริโภคด้วย

การใช้สารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในระเทศไทยมีสมุนไพรหลายชนิดที่มีสารยับยั้ง เช่นพลู ทองพันชั่ง ชุมเห็ดเทศ ข่า และหอมหัวใหญ่เป็นต้น ซึ่งหอมหัวใหญ่เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่ง จังหวัดเชียงใหม่และอีกหลายจังหวัดทางภาคเหนือ มีผลผลิตออกสู่ตลาดมากช่วงเดือนกุมภาพันธ์-เมษายน ในบางปีผลผลิตมีมากเกินความต้องการของตลาด เกิดปัญหาหอมหัวใหญ่ล้นตลาดและราคาตกต่ำ (สำนักงานเกษตรจังหวัดเชียงใหม่, 2551) การเพิ่มประโยชน์ของหอมหัวใหญ่โดยการแปรรูปหรือเพิ่มประโยชน์ในการนำไปใช้ เป็นแนวทางหนึ่งที่ลดปริมาณหอมหัวใหญ่สดในช่วงเวลาที่ผลผลิตออกสู่ตลาดมากจะช่วยเพิ่มมูลค่าและสร้างรายได้ให้กับเกษตรกร โดยการแปรรูปหอมหัวใหญ่ทำได้หลายรูปแบบ เช่น หั่นฝอย ชิ้น หอมเกล็ด kibble และบดเป็นแป้ง ผลิตภัณฑ์หอมหัวใหญ่ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวาง โดยส่วนใหญ่ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารทั่วๆไป (Mazza and LeMeguer, 1980) นอกจากนี้หอมหัวใหญ่ยังมีสาระสำคัญที่มีประโยชน์มากกว่า 300 ชนิด ดังนั้นหากมีการใช้สารสกัดจากหอมหัวใหญ่ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองชนิด นี้ได้นั้นก็จะสามารถช่วยยืดอายุการเก็บของผักและผลไม้ ลดการใช้สารเคมี รวมถึงสามารถตอบสนองแนวทางการบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพของผู้บริโภคได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาสารละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียจากสารสกัดหอมหัวใหญ่

1.2.2 เพื่อศึกษาการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp.

1.2.3 เพื่อศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp.

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ทำการวิจัยโดยใช้สารที่สกัดได้จากหอมหัวใหญ่เพื่อศึกษาถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp.ไม่รวมถึงเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สารสกัดจากหอมหัวใหญ่ ทราบถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย Escherichia coli, Salmonella spp. และนำมาใช้ประโยชน์ต่อยอดโดยการนำสารสกัดที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ในด้านการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดอีกทางหนึ่ง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารต้านจุลินทรีย์หรือวัตถุกันเสียหมายถึง สารเคมีที่เติมลงในอาหารเพื่อป้องกันหรือชะลอการเสื่อมเสียของอาหาร อันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ ซึ่งอาจเป็น ยีสต์ รา หรือแบคทีเรีย คุณสมบัติของสารต้านจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในอาหารนั้น ต้องเป็นสารที่ให้ผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี ภายใต้เงื่อนไขกว้างขวาง มีช่วงในการทำงานอย่างเพียงพอ มีความคงตัวในอาหารและ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ ที่เติมลงไป หรือองค์ประกอบของอาหาร ไม่ก่อให้เกิดสี กลิ่น รส ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้ต้องไม่เป็นสารที่ทำให้เกิดพิษต่อร่างกายด้วย ส่วนใหญ่วัตถุกันเสียจะไปออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์ รบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ หรือรบกวนกลไกทางพันธุกรรมในเซลล์ เป็นผลให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้หรืออาจตายได้ในที่สุด การใช้วัตถุกันเสียในอาหารอาจใส่รวมลงไปในอาหารเลย หรือใช้การรม พ่น หรือฉาบรอบๆ ผิวของอาหารหรือภาชนะบรรจุ ปริมาณของวัตถุกันเสียที่ใช้นั้นจะแตกต่างกันออกไปขึ้นกับชนิดของอาหารและชนิดของวัตถุกันเสียที่ใช้ ทั้งนี้กระทรวงสาธารณสุขเป็นผู้กำหนดปริมาณที่อนุญาตให้ใช้ได้ ซึ่งโดยทั่วไปจะอนุญาตให้ใช้ในปริมาณแค่พอทำให้เกิดผลตามต้องการเท่านั้น ดังนั้นในระหว่างกระบวนการผลิตอาหารจะต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ เพราะถ้าอาหารมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนมาก หรืออาหารมีการเน่าเสียมาก่อนแล้ว การใช้วัตถุกันเสียจะไม่เกิดประโยชน์ การใช้วัตถุกันเสียในปริมาณที่มากเกินค่าที่กำหนดไว้จะทำให้ผู้บริโภคได้รับสารเหล่านั้นมากเกินความจำเป็นและไม่เป็นผลดีต่อร่างกาย

พืชสมุนไพรไทย เป็นพืชที่คนไทยรู้จักและนำมาใช้เป็นยารักษาโรคมาแต่โบราณ แต่ความนิยมในการใช้พืชสมุนไพรรักษาโรคลดน้อยลงไป เมื่อมีการนำวิธีการรักษาโรคตามแบบประเทศทางตะวันตกมาใช้เนื่องจากยาแผนปัจจุบันให้ผลในการรักษาโรคได้รวดเร็ว และรูปแบบของยาสะดวกในการใช้ ปัจจุบันยาสมุนไพรเริ่มกลับมาได้รับความนิยม ทั้งนี้เนื่องจากเหตุผลทางด้านเศรษฐกิจ สิ่งแวดล้อม และที่สำคัญคือประสิทธิภาพของตัวยาในพืชสมุนไพรที่เป็นสารเคมีธรรมชาติ มีอันตรายน้อยและไม่ค่อยมีผลข้างเคียง ฉะนั้นคงไม่เป็นการยากเกินไปที่จะกลับมารื้อฟื้นการใช้ยาสมุนไพรไทยในการรักษาโรค ทั้งในด้านแหล่งทรัพยากรวัตถุทางด้านพืชพันธุ์ และทรัพยากรบุคคลผู้ที่มีความรู้ด้านการรักษาโรคแบบดั้งเดิม (เต็ม สมิตินันทน์, 2523) สารสกัดที่ได้จากพืชนั้นมีหลายประเภท ถ้าจะแบ่งสารประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพร สามารถจำแนกได้เป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ primary metabolite และ secondary metabolite สาร primary metabolite เป็นสารที่มีอยู่ในพืชชั้นสูงทั่วไป เป็นผลิตผลที่ได้จากการสังเคราะห์แสง ส่วนสาร secondary metabolite เป็นสารที่มีลักษณะพิเศษและแตกต่างกันไปตามแต่ชนิดของพืช ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วสารพวก secondary metaboliteจะมีสรรพคุณทางยา เช่น สารไกลโคไซด์, น้ำมันหอมระเหย, แทนนิน และอัลคาลอยด์ (สุนทรี สิงหบุตรา,2535) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้สารสกัดจากหอมหัวใหญ่ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดการใช้สารเคมีในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

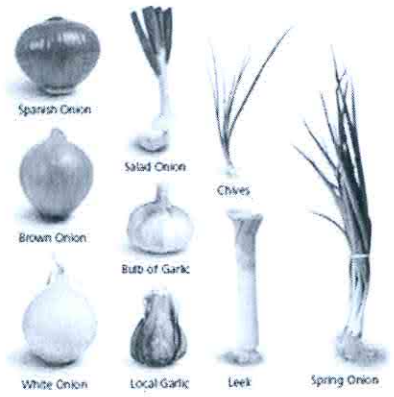
หอมหัวใหญ่

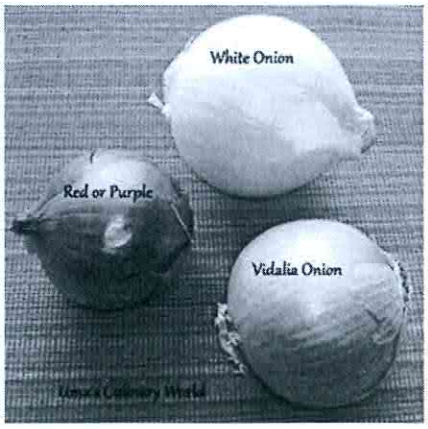
หอมใหญ่ ชื่อสามัญ Onion หอมหัวใหญ่ ชื่อวิทยาศาสตร์ Allium cepa L. จัดอยู่ในวงศ์พลับพลึง(AMARYLLIDACEAE) และอยู่ในวงศ์ย่อย ALLIOIDEAE(ALLIACEAE) สมุนไพรหอมใหญ่ มีชื่อเรียกอื่นว่า หัวหอม หอมหัวใหญ่ หัวหอมใหญ่ หอมฝรั่ง หอมหัว เป็นต้น

ลักษณะหอมหัวใหญ่

ต้นหอมใหญ่ มีถิ่นกำเนิดและมีเขตการกระจายพันธุ์ในทวีปเอเชียกลางบ้างก็บอกว่ามีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชียตะวันตกเฉียงใต้และสำหรับแหล่งผลิตที่สำคัญได้แก่ประเทศจีน สหรัฐอเมริกา และประเทศอินเดียโดยจัดเป็นพืชล้มลุก มีความสูงประมาณ 30-40 เซนติเมตร มีหัวอยู่ใต้ดินคล้ายหัวหอม ลักษณะกลมป้อม มีเปลือกนอกบาง ๆ สีม่วงแดงหุ้มอยู่ แต่เมื่อแห้งแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลลำต้นใต้ดินหรือที่เรียกว่าหัวนั้น ภายในจะมีกลีบสีขาวอวบหุ้มซ้อนกันอยู่เป็นชั้น ๆ ทำให้มีลักษณะเป็นหัวเช่นเดียวกับกระเทียมและหอมแดงสามารถปลูกได้ในดินทุกชนิดที่มีการระบายน้ำและมีอากาศดี เจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีค่าความกรดเบสในช่วง 6.0-6.8 มีความเค็มของดินปานกลาง และในอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 15-24 องศาเซลเซียส

ใบหอมใหญ่ ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเป็นกระจุก 3-4 ใบ ลักษณะเป็นรูปดาบ มีความกว้างประมาณ 2-4 เซนติเมตร และยาวประมาณ 2040 เซนติเมตร เส้นใบจีบตามยาวลักษณะคล้ายพัด ดอกหอมใหญ่ ออกดอกเป็นช่อ แทงขึ้นมาจากลำต้นใต้ดิน กลีบดอกมีสีขาว





หัวหอม ไม่ใช่เป็นแค่ผักธรรมดาทั่วไปที่นำมาใช้ในการประกอบอาหารหรือเพื่อเพิ่มรสชาติให้อาหาร และก็ไม่ได้ใหญ่แต่ชื่อและขนาด เนื่องจากมีสรรพคุณที่ใหญ่มากเพราะช่วยป้องกันและรักษาโรคสำคัญต่าง ๆ ได้หลายชนิด โดยพบว่าหัวหอมใหญ่นั้นอุดมไปด้วยวิตามิน แร่ธาตุ และสารประกอบที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของเรามากกว่า300 ชนิด

สรรพคุณหอมหัวใหญ่

หัวหอมใหญ่มีวิตามินซีสูง และยังมีสารอื่น ๆ เช่น สารเคอร์ซีทิน ที่ช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระในร่างกายและช่วยป้องกันโรคต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดีช่วยป้องกันและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งต่าง ๆ ได้ เนื่องจากหอมใหญ่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูงมากหัวหอมมีคุณสมบัติช่วยทำให้เกิดความรู้ผ่อนคลาย ทำให้รู้สึกง่วง ช่วยในการนอนหลับได้สบายการรับประทานหัวหอมสดเป็นประจะจะช่วยทำให้มีความจำที่ดีขึ้น หรือจะทานร่วมกับอาหารชนิดอื่น ๆ ก็ได้

สรรพคุณของหอมหัวใหญ่มีดังนี้ ช่วยทำให้เจริญอาหาร ช่วยทำให้พลังลงสู่ด้านล่าง ช่วยให้พลังการไหลเวียนในอวัยวะภายในร่างกายคล่องตัว ช่วยแก้ธาตุในร่างกายไม่เป็นปกติ ช่วยกำจัดสารตะกั่วและโลหะหนักที่ปนเปื้อนมากับอาหารและสะสมในร่างกาย ช่วยป้องกันและลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจ ช่วยป้องกันและลดความเสี่ยงของอัมพาตได้เป็นอย่าง หัวหอมมีฤทธิ์ช่วยรักษาโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด โดยช่วยลดปริมาณของไขมันในเส้นเลือดและช่วยในการขยายหลอดเลือด ช่วยทำให้เลือดไม่แข็งตัวไปแล้วไปอุดตันในหลอดหลอดได้ง่าย สารไซโคลอัลลิอินในหัวหอมใหญ่ ช่วยในการสลายลิ่มเลือด ป้องกันไม่ให้ลิ่มเลือดอุดตันหรือยับยั้งการรวบตัวกันของเกล็ดเลือด ปกป้องหลอดเลือดเลี้ยงสมองเกิดการอุดตันและช่วยกระจายเลือดลม การรับประทานเป็นประจำในระยะยาวจะช่วยทำให้หลอดเลือดสะอาด และลดการแข็งตัวของหลอดเลือดหอมหัวใหญ่ลดความอ้วน โดยน้ำคั้นจากหัวหอมมีสรรพคุณช่วยลดคอเลสเตอรอล ลดไขมันในเส้นเลือด ช่วยลดการเป็นพิษต่อเซลล์ไขมันในเลือดชนิดเลว ช่วยลดระดับไขมันเลว (LDL) และช่วยเพิ่มไขมันดี (HDL) ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย โดยหัวหอมสดแค่เพียงครึ่งหัวก็สามารถช่วยเพิ่มระดับไขมันดีได้ถึงร้อยละ 30 ในผู้ป่วยโรคหัวใจหรือผู้มีปัญหาเรื่องคอเลสเตอรอล ช่วยลดความดันโลหิต แก้ความดันโลหิตสูง สารอัลลิลโพรพิลไดซัลไฟด์ (Allyl propy disuldhide หรือ APDS) ในหอมใหญ่ มีคุณสมบัติช่วยลดน้ำตาลในเลือด ช่วยป้องกันและรักษาโรคเบาหวาน หัวหอมใหญ่มีสารฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ (Flavonoid glycosides) ที่มีคุณสมบัติช่วยป้องกันไขมันไม่ให้มาเกาะตามผนังหลอดเลือด ถ้าหากเกาะมาก ๆ จะเกิดภาวะเส้นโลหิตอุดตัน หรือทำให้เกิดโรคหัวใจขาดเลือดได้แคลเซียมในหอมใหญ่จะช่วยในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เป็นตัวช่วยต่อสู้กับสิ่งมีชีวิต

แปลกปลอมและช่วยเม็ดเลือดขาวในการทำลายและย่อยสลายไวรัส ช่วยป้องกันโรคกระดูกพรุนได้ดีกว่ายารักษาโรคกระดูกพรุนอย่างแคลซิโทนิน (Calcitonin)

Escherichia coli

(ภัทรชัย, 2549; โสภณ, 2524; Holt et al., 1994) E. coli เปนแบคทีเรียแกรมลบ เซลลเปนรูปแทง ขนาด 1.1-1.5 × 2.0-6.0 ไมโครเมตรจัดเรียงตัวอาจอยูแบบเซลลเดี่ยว หรืออยูเปนคู มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองออน สามารถสรางแคปซูลและสารพิษ เคลื่อนที่โดยใชแฟลกเจลลา สามารถเจริญไดทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือไรออกซิเจน เจริญไดดีในชวงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส E. coli เปนเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารโดยเฉพาะในลำไสใหญ สามารถกอโรคไดบอยกวาแบคทีเรียอื่นที่อยูในกลุม Enterobacteriaceae เหมือนกัน ซึ่งสวนใหญกอโรคติดเชื้อในทางเดินอาหารแตบางสายพันธุสามารถกอโรคนอกระบบทางเดินอาหารไดโดยโรคติดเชื้อ E. coli ที่สำคัญ ได แกโรคติดเชื้อในทางเดินอาหารโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปสสาวะโรคเยื่อหุมสมอง อักเสบ การติดเชื้อในกระแสโลหิต และโรคติดเชื้ออื่นที่พบได เชน การติดเชื้อของบาดแผลซึ่งกอโรคไดทั้งในคนปกติและคนที่มีระบบภูมิคุมกันบกพรอง จัดเปนเชื้อกอโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบบอยที่สุด E. coli ที่เปนเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารสวนใหญเปนสายพันธุไมกอโรคแตในบางบุคคลอาจพบสายพันธุกอโรคปนอยูได การเกิดโรคติดเชื้อในทางเดินปสสาวะและการติดเชื้อในกระแสเลือดสวนใหญเกิดจากเชื้อประจำถิ่น เรียกการติดเชื้อแบบนี้วา endogenous infection พบบอยในผูปวยมีภาวะภูมิคุมกันบกพรอง ในขณะที่การกอโรคในระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินหายใจและเยื่อหุมสมองมักเกิดจากการไดรับเชื้อกอโรคจากภายนอก การกอโรคในแตละระบบอาจเกิดจาก E. coliตางสายพันธุที่มีกลไกการกอโรคและสรางปจจัยกอโรคที่แตกตางกันไปดังนี้

1.1 โรคทางเดินอาหารอักเสบ (gastroenteritis) เกิดจากการับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่ปนเปอนเชื้อโดยโรคที่พบบอยคือโรคทองรวง (diarrhea) เชื้อ E. coli สายพันธุที่กอโรคทองรวง (diarrheagenic E. coli) มีหลายสายพันธุ สามารถแบงตามกลไกการกอโรคไดเปน 5 กลุม คือ enterotoxigenic E. coli (ETEC), enteropathogenic E. coli (EPEC), enteroinvasive E. coli (EIEC),enterohemorrhagic E. coli (EHEC) และ enteroaggregative E. coli (EAEC)

E. coli ที่เปนสาเหตุกอโรคทองรวงนั้น โดยทั่วไปอาศัยลักษณะอาการทางคลินิกเปนสำคัญ การตรวจทางหองปฏิบัติการเพื่อแยกกลุม หรือ serogroup สวนใหญมีจุดประสงคเฉพาะเพื่อการศึกษาทางระบาดวิทยา การวินิจฉัยทางหองปฏิบัติการทำไดหลายวิธีไดแกการเพาะเชื้อบน differential medium การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีการทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยา (serology)และการทดสอบในระดับโมเลกุล

1.2 โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปสสาวะ (urinary tract infection) พบในผูหญิงไดมากกวาผูชายผูป่วยมีอาการปสสาวะบอยและแสบขัด พบเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวปนในปสสาวะจัดเปน ascending infection ซึ่งเกิดจากการลุกลามของเชื้อสายพันธุกอโรค (uropathogenic E. coli) จากทางเดินอาหารผานทางอุจจาระของผูป่วยเขาสูทอปสสาวะและยอนขึ้นไปที่กระเพาะปสสาวะ ทำใหเกิดโรคกระเพาะปสสาวะอักเสบ (cystitis)

1.3 โรคเยื่อหุมสมองอักเสบ (meningitis) E. coli เปนสาเหตุสำคัญของโรคเยื่อหุมสมองอักเสบในทารกแรกเกิด โดยไดรับเชื้อที่ปนเปอนอยูในชองคลอด หรือทวารหนักของมารดาในระหวางคลอด สายพันธุที่กอใหเกิดโรคมักพบการสรางแคบซูลที่แอนติเจนชนิด K1

1.4 โรคปอดบวม (pneumonia) เปนการฉวยโอกาสติดเชื้อในผูที่มีความผิดปกติของรางกายอยูเดิม เชน ในผูป่วยโรคเบาหวาน ผูติดสุราเรื้อรัง และผูที่มีโรคเรื้อรังในระบบทางเดิน หายใจ รวมถึงมักเปนสาเหตุกอโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล เปนผลใหการติดเชื้อรุนแรงและมีอัตรา การตายสูง การไดรับเชื้อสวนใหญเกิดจากการสำลักเชื้อในทางเดินหายใจสวนบนลงสูทางเดินหายใจสวนลาง

1.5 การติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemia) สวนใหญมักเกิดจากการบุกรุกของเชื้อเขาสูกระแสโลหิตในผูป่วยที่มีการติดเชื้อเฉพาะที่อยูกอน เชน ผูป่วยที่มีโรคติดเชื้อในทางเดินอาหารและผูป่วยที่มีอาการลำไสทะลุ ทำใหเชื้อประจำถิ่นรวมถึง E. coli สามารถเขาสูชองทองและกระแสโลหิตไดตอไป ในรายที่มีอาการรุนแรงจะทำใหความดันโลหิตลดต่ำจนเกิดภาวะช็อก(septic shock) และเสียชีวิตไดอยางรวดเร็วสิ่งสงตรวจสำหรับการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ E. coli ขึ้นอยูกับตำแหนงที่ติดเชื้อได แกปสสาวะจากผูป่วยโรคติดเชื้อในทางเดินปสสาวะ น้ำไขสันหลังและตัวอยางเลือดจากผูป่วยโรคเยื่อหุมสมองอักเสบ อุจจาระจากผูป่วยโรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร เสมหะจากผูป่วยที่ติดเชื้อในทางเดินหายใจ และเลือดจากผูที่มีการติดเชื้อในกระแสโลหิต เปนตน

E. coli สามารถเจริญไดดีบนอาหารที่ใชสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย หรืออาจเลือกใชอาหารประเภท selective medium เชน MacConkey agar เพราะมีสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่อาจปนเปอน อีกทั้งยังจัดเปน differential medium เนื่องจาก E. coli สามารถสลายน้ำตาล lactose ในอาหารทำใหใหโคโลนีเปลี่ยนเปนสีชมพูเขม หรือใช eosin methylene blue agar(EMB) โดยโคโลนีของ E. coli เมื่อเจริญบน EMB จะมีสีเขมเกือบดำ ผิวของโคโลนีมีลักษณะเหลือบสีเขียวคลายสีของโลหะเรียกวา metallic sheen สามารถใชแยกออกจากแบคทีเรียแกรมลบรูปแทงชนิดอื่นได การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีที่นิยมใชในการบงชี้E. coli ไดแกการทดสอบ IMViC ซึ่งใหผลบวกสำหรับการทดสอบ indole และ methyl red ใหผลลบสำหรับการทดสอบ Vogesproskauer และ citrate utilization E. coli สามารถสรางกรดและกาซจากการสลายน้ำตาล glucose และสามารถยอยสลายน้ำตาลไดอีกหลายชนิดเชน lactose, mannitol, sorbitol, arabinose และrhamnose เปนตนการทดสอบทางฐ้าเหลืองวิทยา นิยมใชในการวินิจฉัย E. coli O157:H7 โดยทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจำเพาะตอ O antigen (ตรวจหา serogroup) และ H antigen (ตรวจหา serotype) ซึ่งนิยมใชวิธี latex agglutinationการพัฒนาเทคนิคดานอณูชีววิทยาเพื่อการจำแนกเชื้อ enterohemorrhagic E. coli O157:H7เชน เทคนิค PCR ในการตรวจหายีนที่ควบคุมการสราง shiga toxin, enterotoxin และยีนอื่นที่ควบคุมการสรางปจจัยกอโรคเปนตนการใหยาปฏิชีวนะอาจสามารถชวยลดความรุนแรงและระยะเวลาดำเนินโรคได E. coli มีความไวต่อยาหลายกลุม เชน กลุม β-lactams, fluoroquinolones, tetracyclines, aminoglycosidesและ sulfonamides อยางไรก็ตาม ปจจุบัน E. coli มีอัตราการดื้อตอยาสูงขึ้นอยางรวดเร็วโดยเฉพาะเชื้อที่พบในโรงพยาบาล และพบการดื้อตอยาหลายกลุมโดยเฉพาะอยางยิ่งการดื้อตอยาในกลุมextended-spectrum cephalosporins ซึ่งมีแนวโนมเพิ่มสูงขึ้นและกอใหเกิดปญหาในการรักษา โดยเชื้อสามารถสรางเอนไซม extended-spectrum β-lactamase (ESBL) เพื่อทำลายฤทธิ์ยาในกลุม penicillins, cephalosporins และ monobactams

Salmonella spp.

จีนัส Salmonella เปนจีนัสที่อยูในตระกูลเอนเทอโรแบคทีริเอซี(Family Enterobacteriaceae) Salmonella กอใหเกิดโรคในคน และสัตวไดเชน Salmonella typhi กอโรคเฉพาะในคนเทานั้น โรคที่เกิดขึ้นมีEnteric fever (typhoid, paratyphoid) โรคทางเดินอาหารเฉียบพลัน การติดเชื้อในกระแสโลหิต และการติดเชื้ออวัยวะภายในเฉพาะที่แบคทีเรียสกุล Salmonella เปนแบคทีเรียสกุลใหญ สามารถจำแนกเชื้อโดยการใชคุณสมบัติแอนติเจนและแบคเทอริโอฟาจ ไดกวา 1900 ชนิด Kauffman และWhite ไดแบงเชื้อเปน 41 กลุม จาก A-Z และ 51-65 โดย O-Ag และอาศัย H-Ag, Vi แบงไดเปนซีโรไทปตางๆกวา 2200 ชนิด เนื่องจากมีการใหชื่อมากมายนับพันชื่อปจจุบัน Center for Diseases Control (CDC)ไดแบงเปน Salmonella typhi, S.choleraesuis, S.paratyphi A และSalmonella serotype อื่นๆและ CDC ไดปรับปรุงใหรายงานกลุม Salmonella เปน serotype มากกวาบอกชื่อspecies แตจะตองใชantisera เปนจำนวนมากและยุงยาก Clinical lab ตางๆจึงไมอาจแยกแยะ Salmonellaจนถึงspecific serotype จึงมักแบงออกเปน serogroup แตอยางไรก็ตาม ใหแบงเปน S. typhi, S.choleraesuis,S.paratyphi A ไดเพราะมีความสำคัญทางคลีนิค สวน Salmonella อื่นๆใหบอกเปน serogroup; serotypeตัวอยางเชน Salmonella serotype typhimurium, Arisona นั้นเรียกเปน Salmonella serotype 47: r : 3 อยางไรก็ดีมีผูเสนอวาสมควรจัด Salmonella เปน specie เดียวเทานั้น แตเมื่อคำนึงถึงคุณสมบัติทางพันธุกรรม แบง เปน 5 subspeciesแตอยางไรก็ตามจนถึงบัดนี้การใหชื่อและการจัดแบงกลุม Salmonellaก็ยังไมยุติเพื่อหาสิ่งที่เหมาะสม และถูกตองที่สุด เมื่อคำนึงถึงความสัมพันธระหวางเชื้อทางพันธุกรรม และอื่นๆ เชื้อในสกุล Salmonella สวนใหญเคลื่อนที่ไดบางชนิดมีแคปซูล บางชนิดมีชีวิตอยูไดนานในอาหารแหงเชน ในนมผง มะพราวแหงไขแตเชื้อจะถูกทำลายเมื่อตมที่60°C นาน 15 นาที เชื้อSalmonellaเปนแบคทีเรียที่พบอยูทั่วโลก กอใหเกิดโรคในสัตวเลี้ยงลูกดวยนมหลายชนิด นก สัตวเลื้อยคลาน และปนเปอนออกมากับอุจจาระและอาจพบในน้ำ ดิน อาหารสัตวเนื้อสด เปนตน บางซีโรไทปเชน Salmonella Enteritidisเชื้อจะเขาไปในรังไขของเปดและไกและสามารถตรวจแยกเชื้อไดจากไขSalmonella สามารถมีชีวิตอยูในดินที่รมและเปยกชื้นไดนานมากกวา 9 เดือน เชื้อSalmonella choleraesuis ถูกแยกเชื้อไดครั้งแรกจากสุกรโดยSalmon และ Smith (1886) (Quinn et al., 2002)

ลักษณะการเจริญเติบโต และปฏิกิริยาชีวเคมี

เชื้อสกุลนี้เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ เช่น MacConkey, EMB, SSและ DCA agar โคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร ลักษณะกลม ขอบเรียบ เป็นมัน ไม่มีสี (ไม่หมักย่อยน้ำตาลแลคโตส) ไม่ทึบแต่ไม่ โปร่งแสง บางสายพันธุ์มีโคโลนีลักษณะเป็นเมือก คุณสมบัติที่สำคัญในการวินิจฉัยได้แก่ ลักษณะที่ขึ้นบน TSIA หรือ KIA slant เป็นแบบ K/AG+ หรือ K/AG- (S.typhi K/A+) ส่วนใหญ่ให้แก๊สจากการหมัก ย่อยกลูโคส สามารถหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่างๆได้ผลต่างกัน การทดสอบ indole (-), malonate (-),urea (-) และ lysine decarboxytlase (+) เป็นต้น

การทำให้เกิดโรคและพยาธิสภาพ

โดยปกติคนจะไม่มีSalmonellaอยู่ในร่างกายแหล่งที่อยู่ในธรรมชาติของจุลชีพพวกนี้ได้แก่ ผู้ป่วยที่ เป็นโรคหรือคนที่เป็นพาหะของโรค มีหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์ต่างๆ การติดเชื้อเกิดจากการกินอาหารหรือน้ำที่มีเชื้อปะปนเข้าไป คนที่มีการติดเชื้ออาจมีอาการหรือไม่มีอาการของโรคปรากฏ โรคที่เกิดจากSalmonellaแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่

1. โรคไข้เอนเทอริค (Enteric fever) โรคไข้เอนเทอริคเป็นชื่อรวมที่ใช้บอกกลุ่มอาการของโรคโดยไม่บ่งเฉพาะว่าเกิดจากSalmonella serotype ใด ถ้าผู้ป่วยมีการติดเชื้อจากS. typhi เรียกโรคที่เกิดว่า ไข้รากสาดน้อยหรือไข้ไทฟอยด์(typhoid fever) หากการติดเชื้อเกิดจาก S. paratyphi ก็เรียก ไข้รากสาดเทียมหรือไข้พาราไทฟอยด์(paratyphoid fever)อาการของโรคไข้ไทฟอยด์มักรุนแรงกว่าไข้พาราไทฟอยด์การก่อโรคของเชื้อS. typhi ขึ้นอยู่กับการที่เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ในเม็ดเลือดและเพิ่มจำนวนมากขึ้นในเซลล์ทำให้เซลล์ตายปล่อยเชื้อออกมา เอนโดทอกซินของแบคทีเรียทำให้ร่างกายมีอาการไม่สบายต่างๆ แคปซูลของแบคทีเรียจะป้องกันตัวเชื้อจากการเก็บกินของเม็ดเลือดขาวระยะฟักตัวของโรค 7-20 วัน ผู้ป่วยมีอาการไข้ไข้จะสูงอยู่หลายวัน ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตามลำตัวเบื่ออาหาร มีอาการท้องอืด อุจจาระผูก มีม้ามโต ต่อมาอาจมีอาการอุจจาระร่วง ระยะของโรคไข้เอนเทอริคนาน 3-4 สัปดาห์ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพที่ถูกต้อง อาการไข้จะลดลงสู่ระดับปกติใน 3-5 วันประมาณ 2-5% ของผู้ป่วยที่หายจากโรคจะเป็นพาหะนำโรคนานหลายเดือน เป็นปีหรืออาจนานตลอดชีพ โดยเชื้อจะฝังตัวเจริญอยู่ในถุงน้ำดีและถูกขับออกมาปนกับอุจจาระเป็นครั้งคราว

2. โลหิตเป็นพิษ เช่น เกิดจากS. choleraesuis ผู้ป่วยมีอาการของโลหิตเป็นพิษ พบเชื้อในกระแสเลือดแต่ไม่มีอาการเกี่ยวกับลำไส้เชื้อทำให้เกิดหนองฝีที่อวัยวะต่างๆ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ กระดูกอักเสบ ปอดอักเสบและเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ เป็นต้น

3. โรคอุจจาระรวง มักเกิดจากเชื้อที่เปนปรสิตของสัตวพวกวัว ควาย ไก เปนตน ตัวอยางเชน S. typhimurium เชื้ออาจปนเปอนมากับเนื้อสัตวที่นำมาประกอบอาหารแลวปรุงไมสุกดีไมเพียงพอที่จะทำใหเชื้อตายหมด หรือแมลงวันอาจเปนพาหะนำเชื้อโรคมาแปดเปอนอาหารที่ปรุงเสร็จเมื่อตั้งอาหารไวในที่อุนๆ เชื้อก็จะเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนสามารถทำใหเกิดอาการของโรคในคนที่กินอาหารเขาไป ระยะฟกตัวของโรคนาน 8ถึง 48 ชั่วโมง ผูปวยมีอาการปวดทองอาเจียน อุจจาระรวงอยูนาน 2-5 วัน ความรุนแรงของโรคขึ้นอยูกับจำนวนเชื้อที่เขาสูรางกายและความตานทานของผูปวย ระบาดวิทยา การปองกัน และควบคุมไขไทฟอยดพบเปนกันทั่วโลก พบระบาดบอยในทองถิ่นที่มีระบบสุขาภิบาลไมดีสวนไขพาราไทฟอยดพบเปนกันประปรายไมมีการระบาดใหญ แหลงของโรคไดแก ผูปวยและพาหะของโรค เชื้อถูกขับออกจากรางกายทางอุจจาระซึ่งอาจแปดเปอน อาหาร น้ำ และนม ไดแมลงวันอาจเปนพาหะนำโรค ในประเทศไทย สถิติผูปวย เปนโรคนี้มีแนวโนมสูงขึ้นทุกปพบเปนกันมากในชวงเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม ผูปวยมักไดแก เด็กอายุ5ถึง 14 ปการควบคุมโรคที่ไดผลมีหลักการเชนเดียวกันกับโรคของระบบทางเดินอาหารที่เกิดจากเชื้อชนิดอื่นๆการปองกันโรคโดยการฉีดวัคซีน TAB (เตรียมจากเชื้อS. typhi, S.paratyphi A และ B) ใหผลในการปองกันโรคนี้ไดนาน 6 เดือน ถึง 1 ปการวินิจฉัยโรคอุจจาระรวงทางหองปฏิบัติการการตรวจหาเชื้อที่เปนสาเหตุของโรคอุจจาระรวงในผูปวยจะตองเลือกเก็บอุจจาระสวนเหลวโดยเฉพาะสวนที่มีมูกเลือดปน นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (ควรสงตรวจติดตอกันทุกวันเปนเวลาอยางนอย3 วัน) โดยทั่วไป นิยมเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่แสดงความแตกตางของเชื้อ1จาน (MacConkey หรือ EMBagar)และอาหารที่เลือกเฉพาะเชื้อบางชนิดอีก1-2จาน (DCA, XLD หรือSS และ TCBS agar) บมจานอาหารเลี้ยงเชื้อไวที่37°C นาน 18-24 ชั่วโมง ตรวจดูลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญ เลือกโคโลนีที่สงสัยมาแยกเชื้อใหบริสุทธิ์จำแนกชนิดของเชื้อโดยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

เชื้อซัลโมเนลลากับโรคอาหารเปนพิษ

ปจจุบันการจัดแบงเชื้อซัลโมเนลลามักจะระบุซีโรวารที่เฉพาะเจาะจงโดยอาศัยหลักการตกตะกอน(agglutination) ของโปรตีนจากแอนติเจน (antigen) บนเซลลของเชื้อซัลโมเนลลาดวยแอนติบอดี(antibodies)ที่มีความสัมพันธกัน โดยแอนติเจนบนเซลลของเชื้อซัลโมเนลลาจำแนกออกเปน 3 ประเภท คือ

1. แอนติเจนที่ผิวของเชื้อซัลโมเนลลา เรียกวาSomatic antigen (O antigen) ซึ่งเปนโปรตีนที่ทนความรอน (Heat stable)

2. แอนติเจนที่แสหรือหนวดของเชื้อซัลโมเนลลา เรียกวาFlagella antigen (H antigen) ซึ่งเปนโปรตีนที่ไมทนความรอน (Heat labile)องศาเซลเซียส ไมสามารถทำลายเชื้อซัลโมเนลลาไดเพียงแตยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อซัลโมเนลลาเทานั้น (สุมณฑาวัฒนสินธุ, 2006) Merial Limited is a Merck and sanofi-aventis company

3. แอนติเจนที่เปลือกหุ้มเซลหรือแคปซูล เรียกวา Capsular antigen (Vi antigen) ซึ่งมีอยู่ในเชื้อซัลโมเนลลาบางซีโรวารเทานั้น ไดแกSalmonella Typhi, Salmonella Paratyphiและ Salmonella Dubin ซึ่งทำใหเชื้อซัลโมเนลลาเหลานี้กอโรคที่รุนแรงการจัดแบงเชื้อซัลโมเนลลาตามหลักระบาดวิทยา (Epidemiology) จำแนกออกเปน 3 กลุม คือ

- กลุมเชื้อซัลโมเนลลาที่กอใหเกิดโรค Enteric fever อาศัยคนเปนโฮสต(host) เพียงอยางเดียวจึงกอโรคเฉพาะในคนเทานั้น ประกอบดวยSalmonella Thyphi ทำใหเกิดโรคไทฟอยด(Typhoid fever) SalmonellaParatyphi ทำใหเกิดโรคไขรากสาดนอย(Paratyphoid fever)

- กลุมเชื้อซัลโมเนลลาที่ปรับตัวเขากับชนิดของโฮสต(Host-adapted serovars) พบจำเพาะในสัตวแตละชนิดเชน SalmonellaPollorum และSalmonella Gallinarum พบในไกSalmonella Choleraesuis พบในสุกรSalmonella Dubin พบในวัวSalmonella Abortus-equi พบในมาและSalmonella Abortus-ovis พบในแกะ

- กลุมเชื้อซัลโมเนลลาที่มิไดจำกัดตอชนิดของโฮสต(Unadapted serovars) กอใหเกิดโรคIntestinalsalmonellosis หรือ Gastroenteritis causing Salmonella spp. ไดแกเชื้อซัลโมเนลลาที่อยูนอกเหนือจาก2 กลุมที่กลาวมาขางตน เชน Salmonella Typhimumurium และ SalmonellaEnteritidis

3.การเรียกชื่อเชื้อ

ซัลโมเนลลาปจจุบันนิยมใชระบบการเรียกชื่อที่กำหนดใหใชสปชีเดิมตอทายซีโรวารดังนั้น การเรียกชื่อตามการจัดแบงเชื้อซัลโมเนลลาของ WHO เชื้อซัลโมเนลลาก็จะมีชื่อยาวเชน Salmonella typhimurium จะมีชื่อเรียกใหมวาSalmonella enterica subspecies (or subsp.) enteritica serovar (or ser.) typhimurium จึงไดมีการตั้งระบบการเรียกชื่อยอขึ้น คือ ชื่อgenus จะเปนตัวเอน (italic) และชื่อserovars จะไมเอนและตัวอักษรแรกเปนตัวพิมพใหญ เชน Salmonella Typhimurium หรือSalmonella Enteritidis เปนตน

4. แหลงที่พบ

เชื้อซัลโมเนลลามีหลากหลายซีโรไทปและพบไดเกือบทุกแหงทั่วโลกแหลงที่อยูอาศัยลำดับแรกของเชื้อซัลโมเนลลา คือลำไสของมนุษยและสัตวตางๆ ไดแกสัตวปก สุกรโค สัตวเลื้อยคลาน เชน เตา หอยทากสัตวเลี้ยง เชน สุนัขแมวรวมทั้งแมลง เชน แมลงสาบ นอกจากนี้ยังพบเชื้อซัลโมเนลลาอยูตามรางกายของมนุษยและสัตวดวยเชื้อซัลโมเนลลาสามารถอยูในสภาพแวดลอมที่มีสารอินทรียที่เหมาะสมไดนานเปนสัปดาหเดือน หรือป(Schwartz, 1999)และสามารถปรับตัวเขากับสภาพแวดลอมที่ไมเหมาะสมไดดีเชนสภาพแวดลอมที่เย็นและแหงSalmonella Choleraesuis สามารถมีชีวิตอยูในมูลสุกรไดอยางนอย13 เดือน จึงจำเปนอยางยิ่งที่จะตองทำความสะอาดใหมูลสุกรหมดไปจากคอกหรือโรงเรือนที่ใชเลี้ยงสุกร(Gray andFedorka-Cray, 1995)

5. การติดตอ

การติดตอเริ่มจากเชื้อซัลโมเนลลาในลำไสของมนุษยและสัตวที่ปวยหรือเปนพาหะถูกขับออกมากับอุจจาระหรือมูลสัตวจากนั้นมนุษยและสัตวที่ปกติจะติดเชื้อดวยการสัมผัสหรือกินอุจจาระ/มูลสัตวที่มีเชื้อซัลโมเนลลาปะปนอยูหรือสัมผัสกับอุปกรณเลี้ยงสัตวที่ปนเปอนเชื้อซัลโมเนลลาจากนั้นแพรกระจายสูวงจรหวงโซอาหารแลวกลับสูลำไสของมนุษยและสัตวอีกวนเวียนเปนวัฏจักร นอกจากนี้เชื้อซัลโมเนลลายังสามารถติดตอดวยการสัมผัสกันโดยตรงระหวางสัตวและติดตอทางอากาศไดอีกดวย (Clemmer et al., 1960, Darlowet al., 1961)การติดเชื้อซัลโมเนลลาทางอากาศจะเริ่มตนที่ทางเดินหายใจสวนบน จากนั้นปอดกับตอมทอนซิลจะเปนแหลงแพรกระจายเชื้อไปยังลำไสและตอมน้ำเหลืองบริเวณลำไสภายใน 2-4 ชั่วโมงหลังจากการไดรับเชื้อ(Gray and Fedorka-Cray, 1995)

6. การกอโรคและอาการในมนุษย

โดยทั่วไปอาการของโรคอาหารเปนพิษที่เกิดจากเชื้อซัลโมเนลลาจะเกิดขึ้นหลังจากบริโภคอาหารหรือน้ำที่มีการปนเปอนเชื้อซัลโมเนลลาเขาไปประมาณ 12-24 ชั่วโมง เชื้อซัลโมเนลลาที่เขาสูรางกายจะจับเกาะเซลลเยื่อบุผนังลำไสและรุกเขาเซลลเพื่อเริ่มตนเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอยูภายในกระเปาะที่เซลลผนังลำไสซึ่งกระบวนการนี้จะชวยใหเชื้อซัลโมเนลลารอดจากการPhagocytosis ผูปวยจะมีอาการคลื่นไสอาเจียน ปวดทองและถายเหลว หลังจากที่หายปวยแลวประมาณรอยละ5 ของผูที่หายปวยจะยังคงมีเชื้อซัลโมเนลลาอยูในรางกายและเปนพาหะตอไป ความรุนแรงของอาการปวยแตกตางไปตามชนิดและปริมาณเชื้อซัลโมเนลลาที่บริโภคและความตานทานของผูบริโภค สำหรับผูปวยในกลุมที่เรียกวา YOPI ไดแกผูปวยที่เปนเด็กเล็ก(Young) ผูปวยที่สูงอายุ(Old)ผูปวยที่ตั้งครรภ(Pregnant) และผูปวยที่มีความบกพรองทางภูมิคุมกัน (Immunedeficient) จะมีอาการปวยรุนแรงจนอาจเสียชีวิตได(ศุภชัย, 2006)

7. ปจจัยที่มีผลตอการเจริญเติบโตและการอยูรอด

- อุณหภูมิ(Temperature) เชื้อซัลโมเนลลาเปนกลุมแบคทีเรีย mesophiles ที่เจริญเติบโตไดดีที่อุณหภูมิรางกายมนุษยหรือสัตวโดยอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตอยู ที่37 องศาเซลเซียส แตเชื้อสามารถเจริญเติบโตไดในชวงอุณหภูมิระหวาง5-45 องศาเซลเซียส และเชื้อจะหยุดการเจริญเติบโตในชวงอุณหภูมิระหวาง-2 ถึง -5 องศาเซลเซียส เชื้อจะเริ่มตายเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเพราะเซลลไมสามารถรักษาสภาวะสมดุลที่เปนสภาวะปกติไวไดเนื่องจากเกิดความเสียหายของไขมันของเยื่อหุมเซลและโปรตีนโดยเฉพาะเอนไซมของเซลลทำใหเยื่อหุมเซลลรั่วและการสังเคราะหโปรตีนตองหยุดชะงัก

- ความเปนกรดดาง (pH) เชื้อซัลโมเนลลาเจริญเติบโตไดในชวง pH เปนกลาง คือ ระหวาง 6.6-8.2แต pH ที่เชื้อเจริญเติบโตไดดีคือ pH 6.5-7.5 เชื้อไมสามารถเจริญเติบโตไดที่ คา pH มากกวา 9 สวนคา pHต่ำสุดที่เชื้อจะเจริญเติบโตไดขึ้นอยูกับชนิดของกรดที่ใชปรับความเปนกรดดาง เชน ถาใชกรดเกลือและกรดซิตริกเปนตัวปรับความเปนกรดดาง คา pH ต่ำสุดที่เชื้อจะเจริญเติบโตไดอยูที่ 4.05 แตถาใชกรดน้ำสมและกรดแลกติกเปนตัวปรับความเปนกรดดาง คา pH ค่าสูงสุดที่เชื้อจะเจริญเติบโตไดอยูที่5.5 ถาสภาวะ pH ไมเหมาะสมเชน pH ภายนอกเซลลมากกวาชวง pH ที่เชื้อจะเจริญเติบโตได ก็จะเกิดการเหนี่ยวนำใหเชื้อปรับตัวใหทนตอกรดในสิ่งแวดลอม จึงเกิดปญหาโรคอาหารเปนพิษจากเชื้อซัลโมเนลลาในอาหารที่เปนกรดขึ้นได

- (Water activity; aw) มีออกซิเจนก็ไดในสภาวะที่มีออกซิเจนเชื้อจะใชเอนไซมSuperoxide dismutase และ Catalase เปลี่ยนออกซิเจนที่เปนพิษ คือSuperoxide radical (O) ปริมาณน้ำในอาหารที่เชื้อซัลโมเนลลานำไปใชในการเจริญเติบโตอยูที่ประมาณ 0.93-0.95 เชื้อจะไมเจริญเติบโตในอาหารที่มีเกลือแกงเขมขนรอยละ 9 และในสภาวะที่pH ลดลงจะทำใหเกลือไนไตรทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไดมากขึ้น7.4 อากาศหรือออกซิเจน (Oxygen) เชื้อซัลโมเนลลาสามารถเจริญเติบโตไดในที่มีหรือไมเปน Hydrogen peroxide (H_2O_2)เปนออกซิเจน และเปนน้ำตามลำดับ นอกจากนี้เชื้อยังอาศัยออกซิเจนเปนตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดทาย(Final electron acceptor) ในกระบวนการถายอิเล็กตรอนเพื่อสรางพลังงาน (ATP)แตในสภาวะที่ไมมีออกซิเจน เชื้อก็สามารถสรางพลังงานโดยอาศัยการหมักทำใหเชื้อในเนื้อสัตวยังสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอยางมากแม วาจะอยูในสภาวะสุญญากาศ(Vacuum packing) หรือในภาวะปรับบรรยากาศ(Modified atmosphere) ที่มีคารบอนไดออกไซดหรือไนโตรเจน ในสัดสวนเทาใดก็ตาม หากนำไปเก็บรักษาไวที่อุณหภูมิที่เหมาะสมใหเชื้อเจริญไดดีเชน การเก็บรักษาไวที่อุณหภูมิ10 องศาเซลเซียส

- แนวทางการควบคุมและปองกันโรค ใหเนนการปรุงอาหารใหสุกอยางทั่วถึงและเพียงพอ ระวังการปนเป อนขามจากอาหารดิบสู อาหารสุกมีการจัดการสุขาภิบาลและการปฏิบัติที่ถูกสุขลักษณะรวมกับการใชระบบ HACCPควบคุมการปนเปอนเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อสุกรและผลิตภัณฑอาหารที่ปลอดภัยตอการบริโภคจะตองสะอาดและปราศจากสิ่งปนเปอนที่เปนอันตรายตอมนุษยหนึ่งในมาตรฐานความปลอดภัยอาหารที่สำคัญจึงประกอบดวยการปลอดจากเชื้อแบคทีเรียที่กอใหเกิดโรคอาหารเป นพิษ เชื้อแบคทีเรียที่ก อให เกิดโรคอาหารเป นพิษมีอยู ด วยกันหลายชนิดเช น Staphylococcus aureus,Escherichia coliแตเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง คือ Salmonella spp.โรคอาหารเปนพิษที่เกิดจากเชื้อซัลโมเนลลาเปนปญหาสำคัญทางสาธารณสุขในมนุษยที่พบไดเกือบทุกแหงทั่วโลกและมีแนวโนมที่จะมีอุบัติการณเพิ่มมากขึ้น จากการศึกษาทางระบาดวิทยาในประเทศเนเธอรแลนด พบวา มีอุบัติการณเฉลี่ยของโรคอาหารเปนพิษที่เกิดจากเชื้อซัลโมเนลลา450 รายตอประชากรแสนคน และเสียชีวิต 0.4 รายตอประชากรแสนคน โดยรอยละ15 ของอัตราอุบัติการณมีสาเหตุจากการบริโภคเนื้อสุกร(Berends et al., 1998) ในประเทศสหรัฐอเมริกาสาเหตุของโรคอาหารเปนพิษมาจากเชื้อซัลโมเนลลา รอยละ6-9 ซึ่งสัมพันธกับการบริโภคเนื้อและผลิตภัณฑจากสุกร(Frenzen et al.,1999) ในชวงระหวาง พ.ศ. 2506 ถึง พ.ศ. 2508 ประเทศสหรัฐอเมริกามีการระบาดของโรคอาหารเปนพิษที่เกิดจากเชื้อซัลโมเนลลา จำนวน 61 ครั้งโดยพบวารอยละ8 มีสาเหตุจากการบริโภคเนื้อโคและเนื้อสุกร(Steele and Galton, 1967)สำหรับประเทศไทยจากสรุปรายงานการเฝาระวังโรค2549 พบวา มีผูปวยดวยโรคอาหารเปนพิษที่เกิดจากเชื้อซัลโมเนลลาในระหวาง พ.ศ. 2539 ถึง พ.ศ. 2548 จำนวน 1,311 ราย1,532 ราย1,736 ราย48 ราย125 ราย323 ราย13 ราย350 ราย321 รายและ219 ราย ตามลำดับ โรคอาหารเปนพิษที่เกิดขึ้นในแตละปจะมีเชื้อซัลโมเนลลาเปนสาเหตุที่ทำใหผูบริโภคเกิดการเจ็บปวยและ/หรือเสียชีวิต รวมอยูดวยเสมอ(สำนักระบาดวิทยา, 2006)

อาการของโรคอาหารเปนพิษจากเชื้อซัลโมเนลลาแบงออกไดเปน 2 แบบ คือ

1.อาการแบบ Intestinal salmonellosis หรือ Gastroenteritis causing Salmonella spp.มีระยะฟกตัวของโรคประมาณ 4-48 ชั่วโมงผูปวยจะมีอาการไขสูง38-39 องศาเซลเซียส หนาวสั่น คลื่นไสอาเจียน เจ็บปวดบริเวณทอง ทองเสียไมมีเลือดปน ถาเชื้อซัลโมเนลลาผานเขาสูกระแสเลือดและแพร กระจายไปตามอวัยวะต างๆของมนุษย หรือสัตว ที่ด อยภูมิคุ มกัน (Immunocompromised host) จะทำใหเกิดการอักเสบขึ้นที่สมอง หัวใจ ปอด ตับ มาม ไต กระดูกและทางเดินปสสาวะ พบผูปวยประมาณรอยละ2 ที่เสียชีวิตจากอาการขาดน้ำ(dehydrate) ติดเชื้อในกระแสเลือดไตวายและชอค

2. อาการแบบ Enteric fever (Typhoid fever และParatyphoid fever) มีระยะฟกตัวของโรคประมาณ3-35 วัน แตโดยทั่วไปประมาณ 7-14 วัน ที่ตองใชระยะฟกตัวนานกอนจะกอโรคเนื่องจากเชื้อซัลโมเนลลาใชเวลานานกวาจะไปเพิ่มจำนวนที่ตับ ระยะเวลาปวยคอนขางนานหลายสัปดาหผูปวยจะมีอาการไขสูง39-40องศาเซลเซียส และนานตอเนื่อง หนาวสั่น ปวดทอง ปวดศีรษะคลื่นไสอาเจียน เบื่ออาหารออนเพลีย ทองเสียอาจมีเลือดปนมูกและมีกลิ่นเหม็นมากในผูปวยที่ไดรับการรักษาจนถึงสัปดาหที่2-3 จะเกิดจุดสีแดงขนาดประมาณ 2-5 มิลลิเมตร ตามผิวหนัง เนื่องจากเชื้อไดแพรกระจายไปอยูตามเสนเลือดฝอยจำนวนมากและอาจจะมีอาการสมองเลอะเลือน ปวดคออยางรุนแรง ชีพจรเตนเร็ว

1.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วัชรี (2543) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย 12 ชนิด ที่สกัดด้วย95% ethanol และ ไดคลอโรมีเทน ต่อการเจริญของ Staphylococcus aureus, Streptococcuspneumoniae, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa และ Salmonella enteritidis ที่แยกได้จากผู้ป่วยเอดส์ โดยวิธี agar disc diffusion พบว่าสมุนไพรทั้ง 12 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนพืชสมุนไพร 9 ชนิด คือ มะระขี้นก กระชาย กระเทียม ฟ้าทะลายโจร กล้วยน้ำว้าทองพันชั่ง บัวบก บอระเพ็ดและชุมเห็ดเทศ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และพบว่าชุมเห็ดเทศให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของ S. aureus sp386, S. aureus ATCC 25923 และSt. pneumoniae โดยมีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) เท่ากับ 0.03, 0.06และ 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับจิราภรณ์ (2545) ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากต้นแมงลักคาโดยวิธี well diffusion พบว่าสามารถต้านการเจริญของ S. aureus ATCC 29213 และสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 8.82-17.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังสามารถต้านเชื้อ S. pyogenes ที่แยกได้จากหนองของผู้ป่วยได้ด้วย โดยมีค่า MIC เท่ากับ 4.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ต้านการเจริญของ E. coli เล็กน้อย

นภาพรและคณะ (2546) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชท้องถิ่น2 ชนิด คือ สาบเสือ (Chromolaena odorata Linn.) และเถาคันขาว (Columella trifolia Merr.) โดยวิธี well diffusion พบว่าสารสกัดหยาบของสาบเสือมีฤทธิ์ต้านการเจริญของ S. aureus ได้ดีกว่า E. coli ส่วนสารสกัดหยาบของเถาคันขาวมีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดเท่ากัน โดยฤทธิ์ของสารสกัดหยาบของสาบเสือต่อ S. aureus มีค่าเทียบเท่ายาปฏิชีวนะ gentamicin ที่ความเข้มข้น2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าไม่มีสารสกัดชนิดใดที่มีฤทธิ์ต้าน E. coli ได้เทียบเท่ายาปฏิชีวนะ

gentamicinTadeg et al. (2005) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นในประเทศเอธิโอเปีย โดยวิธี well diffusion พบว่าใบของต้น Calpurnia aurea และ Olinia rochetiana ที่สกัดด้วย 80% methanol ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถต้านการเจริญของ S. aureus,E. coli และ Ps. aeruginosa ได้ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้งอยู่ในช่วง 21-25,19-21 และ 18-22 มิลลิเมตร ตามลำดับ

Chomnawang et al. (2005) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ สาบเสือ เสลดพังพอน และมังคุด โดยวิธี agar disc diffusion และ broth dilution พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของ Propionibacterium acnes และ Staphylococcusepidermidis ซึ่งเป็นสาเหตุของสิวได้ โดยสารสกัดจากเปลือกมังคุดให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ได้ดีที่สุด และมีค่า MIC เท่ากับ 0.039 และ 0.156 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

Perva-Uzunalic et al. (2006) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการสกัดสารสำคัญจากชาเขียว (Camellia sinensis) สายพันธุ์ Fanning Belas (ประเทศจีน) โดยใช้ตัวทำละลายบริสุทธิ์ชนิดแตกต่างกัน(แอซีโทน เอทานอล เมทานอล แอซิโทไนไทรล์ และน้ำ) และอุณหภูมิที่แตกต่างกน (60 80 95 และ 100 องศาเซลเซียส) และเวลาต่างกัน (5-240 นาที) สารสกัดจากชา ถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของ คาเทชิน ชนิดหลัก (EC, EGC, ECG, EGCG) คาเฟอีน พบว่าวัตถุดิบเริ่มต้นมีปริมาณค่าเทชิน ชนิดหลัก 191 กรัมต่อกิโลกรัม คาเฟอีน 36 กรัมต่อกิโลกรัม และพบว่ากระบวนสกัดชาเขียวมีปริมาณของ คาเทชินชนิดหลักมีค่าอยู่ช่วง 280-580 กรัมต่อกิโลกรัมสารสกัดแห้ง ปริมาณคาเฟอีนในชาเขียวสกัดมีค่าอยู่ในช่วง 75 กรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งกระบวนการสกัดที่สามารถสกัดคาเทชิน ให้มีประสิทธิภาพสูงสุดคือการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 80องศาเซลเซียส เป็ นเวลา 20 นาที(ร้อยละ 97) และอุณหภูมิ 95องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที (ร้อยละ90) โดยได้พบการสูญเสีย คาเทชิน เมื่อใช้อุณหภูมิสูงและเวลานานเกินไปในการสกัด

Magassouba et al. (2007) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชสมุนไพรท้องถิ่นในเขตแอฟริกาตะวันตก ด้วยวิธี broth dilution พบว่า Chlorophora regia, Harrisoniaabyssinca และ Lantana camara ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย methanol สามารถยับยั้งการเจริญของS. aureus ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.625, 0.125 และ 0.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับจะเห็นได้ว่าสมุนไพรมากมายหลายชนิดมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ดังนั้น การคัดเลือกสมุนไพรในท้องถิ่นมาศึกษาฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจึงเป็นแนวทางในการพัฒนาสมุนไพรท้องถิ่นเป็นยาต้านแบคทีเรียขึ้นมาทดแทนยาปฏิชีวนะหรือยาสังเคราะห์ ที่มีราคาสูงและมีปัญหาในการรักษาโรคติดเชื้อสาเหตุจากแบคทีเรียดื้อยา

Stenson (2000) และ Romanchick-Cerpovicz et al (2002) ได้ศึกษาเกี่ยวกับในประเทศสหรัฐอเมริกามีการนำพอลิแซ็กคาไรด์จากกระเจี๊ยบเขียว มาใช้ทดแทนเนยเหลว และไข่ทั้งหมดในสูตรการทำเค้กบราวนี่ ทำให้บราวนี่สูตรดังกล่าวมีปริมาณไขมันน้อยกว่าสูตรปกติ โดยบราวนี่ สูตรปกติมีปริมาณไขมัน 6.6 กรัม ส่วนบราวนี่ที่มีการทดแทนเนยเหลวและไข่ด้วยพอลิแซ็กคาไรด์จากกระเจี๊ยบเขียวมีปริมาณไขมัน 0.49 กรัม และมีคะแนนความชอบจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ นอกจากนี้ยังมีการนำพอลิแซ็กคาไรด์จากกระเจี๊ยบเขียวมาใช้ในรูปของสารทดแทนไขมันในการทำช็อกโกแลตบาร์คุกกี้ ทั้งยังสามารถช่วยรักษาความชุ่มชื้นของคุกกี้ในระหว่างการเก็บรักษาได้มากกว่าคุกกี้สูตรปกติ โดยมีคะแนนความชอบโดยรวมไม่แตกต่างกับคุกกี้สูตรปกติและคุกกี้ที่มีการเติมสารทดแทนไขมันชนิดอื่น

JOELLE E ROMANCHIK-CERPOVICZ et al (2002) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการใช้มิวซิเลจจากกระเจี๊ยบเขียวมาทดแทนเนยเทียมและไข่แดงในคุกกี้ช็อคโกแลตบาร์ ทำให้คุกกี้ช็อคโกแลตบาร์มีไขมันน้อยกว่าสูตรปกติ โดยสามารถลดไขมันได้ถึงร้อยละ 25 – 50 และมีคะแนนความชอบโดยรวมไม่แตกต่างจากคุกกี้สูตรปกติ และเมื่อใช้มิวซิเลจจากกระเจี๊ยบเขียว ปริมาณน้ำที่มีในอาหารและความชื้นจะเพิ่มมากขึ้น

Joelle E. Romanchik-Cerpovicz et al (2006) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการใช้มิวซิเลจจากกระเจี๊ยบเขียวทดแทนไขมันนม ในผลิตภัณฑ์ช็อคโกแลตนมแช่แข็งและไอศกรีมช็อคโกแลตโดยทดสอบความชอบในด้าน สี กลิ่น เนื้อสัมผัส กลิ่นรสและความชอบโดยรวม พบว่า มีความคล้ายคลึงกัน โดยสามารถใช้มิวซิเลจจากกระเจี๊ยบเขียวทดแทนไขมันนมได้ถึงร้อยละ 75

Ndjouenkeu et al (1997) ได้ทำการศึกษาสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์จากกระเจี๊ยบเขียวแบบผง (okra flour) และศึกษาผลของการเติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากกระเจี๊ยบเขียว ที่มีต่อความคงตัวของอิมัลชันของน้ำมันข้าวโพดซึ่งเป็นอิมัลชันชนิดไขมันในน้ำ จากการศึกษาพบว่า okra flour มีค่า Water Absorption Capacity (WAC), Oil Absorption Capacity (OAC) และ WaterOil Absorption Index (WOAI) อยู่ในระดับต่ำ เมื่อเทียบกับพอลิแซ็กคาไรด์จากพืชชนิดอื่น โดยการที่พอลิแซ็กคาไรด์จะช่วยให้อิมัลชันมีความคงตัวได้นั้น จะต้องมีค่า WAC และ OAC สูง นอกจากนั้นอิมัลชันที่มีการเติมพอลิแซ็กคาไรด์จากกระเจี๊ยบเขียวยังมีค่า Emulsifying Activity (EA) และ Emulsion Stability (ES) ต่ำ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า พอลิแซ็กคาไรด์จากกระเจี๊ยบเขียวมีสมบัติในการเป็นสารให้ความหนืด (thickener) ขณะที่มีสมบัติในการให้ ความคงตัวแก่อิมัลชัน (emulsion stabilizer) ต่ำ (วชิราภรณ์, 2549)

สุธีรา (2553) ได้ศึกษาการใช้มิวซิเลจจากเมล็ดแมงลักแบบเปียกและแบบผงแห้งเพื่อเป็นสารทดแทนไขมันในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลา พบว่า มิวซิเลจจากเมล็ดแมงลักแบบเปียก มีความชอบรวมสูงสุด มีกรรมวิธีการผลิต มีการใช้เวลาในการผลิตน้อยกว่าและต้นทุนการผลิตต่ำกว่า โดยใช้มิวซิเลจเมล็ดแมงลักต่อไขมัน 5 ระดับ คือ 0:20 (สูตรควบคุม), 5:15, 10:10, 15:5 และ 20:0 โดยเมื่อใช้มิวซิเลจเมล็ดแมงลักในปริมาณที่สูงขึ้น ทำให้ค่าความสว่างลดลง และค่าความสามารถในการอุ้มน้ำเพิ่มขึ้นแต่ความคงตัวของอิมัลชันต่ำลง ทำให้ความแน่นเนื้อของไส้กรอกปลาต่ำลงด้วย แต่ในด้านค่าพลังงาน พบว่า ยิ่งใช้มิวซิเลจเมล็ดแมงลักในปริมาณสูงขึ้นทำให้ค่าพลังงานต่ำลงและต้นทุนในการผลิตลดลง แต่คะแนนการยอมรับในคุณลักษณะด้านสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัสและความชอบรวมไม่แตกต่างกัน ดังนั้น ไส้กรอกปลาสามารถใช้มิวซิเลจทดแทนไขมันได้ในอัตราส่วน 20:0

จารุวัฒน์และพิพัฒน์ (2550) ได้ศึกษาการใช้โปรตีนเกษตรและเจลลูกสำรองทดแทนเนื้อสัตว์และไขมันในไส้กรอกแฟรงค์เฟอร์เตอร์ โดยทดแทนเนื้อสัตว์ด้วยโปรตีนเกษตรในอัตราส่วนร้อยละ 20, 30, 40 และทดแทนไขมันด้วยเจลลูกสำรองในอัตราส่วนร้อยละ 25, 50, 75 ได้สูตรทั้งหมด 13 สูตร พบว่า ลักษณะด้านความชุ่มน้ำมีผลต่อ สูตรที่ 1, 3, 4 และ 13 จึงมีคะแนนความชอบสูงใกล้เคียงกัน และเมื่อพิจารณาในด้านต้นทุนวัตถุดิบ พบว่า สูตรที่ 1 ที่มีการเติมโปรตีนเกษตรในอัตราส่วนร้อยละ 40 และเจลลูกสำรองในอัตราส่วนร้อยละ 75 มีคะแนน อยู่ในระดับที่ผู้ทดสอบยอมรับได้ และสามารถลดต้นทุนการผลิตได้มากที่สุด จากนั้นศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี พบว่า ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกที่ทดแทนโปรตีนเกษตรและเจลลูกสำรอง มีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีดังนี้ ค่าความต้านทานแรงเฉือน (shear force) ต่ำกว่าสูตรต้นแบบ, คาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น, ไขมัน ความชื้นและเถ้าลดลง

ประภาศรี (2547) ได้ศึกษาการสกัดมิวซิเลจจากลูกสำรองเพื่อเป็นสารทดแทนไขมัน ในผลิตภัณฑ์หมูยอ โดยศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของลูกสำรองต่อไขมัน 4 สูตร คือ 0:3 (สูตรควบคุม), 1:2, 2:1 และ 3:0 การใช้ลูกสำรองทดแทนไขมันในผลิตภัณฑ์หมูยอทั้ง 3 สูตร เปรียบเทียบกับสูตรควบคุม มีผลต่อคุณภาพทางกายภาพ เคมีและคุณภาพทางประสาทสัมผัส พบว่า 3 สูตร ที่ใช้ลูกสำรองทดแทนไขมัน ไม่แตกต่างกัน แต่มีค่าแรงต้านการตัดขาดต่ำกว่าสูตรควบคุม เนื่องจากเนื้อลูกสำรอง มีน้ำอยู่ในโครงสร้าง จึงส่งผลให้ในสูตรลดไขมันมีปริมาณน้ำเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Claus และคณะ (1989) ว่าเมื่อปริมาณน้ำเพิ่มขึ้น จะมีผลให้โครงสร้างโปรตีนจับกับน้ำมากกว่าเกิดการจับกันเองระหว่างโปรตีน จึงทำให้ไส้กรอกโบโลญ่า มีความแน่นเนื้อลดลง ความสามารถในการอุ้มน้ำ ของสูตรที่ใช้ลูกสำรองแทนไขมัน มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำสูงกว่าสูตรควบคุม ความคงตัวของอิมัลชันลดต่ำลง เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของลูกสำรอง เพราะในเนื้อลูกสำรองกักเก็บน้ำไว้ในโครงสร้างได้มาก เมื่อปริมาณน้ำเพิ่มขึ้นในขณะที่ปริมาณโปรตีนเท่าเดิม มีผลให้ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนลดลง และปริมาณไขมันลดลงจากสูตรควบคุม เนื่องจากเนื้อลูกสำรองมีไขมันเพียงร้อยละ 0.1 มีความชอบด้านเนื้อสัมผัส, ความชอบด้านสี, ความชอบด้านรสชาติและความชอบรวม อัตราส่วน 2:1 คือ ระดับที่ผู้บริโภคยอมรับ มีคะแนนสูงสุดและสูงกว่าสูตรควบคุม

บทที่3

วิธีการดำเนินการ

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี

- วัตถุดิบที่ใช้ในการวิจัย
  - หอมหัวใหญ่
- อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย
  - กรวยกรอง
  - กรวยแยก
  - คอลัมน์ (column)
  - ขวดก้นกลม (round bottom flask)
  - กระจกนาฬิกา (watch glasses)
  - ขวดแก้วขนาดเล็ก (vial)
  - ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)
  - ขวดรูปชมพู่(elrenmayer flask)
  - แท่งแก้วคน (stirring rod)
  - บีกเกอร์ (beaker)
  - ปิเปตต์ (pipette)
  - หลอดทดลอง (test tube)
  - หลอดหยด (dropper)
  - อุปกรณ์หั่น เช่น มีด กรรไกร
- สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย
  - -ซิลิกาเจล (silica gel)
  - ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane)
  - เมทานอล (methanol)
  - เอทานอล (ethanol)
  - เฮกเซน (hexane)

- เครื่องมือที่ใช้
  - เครื่องระเหยสุญญากาศ
  - ตู้อบชนิดควบคุมอุณหภูมิ
  - เครื่อง autoclave
  - ชุดเครื่องกลั่นสาร

3.2 วิธีการทดลอง

การเตรียมวัตถุดิบ

นำหอมหัวใหญ่ล้างในน้ำให้สะอาด นำมาหั่น เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปล้างด้วยน้ำอีกครั้งแล้วพักทิ้งไว้ให้แห้งตามธรรมชาติที่อุณหภูมิห้อง (ให้น้ำที่ล้างระเหยออกจนหมด)

ขั้นตอนการสกัดสารจากสมุนไพรเพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียจากสารสกัดหอมหัวใหญ่การเตรียมสารสกัดจากหอมหัวใหญ่ทำได้โดยการสกัดจากหอมหัวใหญ่ 10 กรัม มาสกัดด้วยเอทานอล 95 % ปริมาณ 250 มิลลิลิตร โดยแช่ไว้เป็นเวลา 5,6,7,8,9และ10 ชม. ทำการแยกหอมหัวใหญ่กับสารที่สกัดออกมาได้ได้กระดาษกรอง และทำการแยกสารที่สกัดได้โดยนำมาระเหยเอทานอลออกด้วย Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45 - 47 °C ศึกษาปริมาณสารที่สกัดได้ และเก็บไว้ในขวดสีชาอุณหภูมิ 4 °C

การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. โดยขั้นตอนการเตรียมเชื้อทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษา (Escherichia coli และ *Salmonella* spp.) ให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียในหลอดสุดท้าย เป็น 10^{-3} ด้วย 0.85 % NaClปริมาณ 9 ml จำนวน 4 หลอดได้ทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารที่สกัดได้ทั้งหมด 3 วิธี คือ

1. การทดสอบหาบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Inhibition zone) ด้วยวิธี Disc diffusion techniques
2. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี Broth dilution technique
3. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้(Minimal bactericidal concentration, MBC) ด้วยวิธี Agar dilution technique

วิธีของการทดสอบมีรายละเอียดดังนี้

1. การทดสอบหาบริเวณยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) ด้วยวิธี Disc diffusion techniques

การหาบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Inhibition zone) ของสารสกัดจากหอมหัวใหญ่ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 300,200 และ 100 mg/ml โดยใช้ 95% เอทานอล เป็นตัวทำละลายในสารสกัดจากหอมหัวใหญ่ 1% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (โดยปริมาตร) เป็นตัวทำละลายในสารสกัดจากหอมหัวใหญ่ ทำการปิเปต 5 ไมโครลิตรของสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ที่มีตัวทำละลายคือ1% MSO (โดยปริมาตร) และ 95% เอทานอลลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร รวมทั้งหมด 5 ตำแหน่งโดยตัวทำละลาย 1%DMSO และ 95% เอทานอลซึ่งทำหน้าที่เป็น control แล้ววางกระดาษกรองบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจน และสำหรับเชื้อการบ่มเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดจะบ่มภายใต้อุณหภูมิ 35 - 37 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชม. แล้วทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้งแบคทีเรีย (inhibitionzone) ที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร

2. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC) ของสารสกัดจากหอมหัวใหญ่ ด้วยวิธี Broth dilution technique

การทดสอบหาค่า MIC ของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. ของสารสกัดจากหอมหัวใหญ่ โดยเริ่มต้นนำหลอดทดลองซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ จำนวน 10 หลอด ทำการดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ(broth) ใส่ลงในหลอดที่ 2 - 10 หลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วดูดสารสกัดที่ต้องการศึกษาลงในหลอดที่ 1 และ 2 หลอดละ 1 มิลลิลิตรต่อจากนั้นดูดสารในหลอดที่ 2 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่3 ทำซ้ำทำนองเดียวกันนี้ไปจนถึงหลอดที่ 9 สำหรับหลอดที่ 9 เมื่อผสมสารสกัดและอาหารเลี้ยงเชื้อเข้ากันได้ดีแล้วดูดสารละลายทิ้งไป 1 มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่ 10 จะมีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่มีสารสกัด จึงใช้เป็น positive control จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงไปในทุกหลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตรแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 - 18 ชม. การอ่านผลการหา MIC ให้สังเกตความขุ่นของเชื้อที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอดเปรียบเทียบกับ positive control

3. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดจากหอมหัวใหญ่ ด้วยวิธี Agar dilutiontechnique จากค่า MIC สามารถนำมาหาค่า MBC ได้ โดยนำหลอดที่ไม่มีความขุ่นจากการทดสอบหาค่า MIC ไปเทและเกลี่ย (spreadplate) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้จะสังเกตไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว

การเตรียมเชื้อแบคที่เรียที่ใชทดสอบ

ใชแบคทีเรียที่มีอายุไมเกิน 24 ชั่วโมง และความเขมขนของเชื้อที่ใชตองในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งโดยทั่วไปจะนิยมใช้เชื้อปริมาณ 10^5 – 10^7 เซลลตอมิลลิลิตร วิธีการทำมีดังตอไปนี้

1) เขี่ยโคโลนีของเชื้อที่ตองการทดสอบที่เพาะเลี้ยงไวในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง มาประมาณ 2-3 โคโลนีนำมาใสในอาหารสาหรบเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไวในหลอดทดสอบปริมาตรหลอดละ 2 มิลลิลิตร

2) นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อในขอ 1) ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซียลเซียสเปนเวลา 24 ชั่วโมง

3) นำเชื้อจากขอ 2) มาเจือจางใหไดจำนวนแบคทีเรีย 10^5 – 10^7 เซลลตอมิลลิลิตร โดยเจือจางดวยอาหารเลี้ยงเชื้อแลวนำไปวัดความขุนใหไดคาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น660 นาโนเมตร เทากับ 5

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการทดสอบนี้จะใชอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งโดยวิธี Agar diffusion โดยใชอาหาร Plate count agar (PCA)

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรย์

1) เขี่ยที่จานอาหารแข็ง เพื่อระบุตำแหนงที่จะวางแผนกระดาษกรองขนาดเส้นผานศูนยกลาง 6 มิลลิลิตร ทั้งหมด 4 ตำแหนง

2) วิธีเพาะแบคทีเรียลงบนอาหารทดสอบ ใชไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นไวโดยมีปริมาณเชื้อประมาณ 10^5 – 10^7 เซลลตอมิลลิลิตร แล้วบิดให้แห้งพอ หมาด ๆ กับข้างหลอดทดลองจากนั้นทำการ swab ให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อโดยลากเส้นผานศูนยกลางจานเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วปายเปนเส้นตั้งฉาก ผานเส้นที่ลากไว้ถี่ ให้ทั่วผิวหน้าแล้วหมุนจานเพาะเชื้อไปประมาณ 60 องศาแล้วปายเช่นกันทำเชนนี้ 3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไวประมาณ 3 - 5 นาทีเพื่อให้สวนผิวหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อแหง

3) การทดสอบสารสกัดโดยใช้กระดาษกรองปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย กลาง 6 มิลลิเมตรใชปากคีบ(forceps) คีบกระดาษวางบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไวขางตนแล้วกดเบาๆ มาวางที่ตำแหนงที่กำหนดไว

4) หยดตัวอยางสารสกัดกัดและ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายตางๆ ที่จะทดสอบวางใสลงแผนกระดาษกรองคนละตาแหน่งตามลำดับตำแหนงละ 10 ไมโครลิตรรวมทั้งหยดตัวทำละลายเปน control โดยใช automatic pipette ที่ปราศจากเชื้อ เสร็จแล้วนำจานเพาะเชื้อที่นไปเลี้ยงที่ 35 - 37 องศาเซลเซียส เปนเวลา 16 – 18 ชั่วโมงแล้วนำมาวัดเสนผานศูนยกลางของบริเวณที่ไมมีแบคทีเรียขึ้น (inhibition zone) โดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร

5) การอานผล เมื่อบมเชื้อจนครบ 16 -18 ชั่วโมงแลว ให้วัดขนาดของโซนใสที่เกิดขนี้ โดยวัดจากขอบโซนขางหนึ่งไปยังขอบโซนอีกขางหนึ่ง โดยใหผานจุดศูนย์กลางของpaper disc ดวย บันทึกหนวยเป็นมิลลิเมตร (ขอบโซนที่วัดตองเป็นโซนที่ชัดถามีเชื้อขึ้นบางๆ ให้ถือวาบริเวณนั้นยังมีปริมาณยาหรือสารสกัดชีวภาพสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได

ขนาดของโซนใส (Inhibition zone; มิลลิลิตร) = (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disk และ โซนใสของเชื้อ) ลบด้วย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disk (6 มิลลิลิตร)

$$\text{อัตราส่วนของ inhibition zone} = \frac{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสของเชื้อ}}{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ negative control}}$$

Broth Dilution Technique

1.ความเขมขนต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Minimal inhibitoryconcentration (MIC)

การทดสอบหาความไวของแบคทีเรียตอสารสกัดโดยวิธีนี้เปนวิธีที่ละเอียดวิธีหนึ่ง ซึ่งไดจากการทดสอบวิธีนี้จะทำใหทราบทั้ง MIC และ MLC (Minimal lethal concentration)ของสารสกัดนี้นั้นกับแบคทีเรียซึ่งทำการทดสอบหลักการโดยทวไปของวิธีนี้คือ การเลี้ยงแบคทีเรียที่ตองการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมีสารสกัดในปริมาณตางๆกันผสมอยูด้วย และสังเกตการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีสารสกัดในปริมาณต่างๆ ทดสอบหาความไวของแบคทีเรียตอสารสกัดโดยวิธี broth dilution technique นี้สามารถทำไดทั้ง macro broth dilution technique และ micro broth dilution technique ในที่นี้ทำการทดสอบโดยวิธี Macro broth dilution technique

1) การเตรียมแบคทีเรียที่ใชทดสอบ

แบคทีเรียที่ใชในการทดสอบตองอยูในระยะที่เซลทุกๆ เซลพรอมที่จะเจริญเติบโตหรือแบงเซลลได ควร เปนแบคทีเรียที่มีอายุไมมากโดยทั่วไปใชแบคทีเรียที่มีอายุไม่มากกวา 24 ชั่วโมงวิธีการเตรียมมีดังตอไปนี้

(1) เขี่ยโคโลนีของเชื้อที่ตองการทดสอบที่เพาะเลี้ยงไวในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีมาประมาณ 4 - 5 โคโลนีนำมาใสในอาหารเหลวที่เหมาะสมเขยาเพื่อใหเชื้อกระจายตัวออกจากกัน

(2) นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ (1) ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3 - 4 ชั่วโมง โดยเจือจางดวยอาหารเลี้ยงเชื้อแลวนำไปวัดความขุนใหไดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรเทากับ 5

2) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการทดสอบนี้จะใชอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวโดยใชอาหารเลยงเชื้อ Trypticase soy broth

3) การเตรียมสารสกัด ที่ใชในการทดสอบ โดยนำสารที่สกัดไดทุกตัวอยางนำมาละลายในตัวทำละลายให้ไดความเขมข้น 100 มิลลิกรัมตอมิลลิลิตร

4) การปฏิบัติการทดสอบการศึกษาความไวตอสารสกัด ดวยวิธี Macro broth dilution technique

(1) นำหลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ซึ่งผานการฆาเชื้อและทำใหแหงจำนวน 12 หลอดเขียนหมายเลขกำกับไวที่หลอด

(2) ใชปเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ (broth) ใสลงในหลอดที่ 2 - 12 หลอดละ 1มิลลิลิตร

(3) ใช้ปเปตดูดสารสกัดลงในหลอดที่ 1 และ 2 หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมสารในหลอดที่ 2 ให้เข้ากัน

(4) ใช้ไปเปตดูดสารในหลอดที่ 2 หลอดจำนวน 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดที่ 3

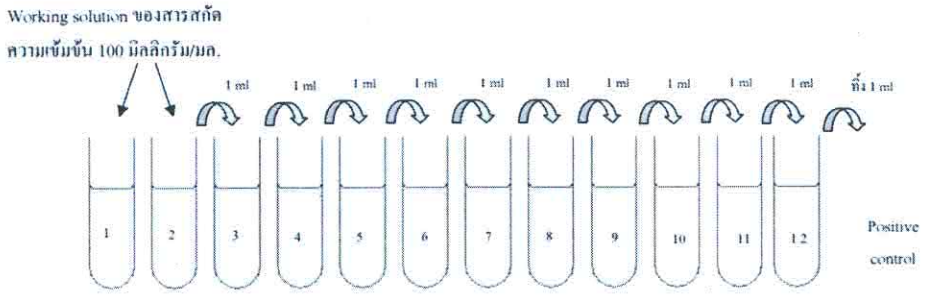
(5) ทำซ้ำในข้อ (4) ไปจนถึงหลอดที่ 11 (เปลี่ยนไปเปตทุกครั้งที่เปลี่ยนหลอด) เมื่อผสมสารละลายในหลอดที่ 11 ให้เข้ากันได้ดีแล้วให้ใช้ไปเปตดูดสารละลายทิ้งไป 1 มิลลิลิตร หลอดที่ 12 จะมีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่มีสารสกัดจึงใช้เป็น positive control

(6) เติมเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ลงไปในทุกหลอดจำนวนหลอดละ 1มิลลิลิตร

(7) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 - 18 ชั่วโมง

5) การอ่านผลการหา Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

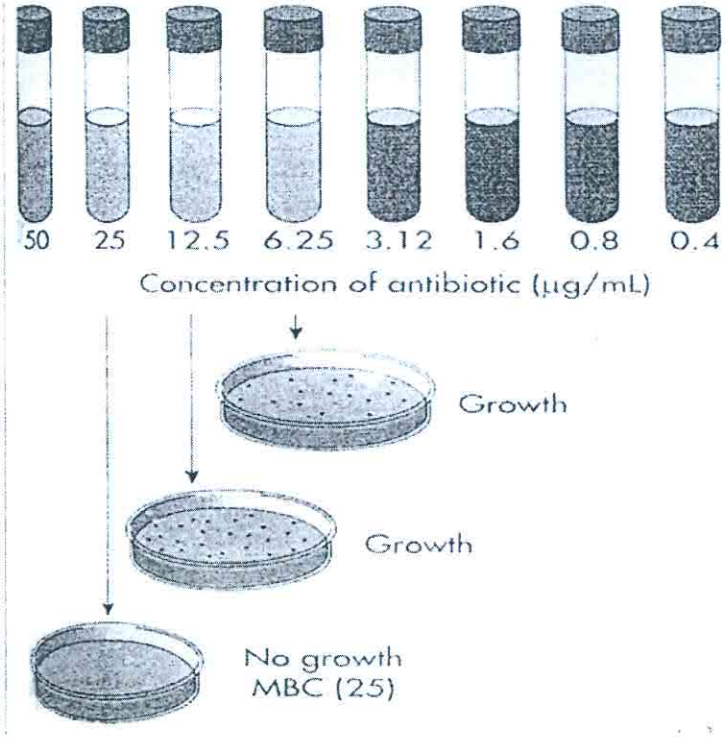
เมื่อบ่มเชื้อจนครบ 16 -18 ชั่วโมงแล้ว ให้สังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในลอดไม่ขุ่น อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่า MICของ บันทึกหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิเมตรค่า MIC คือค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่ใช้ทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ อย่างสมบูรณ์

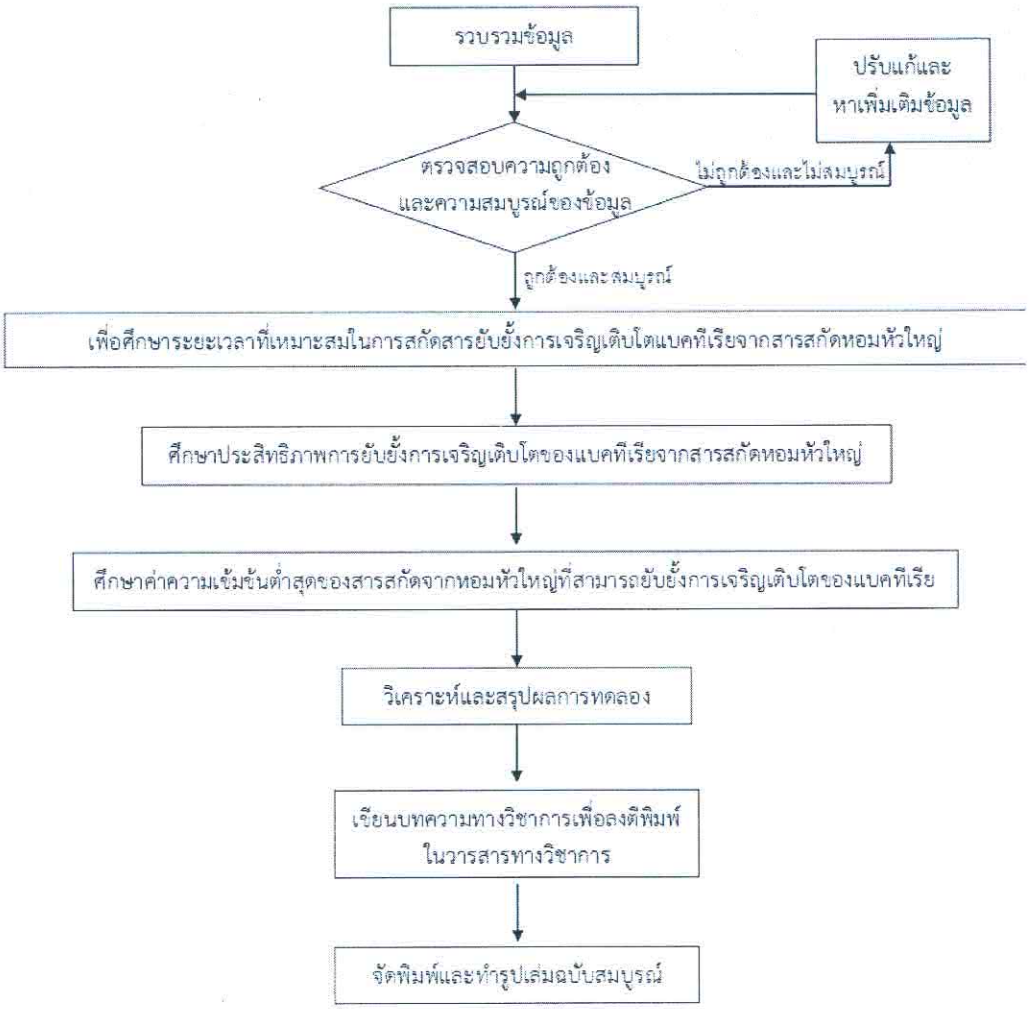


ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อหลว (มล.)	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ความเข้มข้นของสารสกัด (มก/ มล.)	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.08	0
จำนวนเชื้อทดสอบที่มีปริมาณเชื้อ $10^5 - 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

การคำนวนความเขมขนต่ำสุดที่สามารถฆาไดเชื้อ Minimal bactericidal concentration

(MBC) จากการหาคาความเขมขนต่ำที่สุดที่ทำใหเชื้อไม่เจริญในอาหารเหลวนั้น สามารถนำมาหาคา MBC ไดโดยนำหลอดที่ทำการทดสอบจากการหาคา MIC ที่ไมมีความขุนทุกหลอดไปspread plate บนอาหาร rypticase soy agar ถาความเขมขนของสารสกัดที่สามารถฆาเชื้อไดจะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อถาเชื้อไมตายจะพบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ




รวบรวมข้อมูล
ปรับแก้และ
หาเพิ่มเติมข้อมูล
ตรวจสอบความถูกต้อง
และความสมบูรณ์ของข้อมูล
ไม่ถูกต้องและไม่สมบูรณ์
ถูกต้องและสมบูรณ์
เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียจากสารสกัดหอมหัวใหญ่
ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากสารสกัดหอมหัวใหญ่
ศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากหอมหัวใหญ่ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย
วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง
เขียนบทความทางวิชาการเพื่อลงตีพิมพ์
ในวารสารทางวิชาการ
จัดพิมพ์และทำรูปเล่มฉบับสมบูรณ์

สถานที่และระยะเวลาในการดำเนินการทดลอง

สถานที่ที่ใช้ในการทำวิจัยนี้จะใช้ห้องปฏิบัติการของสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

ตารางแสดง ขั้นตอนแผนการดำเนินงานโครงการวิจัย (ตุลาคม 2557 – กันยายน 2558)

กิจกรรม	2557			2558								
	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. รวบรวมข้อมูล												
2. ศึกษาข้อมูลพื้นฐาน												
3. ศึกษาวิธีการสกัดสารยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียจากหอมหัวใหญ่												
4. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากสารสกัดจากหอมหัวใหญ่												
5. ศึกษาค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากหอมหัวใหญ่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย												
6. สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง												
7.จัดส่งบทความเพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ												
8. พิมพ์และจัดทำรูปเล่มสมบูรณ์												

บทที่ 4

ผลการทดลอง และอภิปลายผล

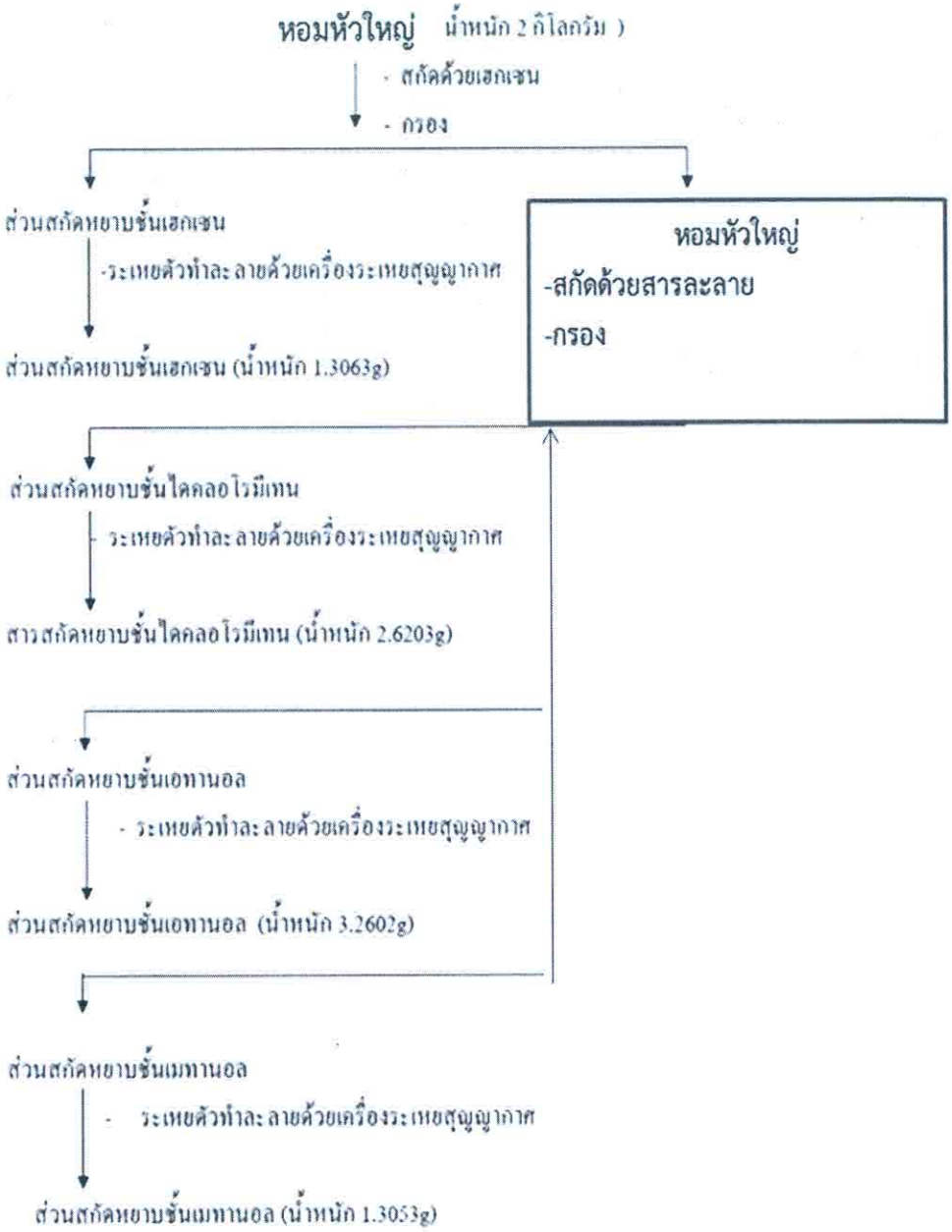
4.1 การศึกษาสารละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรีย

ผลการศึกษาสารละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียจากสารสกัดหอมหัวใหญ่ด้วยวิธีการแช่ยุ่ย โดยตัวทำละลายที่ใช้เป็นสารอินทรีย์ที่ระเหยง่าย จึงต้องใช้ปริมาณตัวทำละลายในการสกัดที่มากพอ เพื่อให้ตัวทำละลายแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในของวัชพืชออกมา และสารสกัดที่ได้จะไม่ถูกความร้อน ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้จะเพียงจากสารที่มีขั้วน้อยไปจนถึงสารที่มีขั้วมากคือ เฮกเซน , เอทานอล และเมทานอล ซึ่งผลของปริมาณของสารสกัดหยาบที่ได้แสดงดังตารางปริมาณสารสกัดหยาบจากหอมหัวใหญ่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด

ตารางที่ 2 ปริมาณสารสกัดหยาบจากหอมหัวใหญ่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด

ตัวทำละลาย	ปริมาณสารที่สกัดได้ (กรัม)
เฮกเซน	1.306
เอทานอล	3.260
เมทานอล	1.305

จากการศึกษาการใช้สารละลายทั้งสามชนิดเป็นตัวทำละลายเพื่อสกัดสารจากหอมหัวใหญ่ พบว่าการใช้ เอทานนอลสามารถให้ปริมาณสารที่สกัดได้มากที่สุด คือ 3.260 กรัม เฮ็กเซ็นและเมทานอลให้ปริมาณสารที่ได้ 1.306และ 1.305 กรัมตามลำดับ


หอมหัวใหญ่ น้ำหนัก 2 กิโลกรัม)
- สกัดด้วยเฮกเซน
- กรอง
ส่วนสกัดหยาบชั้นเฮกเซน
-ระเหยตัวทำละ ลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ
ส่วนสกัดหยาบชั้นเฮกเซน (น้ำหนัก 1.3063g)
หอมหัวใหญ่
-สกัดด้วยสารละลาย
-กรอง
ส่วนสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน
- ระเหยตัวทำละ ลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ
สาวสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน (น้ำหนัก 2.6203g)
ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล
- ระเหยตัวทำละ ลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ
ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล (น้ำหนัก 3.2602g)
ส่วนสกัดหยาบชั้นเมทานอล
- ระเหยตัวทำละ ลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ
ส่วนสกัดหยาบชั้นเมทานอล (น้ำหนัก 1.3053g)

4.2 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.*

ผลการศึกษาการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.*จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.* ของสารสกัดจากหอมหัวใหญ่ที่สกัดด้วย เอทานอล, เฮกเซน และเมทานอลโดยใช้วิธี disc diffusion techniques ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

1. ผลของสารสกัดหอมหัวใหญ่ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.*

สารสกัดหอมหัวใหญ่	ตัวทำละลาย	Inhibition zone (มิลลิเมตร) ของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ			
		Escherichia coli		*Salmonella spp.*	
		E – Negative control	Negative control	E – Negative control	Negative control
	เอทานอล	1	9	0	6
	เมทานอล	0	6	0	6
	เฮกเซน	0	6	0	6

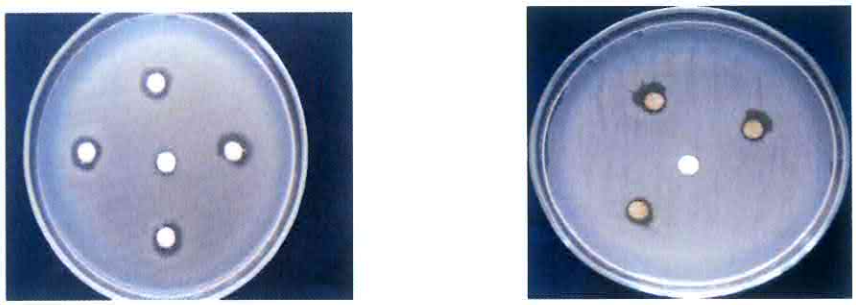
ในการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 2 ชนิด ของสารสกัดหอมหัวใหญ่โดยใช้ตัวทำละลาย คือ เอทานอล, เฮกเซน และเมทานอล พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ได้ โดยมีขนาดของวงใสเท่ากับ 6 มิลลิเมตร(ตารางที่ 3 และภาพที่ 14) แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Salmonella spp.*.

หมายเหตุ: เส้นผ่านศูนย์กลางของ disc เท่ากับ 6 มิลลิเมตร

E = Extract

Negative control = ใช้ตัวทำละลายแทนสารสกัด

E – Negative control = ผลต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของสารสกัดกับเส้นผ่านศูนย์กลางของ
ตัวทำละลาย



ภาพแสดง วงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ของสารสกัดหัวหอมใหญ่ที่สกัดด้วยเอทานอล

หมายเหตุ: C = Control (เอทานอล)

จากการทดลองทั้งหมด โดยการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.* ของสารสกัดหัวหอมใหญ่ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน โดยใช้วิธี Disc diffusion techniques สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ได้และสารสกัดหอมหัวใหญ่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ดังนั้นจึงนำผลที่ได้มาศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ต่อไป

4.3 เพื่อศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.*

การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* จากการคัดเลือกผลจากวิธี disc diffusion techniques ซึ่งพบว่าสารสกัดหอมหัวใหญ่ที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ได้ จึงทำการศึกษาหาค่าความข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ด้วยวิธี Macro broth dilution technique พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหอมหัวใหญ่เท่ากับ 25 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการตกตะกอนของสารสกัด และสารละลายด้านบนมีลักษณะใส แสดงว่า *Escherichia coli* ไม่สามารถเจริญได้ เมื่อเปรียบเทียบกับที่ความเข้มข้นที่น้อยกว่า 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารละลายขุ่นทั้งหลอด แสดงว่า *Escherichia coli* สามารถเจริญได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางค่า MIC ของสารสกัดดอกกกที่สกัดด้วยเอทานอลในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli*

ตาราง ค่า MIC ของสารสกัดดอกกกที่สกัดด้วยเอทานอลในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli*

ความเข้มข้นของสารสกัดดอกกกที่สกัดด้วยเอทานอล (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	การเจริญของ *Escherichia coli*
100	ตกตะกอน, สารละลายด้านบนใส
50	ตกตะกอน, สารละลายด้านบนใส
25	ตกตะกอน, สารละลายด้านบนใส
6.25	++
3.12	++
1.56	++
0.78	++
0.39	++
0.19	++
0.09	++

หมายเหตุ : ++ หมายถึง จุลินทรีย์เจริญปานกลาง

100 50 25 12.5 6.25 3.12 1.56 0.78 0.39 0.19 0.09 PC

ภาพแสดง ค่า MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของของสารสกัดดอกกกที่สกัดด้วยเอทานอลในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ด้วยวิธี Macro broth dilution technique
PC = Positive control

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการสกัดสารสกัดหยาบจากหอมหัวใหญ่ ด้วยวิธีการแช่ยุ่ย (marceration) โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือเฮกเซน , เอทานอล และเมทานอล พบว่าการสกัดสารสกัดหยาบจากหอมหัวใหญ่ที่มีน้ำหนักแห้ง 2 กิโลกรัม จะได้ปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด เท่ากับ 1.305 3.260 และ1.306กรัมตามลำดับ จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. ของสารสกัดหอมหัวใหญ่โดยใช้ตัวทำละลาย คือ เอทานอล, เฮกเซน และเมทานอล พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ได้ โดยมีขนาดของวงใสเท่ากับ 6 มิลลิเมตรแต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Salmonella spp.* ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* จากการคัดเลือกผลจากวิธี disc diffusion techniques ซึ่งพบว่าสารสกัดหอมหัวใหญ่ที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ได้ จึงทำการศึกษาหาค่าความข้มข้นต่ำสุด(MIC) ของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ด้วยวิธี Macro broth dilution technique พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหอมหัวใหญ่เท่ากับ 25 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการตกตะกอนของสารสกัด และสารละลายด้านบนมีลักษณะใส แสดงว่า *Escherichia coli* ไม่สามารถเจริญได้ เมื่อเปรียบเทียบกับที่ความเข้มข้นที่น้อยกว่า 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารละลายขุ่นทั้งหลอด แสดงว่า *Escherichia coli* สามารถเจริญได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ข้อเสนอแนะ

1.จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากหอมหัวใหญ่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียบางชนิด ดังนั้นจึงสามารถนำมาพัฒนาต่อยอดงานวิจัย โดยศึกษาการพัฒนาการผลิตยา หรือเครื่องสำอาง โดยต้องศึกษาถึงประสิทธิภาพในการรักษาและความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นเพื่อความปลอดภัย และเป็นประโยชน์ในการผลิตเชิงพาณิชย์ต่อไป ถ้าสามารถพัฒนาถึงขั้นการผลิตจริง จะเป็นการนำหอมหัวใหญ่ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านมาใช้ประโยชน์ จึงเป็นการลดปริมาณการใช้สารเคมีในทางอ้อม ดังนั้นจึงอาจคิดค้นงานวิจัยอื่นๆ เพื่อเป็นการนำหอมหัวใหญ่มาใช้ประโยชน์

2.ควรศึกษาการวิจัยต่อยอด ในเรื่องการแยกสารให้บริสุทธิ์ของสกัดหยาบที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารตัวที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบที่ได้ ในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

ภาคผนวก

คุณลักษณะสารสกัด

เอทานอล (Ethanol) หรือ **เอทิลแอลกอฮอล์** (ethyl alcohol)

เอทานอล เป็นแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ สูตร CH_3CH_2OH สามารถผลิตได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี และกระบวนการหมักวัตถุดิบจำพวกแป้ง และน้ำตาลด้วยจุลินทรีย์ นิยมนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตสารเคมีอื่นๆหรือนำมาใช้ประโยชน์โดยตรง เช่น ใช้เป็นตัวทำละลาย เครื่องดื่ม และเชื้อเพลิง เป็นต้น

ลักษณะเฉพาะ

สถานะ : ของเหลวใส ไม่มีสี ระเหยง่าย และมีกลิ่นเฉพาะตัว
สูตร : CH_3CH_2OH
น้ำหนักโมเลกุล : 46.07 กรัม/โมล
จุดเยือกแข็ง : -114.1 องศาเซลเซียส
จุดเดือด : 78.32 องศาเซลเซียส
จุดวาบไฟ : 14 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิวิกฤต : 243.1 องศาเซลเซียส
ความดันวิกฤต : 6383.48 kpa
ความหนาแน่น : 0.7893 กรัม/มิลลิลิตร
การละลายน้ำ : ละลายได้ดีมาก

ประโยชน์ของเอทานอล

1. ใช้เป็นสารตั้งต้นหรือตัวทำละลาย เช่น การผลิตเครื่องสำอาง ยา น้ำหอม เป็นต้น
2. ใช้ผสมในเชื้อเพลิงเพื่อเพิ่มค่าออกเทน และลดปริมาณเชื้อเพลิงบางชนิด เช่น น้ำมันแก๊สโซฮอล์ E10 (แอลกอฮอล์ 1 ส่วน น้ำมันเบนซิน 9 ส่วน) E20 (แอลกอฮอล์ 2 ส่วน น้ำมันเบนซิน 8 ส่วน)
3. เป็นส่วนผสมของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ต่างๆ
4. ใช้สำหรับการฆ่าเชื้อหรือล้างแผล เช่น แอลกอฮอล์ 75%
5. ใช้สำหรับการทำความสะอาด และฆ่าเชื้อในส่วนผสมของน้ำยาฆ่าเชื้อ

กระบวนการผลิต

1. การสังเคราะห์

การสังเคราะห์เอทานอลสามารถสังเคราะห์ได้จากเอธิลีน (C2H4) ด้วย 2 วิธี คือ

– ไดเรค ไฮเดรชันเอธิลีน ด้วยการทำปฏิกิริยาของเอทิลีนกับไอน้ำที่ความเข้มข้นเท่ากัน ที่ความดัน 5-8 เมกกะพลาสคาล อุณหภูมิ 250-300 องศาเซลเซียส โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ กรดฟอสฟอริค-ซิลิกาเจล และทังสเตนออกไซด์-ซิลิกาเจล ทำให้ได้แอลกอฮอล์เข้มข้น 10-25% ดังสมการ

$$C_2H_4 + H_2O = CH_3CH_2OH$$

$$2CH_3CH_2OH = (CH_3CH_2)_2O + H_2O$$

– อินไดเรค ไฮเดรชันเอธิลีน โดยขั้นแรก ใช้เอทิลีนความบริสุทธิ์ 35-95% ทำปฏิกิริยากับกรดกำมะถันทำให้ได้เอทานอลความเข้มข้นไม่เกิน 35% ดังสมการ

$$C_2H_4 + H_2SO_4 = CH_3CH_2OSO_3H$$

$$2(C_2H_4) + H_2SO_4 = (CH_3CH_2O)_2SO_2$$

ขั้นที่ 2 การทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเอทิลซัลเฟตใน 2 แบบ จนได้เอทานอล

$$CH_3CH_2OSO_3H + H_2O = CH_3CH_2OH + H_2SO_4$$

$$(CH_3CH_2O)_2SO_2 + H_2O = 2(CH_3CH_2O) + H_2SO_4$$

การสังเคราะห์วิธีนี้สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลได้ 50-60% ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก ทั้งนี้ วิธีการผลิตเอทานอลด้วยการสังเคราะห์นี้ปัจจุบันไม่ได้รับความนิยม เนื่องจากมีต้นทุนสูง และไม่คุ้มค่ากับการลงทุน

2.การหมักของจุลินทรีย์

เป็นวิธีการดั้งเดิม และนิยมใช้ในการผลิตเอทานอลในปัจจุบัน เนื่องจากมีต้นทุนต่ำ กระบวนการไม่ยุ่งยากซับซ้อน และสามารถหาวัตถุดิบในการผลิตได้ง่าย วัตถุดิบเหล่านี้ที่นิยมนำมาใช้ ได้แก่ มันสำปะหลัง อ้อย ข้าวโพด และกากน้ำตาล

การผลิตเอทานอลหรือเอทิลแอลกอฮอล์ เป็นกระบวนการหมักโดยใช้ยีสต์ที่ผลิตแอลกอฮอล์ หมักวัตถุดิบจำพวกแป้ง น้ำตาล และเซลลูโลส ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และเปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นแอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้น 10-15% ภายใต้ภาวะไร้อากาศ และผ่ากระบวนการกลั่นเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์บริสุทธิ์

$$C_6H_{12}O_6 + \text{ยีสต์} = 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2ATP$$

จากสมการจะใช้กลูโคส 1 กรัม สามรถผลิตแอลกอฮอล์ได้ 0.511 กรัม คาร์บอนไดออกไซด์ 0.489 กรัม ทั้งนี้ ในสภาวะความเป็นจริงจะเกิดแอลกอฮอล์น้อยกว่า 0.511 กรัม เนื่องจากยีสต์จะนำน้ำตาลบางส่วนมาใช้สำหรับการเจริญเติบโต และเปลี่ยนเป็นสารอื่นๆ เช่น กลีเซอรอล และซัคนิเดท เป็นต้นแต่หากมีออกซิเจน ยีสต์จะใช้น้ำตาลสำหรับการสังเคราะห์เซลล์ทำให้ได้คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ

$$6O_2 + C_6H_{12}O_6 = \text{เซลล์} + 6H_2O + 6CO_2 + 38ATP$$

ยีสต์สำหรับการหมัก

การใช้ยีสต์สำหรับการหมักวัตถุดิบเพื่อผลิตแอลกอฮอล์จะขึ้นกับชนิดของคาร์โบไฮเดรตหรือวัตถุดิบที่ใช้ สำหรับการหมักวัตถุดิบประเภทแป้ง และน้ำตาลทั่วไปจะใช้ยีสต์จำพวก Saccharomyces sp. มีลักษณะเป็นรูปไข่ รูปทรงกลม หรือทรงกระบอก เช่น S. cerevisiae, S. ellipsoideus, S. uvarum เป็นต้น โดยทั่วไปนิยมใช้ S. cerevisiae เนื่องจากสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ได้ดี ทนต่อความเข้มข้นน้ำตาลที่สูงได้

ลักษณะของยีสต์ที่ดี

- สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ได้สูง เหลือน้ำตาลน้อย
- ทนต่อฤทธิ์ของแอลกอฮอล์ได้ดี
- ทนต่อสภาวะ pH ต่ำ และเป็นกรดได้ดี
- สามารถรวมตัวกัน และตกตะกอนได้ดี
- ไม่เปลี่ยนแปลงง่าย และทนต่อสภาวะต่างๆในการหมักได้ดี

ตัวอย่างขั้นตอนการผลิต

วัตถุดิบที่ใช้ ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด มันสำปะหลัง และมันฝรั่ง วัตถุดิบเหล่านี้จะเข้ากระยวนการล้างทำความสะอาด และเข้าสู่กระบวนการบด

1. เข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนเปลี่ยนเส้นใย และแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์หรือกรด และเข้าสู่กระบวนการหมัก
3. พืชประเภทให้น้ำตาล เช่น อ้อย และกากน้ำตาล จะเข้าสู่กระบวนการบีดอัดแยกน้ำ และเข้าสู่

กระบวนการหมัก

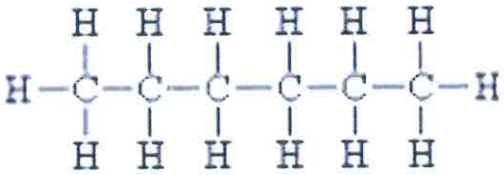
4. เมื่อสภาวะการหมักเกิดขึ้นจนได้แอลกอฮอล์ในปริมาณที่เหมาะสมจะเข้าสู่กระบวนการกลั่นแยกเอาแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 95% ออกมา
5. แอลกอฮอล์ 95% จะถูกนำมาใช้สำหรับการรับประทานในรูปเครื่องดื่ม ใช้ในวงการแพทย์ อุตสาหกรรม และผสมเป็นน้ำมันเชื้อเพลิง

เฮกเซน (hexane)

เฮกเซน (hexane) เป็นสารที่ผลิตได้จากกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบหรือการแยกก๊าซปิโตรเลียมเหลว ที่ถูกนำมาใช้งานสำหรับเป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมต่างๆ อาทิ การสกัดสารอินทรีย์จากสมุนไพร หรือใช้เป็นส่วนผสมเพื่อเป็นตัวทำละลายสี เป็นต้น

ลักษณะเฉพาะ

ชื่ออื่นที่เรียก: Naphtha (petroleum), hydrotreated light, diproply, gettysolv-b และhex
สถานะ: เป็นของเหลวใส ไม่มีสี มีกลิ่นฉุน
สูตรโมเลกุล: C4H14
สูตรโครงสร้างโมเลกุล: CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3
น้ำหนักโมเลกุล: 86.1766
จุดหลอมเหลว: -100 ถึง -95 องศาเซลเซียสจุดเดือด: 69 องศาเซลเซียส
ความถ่วงจำเพาะ: 0.660การละลายน้ำ: 10.5 มก./ลิตร
ดัชนีหักเหแสง: 1.375จุดวาบไฟ: -27 องศาเซลเซียสความไวไฟ: จัดเป็นวัตถุอันตรายที่เป็นของเหลวและไอระเหยที่มีความไวไฟสูงสารที่เข้ากันไม่ได้: สารออกซิไดซ์, แมกนีเซียมเปอร์คลอเรท, คลอรีน, ฟลูออรีน, พลาสติก



การผลิต

เฮกเซนสามารถผลิตได้จากกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบ หรือ ก๊าซปิโตรเลียมเหลว ผลพลอยได้จากการกลั่นจะเกิดเฮกเซนหลายไอโซเมอร์ และจะเข้าสู่กระบวนการแยกให้ได้ n-hexane ที่บริสุทธิ์ การใช้ประโยชน์เฮกเซนเป็นสารอินทรีย์ระเหยชนิดหนึ่งที่นิยมใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมต่างๆ อาทิ

- การสกัดน้ำมันจากเมล็ดธัญพืชต่างๆ อาทิ ถั่วเหลือง เมล็ดฝ้าย ทานตะวัน เมล็ดข้าวโพด เป็นต้น

- ใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมสี สีย้อม หมึกพิมพ์ กาว เป็นต้น- ใช้เป็นตัวทำละลายหรือสกัดสารในสมุนไพรต่างๆการรับสารของมนุษย์- ค่า RfDo ของเฮกเซน (Reference dose โดยการกิน) เท่ากับ 6.0×10^{-2} มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน- ค่า RfDi ของเฮกเซน (Reference dose โดยการหายใจ) เท่ากับ 5.71×10^{-2} มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน

ข้อมูลความปลอดภัย

มีการทดสอบความอันตรายของสารเฮกเซน โดยมีการทดสอบด้วยวิธีต่างๆ ทั้งการใช้แบคทีเรีย และเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ พบไม่จัดเป็นสารก่อการกลายพันธุ์ความเป็นพิษของเฮกเซนต่อระบบประสาท พบอาการที่สำคัญ คือ มีอาการแขน ขาอ่อนแรง และอาจเป็นอัมพาตได้ โดยพบอาการอ่อนแรงที่ขาก่อน และเกิดอาการที่แขนตามมา ร่วมด้วยกับอาการปวดศรีษะ วิงเวียนศรีษะ มึนงง หายใจลำบาก มีอาการเบื่ออาหาร อาการเหล่านี้มักเกิดในคนที่ทำงานที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารตัวทำละลายต่างๆ เช่น คนงานประกอบรองเท้า คนงานทำสี เป็นต้น

ฤทธิ์ของเฮกเซนที่มีต่อ ระบบประสาทที่เกิดอาการวิงเวียนศรีษะ เซื่องซึม จะเกิดขึ้นบริเวณ cerebellum เกิดการกดระบบควบคุมการหายใจ ร่วมด้วยการออกฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้มีอาการเคลิบเคลิ้ม และหากได้รับสารพิษในปริมาณมากหรือเป็นเวลานานอาจทำให้เกิดการทำลายระบบ ประสาทส่วนกลางได้ ส่งผลทำให้เกิดควบผิดปกติของการทรงตัวเดินเซมีอาการความจำเสื่อม

1. เฮกเซนจัดเป็นสารมีพิษ ห้ามรับประทานหรือสูดดม และควรใช้ในสถานที่ที่มีการระบายอากาศที่ดี
2. สารละลายเฮกเซน และไอระเหยมีความไวไฟสูง ต้องหลีกเลี่ยงความร้อน และประกายไฟขณะใช้งาน
3. เป็นอันตรายต่อผิวหนัง และทางตา ทำให้เกิดการอักเสบ ระคายเคือง ควรสวมหน้ากากหรือผ้าปิดจมูก สวมถุงมือ รองเท้า และสวมเสื้อผ้าให้มิดชิดขณะใช้งาน
4. เมื่อสัมผัสกับผิวหนังหรือตา ให้ล้างด้วยน้ำสะอาด หากมีอาการรุนแรงให้รีบพบแพทย์ทันที
5. การสูดดมหรืออยู่ในสถานที่ที่มีไอระเหยจะทำให้เกิดอาการวิงเวียน ร่างกายอ่อนเพลีย แขน ขาชา ให้รีบออกห่างหรือนำผู้ป่วยออกจากสถานที่ดังกล่าวทันที

6. การกลืนกินจะทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียนศรีษะ แขนขา ชา จึงรีบปฐมพยาบาล และนำส่งแพทย์ทันที

7. เมื่อใช้งานเสร็จ ควรปิดฝาให้แน่น

8. ควรเก็บในที่มิดชิด อุณหภูมิระหว่าง 0 ถึง 40 องศาเซลเซียส ห่างจากแสงแดด ปะกายไฟ และแหล่งความร้อนต่างๆ รวมถึงสารที่เข้ากันไม่ได้ในข้างต้น

1. การตรวจนับจำนวนโคโลนีและรายงานผล

ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหวาง 30-300โคโลนี หาคาเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากทั้ง 3 จานเพาะเชื้อรายงานผลการตรวจนับเปนหนวยโคโลนีตอกรัมของตัวอยาง (cfu /g) หรือโคโลนี (APHA, 2001)

1.1 ถาจำนวนโคโลนีที่ขึ้นมาจำนวนอยูระหวาง 30-300 โคโลนีถาจำนวนโคโลนีที่ขึ้นมีจำนวนโคโลนีอยูระหวาง 30-300 โคโลนีใหนับจำนวนโคโลนีและคำนวนใหอยูในรูปโคโลนีตอกรัมของตัวอยาง (cfu /g)

ดังสมการ CFU/g = c (V1n1 + 0.1n2) d

เมื่อ V1 = ปริมาตรของสารละลายที่ใชในการเพาะเชื้อ
c = ผลรวมของโคโลนีที่นับไดทั้งหมดจากจานเพาะเชื้อที่นับไดในชวง 30-300โคโลนี
n1 = จำนวนจานเพาะเชื้อที่นับไดในชวง 30-300 โคโลนีในระดับความเขมขนแรก
n2 = จำนวนจานเพาะเชื้อที่นับได้ในช่วงง 30-300 โคโลนีในระดับความเขมขนที่สอง
d = ระดับความเขมขนแรกที่สามารถนับเชื้อไดในช่วง30-300 โคโลนี

คำนวณในรูปโคโลนีโดยมีวิธีคำนวณดังตัวอยางตอไปนี้เชนนับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อได 20 โคโลนีที่ระดับความเขมขน 10-1 หรือ 1:10ปริมาตรสารละลายที่ใช้ในการเพาะเชื้ออ 0.1 มิลลิลิตร มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ย 20 โคโลนีปริมาตรสารละลายที่ใชในการเพาะเชื้อ 1 มิลลิลิตร มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ย 20/0.1 = 200 โคโลนีคือ ที่ระดับความเขมขน 10-1 มีจำนวนโคโลนีจำนวน 200 โคโลนี/1 มิลลิลิตรถาที่ระดับความเขม ขน 1 จะมีจำนวนโคโลนี (200 x 1)/10-1โคโลนีหรือ 200 x 10 โคโลนีหรือ2000 โคโลนี/1 มิลลิลิตรดังนั้น ปริมาตรสารละลายที่ใชในการเพาะเชื้อ 1 มิลลิลิตร ที่ระดับความเขมขน 1 จะมีจำนวนโคโลนีทั้งหมด 2000 โคโลนีถาปริมาตรสารละลายที่ใชในการเพาะเชื้อทั้งหมด 50 มิลลิลิตร ที่ระดับความเขมขน 1 จะมีจำนวนโคโลนีทั้งหมด 2000 x 50 = 100,000 โคโลนีคือ ตัวอยางผลลิ้นจี่ 5 ผล มีจำนวนโคโลนทั้งหมด 100,000 โคโลนีดังนั้น คิดเปนจำนวนโคโลนีตอผลลิ้นจี่เทากับ 100,000/5 = 2x104โคโลนีหรือเขียนในรปล้อการลิทึมฐานสิบ ($\log^{10}$) ได เทากับ 4.30 log โคโลนีตอผลลิ้นจี่

1.2 ถ้าทุกความเจือจางมีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 30 โคโลนีให้รายงานผลการตรวจนับโคโลนีที่ความเจือจางต่ำสุดในรูปโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่างตามข้อ 1.1 เป็นค่าโดยประมาณ (estimate aerobic plate count)

1.3 ถ้าทุกความเจือจางไม่มีโคโลนีขึ้นเลยให้รายงานว่า มีจำนวนน้อยกว่า (<) ความเจือจางที่ต่ำสุดเช่น ที่ความเจือจาง 1:100 ไม่มีโคโลนีขึ้นเลย ให้รายงานผลการตรวจนับว่ามีจำนวนแบคทีเรีย <100 โคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม(โดยประมาณ) หรือ ที่ความเจือจาง 1:10 ไม่มีโคโลนีขึ้นเลย ให้รายงานผลการตรวจนับว่ามีจำนวนแบคทีเรีย <10 โคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม (โดยประมาณ)

1.4 ถ้ามีจำนวนโคโลนีมากกว่า 300 โคโลนีถ้าจำนวนโคโลนีเกิน 300 โคโลนีไม่มากนักให้นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่พบในความเจือจางสูงสุดคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยออกมาและรายงานผลเป็นค่าโดยประมาณแบคทีเรียทั้งหมดถ้าจำนวนโคโลนีเกิน 300 โคโลนีมากเกิน 10 โคโลนีต่อพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตรให้นับจำนวนโคโลนีที่พบในพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร (โดยแบ่งเป็นช่องขนาด 1 ตารางเซนติเมตรแล้วนับจำนวนโคโลนีที่อยู่ในช่องนั้นจำนวน 13 ช่อง แบบสุ่ม) รวมจำนวนโคโลนีโดยประมาณ(โคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม) ของตัวอย่างนั้นถ้าจำนวนโคโลนีเกิน 300 โคโลนีมากจนไม่สามารถนับได้ให้รายงานว่า “TNTC” (TooNumerous To Count) และต้องเตรียมตัวอย่างใหม่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ครั้งต่อไป