บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1.1 เชื้อ *Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis* และ *Bacillus anthracis*

3.1.1.2 เชื้อ*Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* และ *Listeria innocua*

3.1.1.3 เชื้อ *Salmonella* sp.

3.1.1.4 เชื้อ *Staphylococcus aureus*

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.2.1 Trypticase soy polymyxin broth (TSPB)

3.1.2.2 Trypticase soy sheep blood agar (with 0.6% yeast extract (TSAYE))

3.1.2.3 Manitol salt egg yolk polymyxin (MYP) agar

3.1.2.4 Enrichment broth (EB, with 0.1% sodium pyruvate)

3.1.2.5 Oxford agar (OXA)

3.1.2.6 Lactose broth (LB) เข้มข้นร้อยละ 0.5

3.1.2.7 Selenite cysteine broth (SCB)

3.1.2.8 Salmonella shigella agar (SSA)

3.1.2.9 Bismuth sulfite agar (BSA)

3.1.2.10 Xylose lysine desaxycholate (XLD) agar

3.1.2.11 Triple sugar iron (TSI) agar

3.1.2.12 Lysine iron agar (LIA)

3.1.2.13 Baird parker agar (BPA)

3.1.2.14 Nutrient broth (NB)

3.1.2.15 เปปโตน (peptone water) ร้อยละ 0.1

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารป้องกันความเย็นน้ำตาลซูโครส (sucrose)

3.2.2 Mannitol, Rhamnose และ xylose

3.2.3 สารละลาย Folin-Ciocalteu

3.2.4 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7.5%

3.2.5 สารละลายโซเดียมไนไตรต์ ความเข้มข้น 5%

3.2.6 สารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 10%

3.2.7 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์

3.2.8 สารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 80% และ สารละลายเมทานอล

3.2.9 สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.6 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

3.2.10 สารละลายโพแทสเซียมเฟอร์ริคไซยาไนด์ ความเข้มข้น 1%

3.2.11 สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ความเข้มข้น 10%

3.2.12 สารละลายเฟอร์ริคคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1%

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ

3.3.1 เครื่องชั่งไฟฟ้า

3.3.2 ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Larminar flow

3.3.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (Autoclave)

3.3.4 ตู้บ่มเชื้อ (Incubater)

3.3.5 อุปกรณ์เครื่องแก้ว เช่น หลอดทดลอง จานแก้ว และบีกเกอร์

3.3.6 ถุงพลาสติก แก้ว ช้อน

3.3.7 ตู้อบแห้งแบบลมร้อน (Hot air oven)

3.3.8 เครื่อง freeze-dry

3.3.9 Anaerobic jar

3.3.10 Gaspak jar

3.3.11 ถุงอะลูมิเนียม

3.3.12 ช้อนตักสารแสตนเลส

3.3.13 ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

3.3.14 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.4 วิธีดำเนินการทดลอง

3.4.1 การผลิตไอศกรีมมะม่วงหาวมะนาวโห่

ผลิตไอศกรีมตามวิธีการของ อัมพรศรี (2556) โดยคัดเลือกเฉพาะผลสุกของมะม่วงหาวมะนาวโห่ นำมาปั่นละเอียดและผสมกับน้ำในอัตราส่วนที่เท่ากัน นำมาผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยการต้ม และบ่มไอศกรีมที่อุณภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง และทิ้งไว้ให้แข็งตัวประมาณ 2-4 ชั่วโมง

3.4.2 การตรวจวิเคราะห์ *Bacillus cereus* ในอาหาร

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียรูปท่อน แกรมบวก สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ พบทั่วไปในดิน ฝุ่นละออง น้ำ และอาหาร เป็นเชื้อที่สร้างสารพิษได้หลายชนิด แต่มีเพียง 2 ชนิดคือ emetic enterotoxin และ diarrheagenic enterotoxin ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ

การตรวจวิเคราะห์ *Bacillus cereus* ในอาหาร

1. ในกรณีที่มีเชื้อน้อย ใช้วิธี Most Probable Number (MPN)
2. ในกรณีที่มีเชื้อมาก ใช้วิธี spread plate

1. วิธี Most Probable Number (MPN)

1.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม นำมาทำให้เจือจาง 1:10 , $1:10^2$ และ $1:10^3$ ด้วย phosphate buffer pH 7.2

1.2 นำตัวอย่างอาหารแต่ละระดับความเจือจางตามข้อ 1.1 (1:10 , $1:10^2$ และ $1:10^3$) ใส่ลงใน 10 มิลลิลิตรของ Trypticase soy polymyxin broth (TSPB)

1.3 streak เชื้อตามข้อ 1.2 บน Manitol salt egg yolk polymyxin (MYP) agar บ่มที่ 37°C 24 ชั่วโมง

1.4 เลือกโคโลนีที่สงสัย ซึ่งจะให้โคโลนีสีชมพู ขุ่น ทึบ รอบๆโคโลนี นำไปทดสอบ haemolysis บน Trypticase soy sheep blood agar

1.5 หลอดที่พบเชื้อ strong haemolysis นำไปเปิดตารางอ่านค่า MPN

2. วิธี Spread plate

2.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม นำมาทำเจือจาง 1:10 , $1:10^2$ และ $1:10^3$ ด้วย phosphate buffer pH 7.2

2.2 ปิเปตตัวอย่างอาหารในแต่ละระดับความเจือจางตามข้อ 1. ใส่ลงใน MYP agar ใช้ความเจือจางละ 2 plate plate ละ 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่ 37°C 48 ชั่วโมง

2.3 นับจำนวนโคโลนีที่สงสัย แล้วนำไปทดสอบ haemolysis

2.4 นำจำนวนโคโลนีที่ให้ strong haemolysis บวก ไปคำนวณหาค่า *B. cereus* ต่อกรัม ซึ่งจะเท่ากับ จำนวนโคโลนีที่ให้ haemolysis บวก × dilution factor × 10

3. วิธีการทดสอบ haemolysis

3.1 นำ plate ของ Trypticase soy sheep blood agar (TSBA) มาแบ่งเป็น 8 ส่วน (ช่อง) เท่า ๆ กัน

3.2 เขี่ยเชื้อมาตรฐาน *B. cereus* และ *B. thuringiensis* เพียงเล็กน้อย (ควรใช้เชื้อที่เตรียมใหม่ ๆ) แล้วแตะเบา ๆ ใน TSBA ตามข้อ 3.1 ให้อยู่ตรงข้ามกัน

3.3 เขี่ยเชื้อที่สงสัยว่าเป็น *B. cereus* เพียงเล็กน้อย แล้วแตะเบาๆ บน TSBA ตามส่วนที่เหลือจากข้อ 3.2

3.4 บ่มที่ 37°C 24 ชั่วโมง แล้วนำมาอ่านผลโดย

- *B. cereus* ให้ผล strong haemolysis
- *B. thuringiensis* ให้ผล weak haemolysis

- *B. anthracis* ให้ผล non haemolysis

3.4.3 การวิเคราะห์ *Listeria monocytogenes* ในอาหาร

ในปัจจุบัน *Listeria* แบ่งได้เป็น 7 species แต่มีเพียง species เดียวที่ก่อให้เกิดโรคในคนได้คือ *Listeria monocytogenes* เชื้อนี้เป็นแบคทีเรียรูปท่อน แกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ พบในดิน น้ำ และอาหาร เจริญได้ในที่เย็น (refrigerator temperature)

การตรวจวิเคราะห์ *Listeria monocytogenes* ในอาหาร

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ Enrichment broth (EB) ที่มี sodium pyruvate 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) 225 มิลลิลิตร บ่มที่ 30°C 6 ชั่วโมง
2. ใส่ selective agent
3. บ่มต่อที่ 30°C ให้ครบ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง
4. ใช้ loop แตะเชื้อจากข้อ 3 streak บน Oxford agar (OXA) (24 ชั่วโมง streak 1 ครั้ง และ 48 ชั่วโมง streak อีกครั้ง) บ่มที่ 37°C 48 ชั่วโมง
5. เลือกโคโลนีที่สงสัยบน OXA คือโคโลนีสีเขียมแกมน้ำตาลและมีโซนดำรอบๆ (brown green colonies with a black halo) มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บน trypticase soy agar ที่เติม 0.6% yeast extract (TSAYE) บ่มที่ 30°C 24-48 ชัวโมง
6. นำเชื้อมาทดสอบ
   - ❖ **Catalase** Listeria ทุก species ให้ผลบวก
   - ❖ **Motile** stab เชื้อลงบน trypticase soy broth ที่เติม 0.6% yeast extract (TSAYE) และ 0.2% agar บ่มที่ 25°C 2-7 วัน การเคลื่อนที่ของ Listeria ทุก species มีลักษณะเฉพาะเป็นรูปร่ม
   - ❖ **การใช้น้ำตาล** โดยนำเชื้อใส่ลงใน mannitol, rhamnose , xylose ที่มี TSBYE เป็นเบส บ่มที่ 37°C 24-48 ชั่วโมง อ่านผลเปรียบเทียบกับตารางที่ 1
   - ❖ **Haemolysis** stab เชื้อลงใน 5% sheep blood agar plate โดยมีเชื้อ *Listeria monocytogenes* , *L. ivanovii* และ *L. innocua* เป็น control บ่มที่ 37°C 48 ชั่วโมง อ่านผลเปรียบเทียบกับตารางที่ 1

3.4.4 การวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* sp. โดยวิธีของ A.O.A.C (2000)

วิธีการ Pre-enrichment

- ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกทนร้อน เติม Lactose broth เข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำของผสมที่ได้มาใส่ในขวดดูแรนที่ปลอดเชื้อ
- นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

วิธีการ Selective enrichment

1. ปิเปตตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร จากขั้นตอน Pre-enrichment ลงในอาหาร SCB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
2. นำบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

วิธีการเพาะเชื้อใน selective agar

1. Streak เชื้อจากขั้นตอน selective enrichment มาเพาะบน SSA BSA และ XLD agar
2. นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง
3. ตรวจสอบลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นดังนี้

   SSA: โคนีของเชื้อ *Salmonella* sp. จะไม่มีสี หรือสีชมพูอ่อน บางโคโลนีมีสีดำตรงกลาง

   BSA: โคโลนีของเชื้อ *Salmonella* sp. จะมีสีน้ำตาลเข้ม หรือสีดำ บางครั้งอาจมีโคโลนีที่สะท้อนแสง อาหารรอบๆ โคโลนีสีน้ำตาล

   XLD: โคโลนีของเชื้อ *Salmonella* sp. จะมีสีชมพู และบางโคโลนีมีสีดำตรงกลาง

วิธีการจำแนกและทดสอบทางชีวเคมี

1. เลือกโคโลนีที่มีลักษณะของ *Salmonella* sp. จาก SSA BSA และ XLD agar ถ่ายลงใน TSI agar และ LIA โดย streak ลงบนผิวหน้าของอาหาร (slant) และ stab จนถึงก้นหลอดทดลอง (butt)
2. นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง
3. ตรวจสอบลักษณะเฉพาะของเชื้อ *Salmonella* sp. ดังนี้

   TSI agar: จะมีสีแดงที่ Slant และมีสีเหลืองที่ butt อาจมีการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟต์ โดยอาหารจะมีสีดำที่ butt

LIA: อาหารจะมีสีม่วงทั่วหลอด และหากมีการสร้างก๊าวไฮโดรเจนซัลไฟต์ อาหารจะมีสีดำ

3.4.5 การวิเคราะห์หาเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยวิธีของ A.O.A.C (2000)

1. ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกทนร้อน เติมเปปโตนร้อยละ 0.1 จากขวดฝาเกลียวปริมาตร 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตัวอย่างอาหารที่ได้จะมีระดับความเจือจาง 10^{-1}
2. เจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีระดับความเจือจางเป็น 10^{-2} โดยใช้เปปโตนร้อยละ 0.1
3. ปิเปตสารละลายตัวอย่างอาหาร 0.1 มิลลิลิตร จากแต่ละระดับความเจือจางลงในจานอาหาร BPA
4. จุ่มแท่งแก้วสำหรับ spread ลงในแอลกอฮอล์ แล้วนำแท่งแก้วมาผ่านเปลวไฟถือให้เย็น เปิดฝาจานอาหาร ทำการกระจายตัว
5. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที กลับจานเพาะเชื้อ แล้วนำบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

6. ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* จะเรียบ นูน สีดำ และมี clear zone รอบโคโลนี
7. เลือกโคโลนีที่คาดว่าเป็น *Staphylococcus aureus* มาทดลองเขี่ยเชื้อลงในอาหาร NB และนำมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง
8. ปิเปตเชื้อจากข้อ 7 ใส่หลอดทดลองปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมพลาสมาของกระต่าย (rabbit plasma) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
9. นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ถ้าไม่เกิดการแข็งตัวของพลาสมา ทำการบ่มต่อไปจนครบ 24 ชั่วโมง ถ้าพลาสมาแข็งตัวแสดงว่าผลเป็นบวก

3.4.6 การตรวจสอบปริมาณของสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด (Total polyphenol content, TPC)

การตรวจสอบปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu ตามวิธีของ Itankar *et al*. (2011) โดยนำสารสกัด CCM, CCES, CCAS มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายสารสกัด 0.05 มิลลิลิตร เติม 2.5 มิลลิลิตร 10% สารละลาย Folin-Ciocalteu และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในน้ำกลั่น ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร นำสารละลายอุ่นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดเป็นมิลลิกรัมของ GAE ต่อกรัมสารสกัด โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 150, 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.4.7 การตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content, TFC)

การตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดตามวิธีของ Itankar *et al.* (2011) โดยนำสารสกัด CCM, CCES, CCAS มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายสารสกัด 0.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร เติม 5% สารละลายโซเดียมไนไตรต์ 75 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติม 10% สารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ 150 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติม 1 โมลาร์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเป็นมิลลิกรัมของ CE ต่อกรัมสารสกัด โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานเคทิชิน (Catechin) ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 150, 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.4.8 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

นำผลหนามแดงดิบและสุกที่บดละเอียดสกัดด้วย 80% เอทานอล อัตราส่วน 1:4 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน กรองแยกกาก นำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออก ได้สารสกัดหยาบนำไปทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

3.4.8.1 DPPH radical scavenging capacity assay

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ทดสอบโดยดัดแปลงจากวิธีของ Elmastas *et al.* (2007) โดยนำ 0.1 มิลลิโมลาร์ สารละลาย DPPH ในเมทานอล 1 มิลลิลิตร เติมในสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยใช้สารมาตรฐานบิวทิลเลทเตดไฮดรอกซีโทลูอีน (BHT) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระจากสูตร

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = 1 - \frac{[A_{sample} - A_{blank}]}{A_{control}} \times 100$$

3.4.8.2 ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ (Reducing Power)

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Reducing Power ดัดแปลงจากวิธีของ Amin and Razieh (2007) นำสารละลายสารสกัดความเข้มข้นต่าง 2.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.2 โมลาร์ โซเดียมฟอส เฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.6 ปริมาตร 2.5 มิลลิตร และ 1% สารละลายโพแทสเซียมเฟอร์ริคไซยาไนด์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน อุ่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติม 10% สารละลาย กรดไตรคลอโร อะซิติก ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำสารผสมปั่นเหวี่ยงที่ 650 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายใสส่วน บน 2.5 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน 2.5 มิลลิลิตร และ 0.1% สารละลายเฟอร์ริคคลอไรด์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร โดยใช้วิตามินอีเป็นตัวควบ คุมบวก (positive control) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ คำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์จากสูตร; $\%RP = (A_{sample} / 1.2) \times 100$

3.4.9. ประเมินผลการวิจัยทางสถิติ

ประเมินข้อมูลทางสถิติโดยการใช้แบบประเมินทางประสาทสัมผัส (Sensory Evaluation) แล้ววิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วยวิธี One-Way ANOVA และ Independent Sample Test, ($p < 0.05$).