# อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย

## 1. การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในผักสลัด

1.1 ตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบ จะทำการตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ในผักตระกูลสลัด (lettuce) จำนวน 2-3 ชนิด จากแหล่งต่างๆ ดังนี้

1) ที่ขายอยู่ตามตลาดสด จำนวน 3 แห่ง

2) ที่ขายอยู่ในห้างสรรพสินค้า จำนวน 3 แห่ง

3) จากแปลงเกษตรกร จำนวน 3 สถานที่

4) จากฟาร์มปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน จำนวน 3 ฟาร์ม

ผักใบแต่ละชนิดที่นำมาตรวจ จะเฉพาะเจาะจงลงไปในกลุ่มแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร (food-borne pathogens) ซึ่งได้แก่ *E. coli* และ *Salmonella* และ post-harvest pathogens ซึ่งได้แก่ *Pseudomonas* และ *Erwinia* โดยแต่ละแห่งจะสุ่มเก็บมา 15 ตัวอย่าง ในการตรวจสอบแต่ละครั้ง

1.2 การตรวจปริมาณเชื้อจุลินทรีย์

ทำการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต โดยวิธี agar plate count บนอาหารจำเพาะ (selective media) ที่ใช้ในการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด และบนอาหารที่ใช้ตรวจนับแบคทีเรียทั่วไป (plate count agar)

1.3 การจัดจำแนกเชื้อ

โดยการส่งไปวิเคราะห์ภายนอกเพื่อยืนยันชนิดของแบคทีเรีย พร้อมทั้งเก็บรักษาเชื้อไว้เพื่อการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

## 2. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืช ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ในสภาพ *in vitro*

2.1 การเตรียมน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืช

1) การเตรียมน้ำมันหอมระเหย โดยนำกานพลู และอบเชยในรูปของผงบดแห้ง ส่วนกะเพรา และโหระหาใช้ใบสด (ที่ทำการปลูกในแปลงปลูกคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จนถึงระยะเริ่มออกดอก) นำไปสกัดน้ำมันด้วยวิธี hydro distillation โดยนำส่วนของพืชที่จะสกัดใส่ boiling flask ประมาณสองในสามส่วน จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนท่วมชิ้นส่วนของพืช ให้ความร้อนที่เหมาะสมตลอดระยะเวลาในการกลั่นประมาณ 3-12 ชั่วโมง จากนั้นเก็บน้ำมันหอมระเหยที่ได้ในขวดทึบแสงแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10°C เพื่อรอการทดสอบต่อไป

2) การเตรียมสารสกัด ด้วยวิธี extraction solvent โดยชั่งตัวอย่างพืชอย่างละ 1 กิโลกรัม เติม 95% ethanol โดยใช้อัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:10 แช่ไว้เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองเอาส่วนที่เป็นสารละลายออกด้วยผ้าขาวบางแล้วกรองซ้ำด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนของสารละลายที่กรองได้ไประเหย ethanol ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จนได้สารสกัดหยาบ (crude extract) นำเก็บใส่ขวดทึบแสงแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 $^{o}$C องศา เพื่อรอการทดสอบ

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดโดยวิธี paper disc agar diffusion

นำส่วนของสารสกัดจากพืชที่แยกได้จากข้อ 2.1 มาศึกษากรรมวิธีในการทำให้สารสามารถละลายหรือแขวนลอยในน้ำ และจากนั้นทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ โดยวิธี paper disc agar diffusion บนอาหาร NA (nutrient agar) หรือTSA (tryptone soya agar) โดยใช้ micropipette ขนาด 10 ไมโครลิตร หยดสารสกัดแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 100, 500, 1,000, 5,000 และ 10,000 ppm (0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg/ml หรือ ul/ml) ลงบนกระดาษกลม (paper disc) ขนาด 6 มม. ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำกระดาษกลมนี้ไปวางบนผิวหน้าอาหาร โดยมี control (0 ppm) อยู่ตรงกลาง ทำ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 10, 15 และ 25$^{o}$C เป็นเวลา 24 ชม. บันทึกผลโดยตรวจดูการเกิดบริเวณยับยั้ง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง หาค่าเฉลี่ยและบันทึกภาพ

2.3 การหาค่า MIC (minimal inhibitory concentration) และ MBC (minimal bactericidal concentration) ของสารสกัด หรือน้ำมันหอมระเหย

ทำการหาค่าโดยใช้วิธี Broth dilution method (Davision and Branen, 1993) โดยใช้หลอดทำลองจำนวน 14 หลอด ปิเปตอาหาร TSB (Tryptone soya broth) จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 1-11 ส่วนหลอดที่ 12 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารสกัด 1 มิลลิลตร หรือน้ำมันหอมระเหย (ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 100 mg/ml หรือ 100 ul/ml) ลงในหลอดที่ 1 และ หลอดที่ 13 จากนั้นผสมสารในหลอดที่ 1 ให้เข้ากัน แล้วปิเปตสารในหลอดที่ 1 มา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 2 ทำซ้ำวิธีการเดียวกันจนถึงหลอดที่ 10 เตรียมเชื้อที่ต้องการทดสอบโดยเตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียให้ความขุ่นเท่ากับ McFarland No 0.5 (ซึ่งจะมีความเข้มข้นประมาณ $10^{8}$ cfu/ml) จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นประมาณ $1\times10^{6}$ cfu/ml (ศวรรณี เหลืองสุนทร และ วลัยลักษณ์ จันทรปานนท์. 2550) แล้วปิเปตเชื้อที่ได้ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 1-11, 13 และ 14 ส่วนในหลอดที่ 14 ปิเปต DMSO ที่ความเข้มข้น 10% 1 มิลลิลิตร ลงไป จากนั้นนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูว่าที่ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ทำให้สารละลายภายในหลอดไม่มีความขุ่นเกิดขึ้นให้ถือว่าเป็น

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) จากนั้นนำสารละลายจากหลอดทดลองที่ไม่มีการเจริญของเชื้อมาขีดลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร TSB แล้วนำไปบ่ม optimum temperature เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูว่าที่ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหลังจากนำมาขีดแล้วไม่มีเชื้อเจริญจะถือว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดนั้นเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MBC) ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้นที่ทดสอบ

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพไอระเหยของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร

ทำการทดสอบโดยวิธีการ pour plate เจือจางสารแขวนลอยของแบคทีเรียทดสอบให้ได้ความเข้มข้นเชื้อ $10^4$ cfu/ml ปิเปตเชื้อมาปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงจานเลี้ยงเชื้อขนาดเล็ก (5 มิลลิลิตร) เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ลงไป ปิดด้วยฝาที่มีกระดาษกรองผ่านการฆ่าเชื้อที่หยดด้วยน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 และ 10.0 µl /ml ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วพันด้วยพาราฟิล์มนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 15, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น ในแต่ละความเข้มข้นทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ

**3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด หรือน้ำมันหอมระเหยจากพืช ในการลดปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผักสลัด ก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว**

3.1 การทรีตสารทดสอบในสภาพแปลงปลูก

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองในหัวข้อ 1 และ 2 มาประมวลผล เพื่อให้ทราบส่วนของสารทดสอบ และความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแต่ละชนิด ตลอดจนแหล่งที่มาของผัก ที่ตรวจพบปริมาณจุลินทรีย์ที่ก่อโรคมากที่สุด มาทำทดสอบโดยการฉีดพ่นสาร[illegible]

3.2 การตรวจปริมาณเชื้อแบคทีเรีย

โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างผักในแปลงทดลองที่ทำการทรีตด้วยสารทดสอบ มาตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญตามวิธีการในข้อ 1.2 เปรียบเทียบกับตัวอย่างผักในแปลงเดียวกันที่ไม่ได้ทำการ ทรีตด้วยสารทดสอบ

3.3 การทดสอบในผักสลัดหลังการเก็บเกี่ยว

ทำการเตรียมสารสกัด หรือน้ำมันให้อยู่ในรูปของเหลว ตามความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพที่ได้จากข้อ 2 จากนั้นนำผักสลัดล้างทำความสะอาด และแช่ด้วยสารละลายของสารทดสอบดังกล่าว ทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ และระยะเวลาต่างๆ ตามกรรมวิธีที่จะกำหนด ซึ่งอาจจะต้องมีการปลูกเชื้อทดสอบลงไปด้วย จากนั้นทำการตรวจนับประชากรของแบคทีเรียในกลุ่มที่มีความสำคัญเปรียบเทียบกับ control