บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. วัตถุดิบ ใช้ส่วนผิวเปลือกของพืชตระกูลส้มดังนี้

ตารางที่ 12 ชื่อของพืชตระกูลส้ม

Table 12. Citrus cultivars 's name.

Common name	Scienctific name
มะกรูด (kaffir lime)	*Citrus hystrix* DC.
มะนาว (lime)	*Citrus aurantifolia* Swingle
ส้มโอ (pomelo)	*Citrus maxima* Merr.
ส้มเช้ง (acidless orange)	*Citrus paradisi*
ส้มจี๊ด (round kumquat)	*Citrus japonica* Thunb
ส้มจุก (neck orange)	*Citrus reticulate* Blanco
ส้มโชกุน (chugun)	*Citrus reticulate* Blanco cv Chugun

2. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.1 *Staphylococcus aureus*

2.2 *Bacillus cereus*

2.3 *Salmonella* sp.

2.4 *Listeria monocytogenes*

2.5 *Escherichia coli* O157 : H7 DMST 12743

2.6 *Candida albicans*

2.7 *Saccharomyces cerevisiae* var. *sake* (มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)

2.8 *Aspergillus fumigatus* TISTR 3180

เชื้อแบคทีเรียและยีสต์ได้รับจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ส่วนเชื้อ *Escherichia coli* O157 : H7 DMST 12743 ได้จาก

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี และ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3180 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (MIRCEN)

3. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 13 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

Table 13. Chemical and culture media used in experiment.

Chemical and media	Company, Grade, Country
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Fisher scientific, Analyzed, United Kingdom
Ethyl acetate	Com.Grade, China
Sodium sulfate anhydrous	Merck, Analyzed, Germany
Potato Dextrose Broth (PDB)	Himedia, Analyzed, India
Potato Dextrose Agar (PDA)	Himedia, Analyzed, India
Nutrient Agar (NA)	Labscan, Analyzed, Thailand
Nutrient Broth (NB)	Labscan, Analyzed, Thailand
EMEM	Gibco, Analyzed, USA
Mueller Hinton Agar (MHA)	Himedia, Analyzed, India
Mueller Hinton Broth (MHB)	Himedia, Analyzed, India
Potato Dextrose Agar (PDA)	Himedia, Analyzed, India
Potato Dextrose Broth (PDB)	Himedia, Analyzed, India
Limonene	Fluka, Analyzed, United Kingdom
Citronellal	Fluka, Analyzed, United Kingdom
Tween 80	Labchem, Analyzed, Australia
Nitrogen gas	TIG, Com. Grade, Thailand
หางนม	Himedia, Analyzed, India
แป้งสาลี	บริษัทอุตสาหกรรมแป้งข้าวสาลีไทย จำกัด
น้ำมันปาล์ม	บริษัทลำสูง (ประเทศไทย) จำกัด

4. วัสดุและอุปกรณ์

ตารางที่ 14 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

Table 14. Material and equipment used in experiment.

Equipment	Company, Country
เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BP2100S	Mettier Toledo, USA
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP221S	Satorious, USA
เครื่องระเหยสุญญากาศ vacuum rotary evaporator ยี่ห้อ Büchi Rotavapor® รุ่น R-200/205	Büchi Labortechnik AG, Switzerland
เครื่อง GC-MS (HP 5890 GC-HP 5972 MSD)	Hewlett Packard, USA
ชุดกลั่นไอน้ำ	-
Vortex Mixer	Labnet, USA
Vial ขนาด 20 มิลลิลิตร	-
ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE 500	Schwabach, Germany
ตู้ถ่ายเชื้อ (Biological Safety Cabinet) ยี่ห้อ Hotpack (รุ่น 527042, 41, 62, 61 class II type A)	Scientific promotion, USA
ตู้อบแรงดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น SS-325	Tomy Seiko, Japan
ถาด 96 หลุม (Microtiter plate 96 flat bottom WI)	NUNC™, Denmark
Microplate reader รุ่น Powerwave X	Biotek, UK
พีเอชมิเตอร์ (pH meter) รุ่น Metter Toledo 320	Mettier Toledo, USA
ไมโครปิเปตขนาด 10-100 ไมโครลิตร	Labmate, USA
ไมโครปิเปตขนาด 1000ไมโครลิตร	Gilson, France
Multichanels pipet 20-200 ไมโครลิตร	Transferpette, USA
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น WB 14	Schwabach, Germany
Seperation funnel	Jain Scientific glass works, India
กล้องถ่ายภาพอิเล็กตรอนทรานสมิชชัน (TEM รุ่น JEM 2010)	JEOL Ltd., Japan
Hunter lab color meter : hunter lab รุ่น colorflex	Hunter associates Laboratory, INC Reston, Virginia

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดของพืชตระกูลส้ม

1.1 การเตรียมวัตถุดิบ

คัดเลือกพืชตระกูลส้มได้แก่ มะกรูด มะนาว ส้มโอ ส้มเช้ง ส้มจี๊ด ส้มจุก และส้มโชกุน การเก็บส้มอยู่ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงกรกฎาคม เลือกผิวส้มที่มีสีเขียวแก่ (มะนาว) และสีเขียวอมเหลือง (มะกรูด ส้มโอ ส้มโชกุน ส้มจุก ส้มเช้งและส้มจี๊ด) โดยการวัดสีด้วยเครื่อง Color meter : Hunter lab (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก) นำไปทดสอบยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่มฟอสเฟตและคาร์บาเมทด้วยน้ำยา GT-pesticide residual test kit (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก) นำวัตถุดิบที่คัดเลือกได้มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำ ผึ่งให้แห้ง ปอกเอาเฉพาะส่วนผิวแล้วนำไปสกัดตามข้อ 1.2.1-1.2.2 การใช้ผิวส้มชนิดสดเนื่องจากได้มีการทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* และ *E. coli* ของผิวส้มชนิดสดและแห้งพบว่ากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดจากผิวส้มชนิดสดจะให้กิจกรรมในการยับยั้งได้ดีกว่าแห้งดังแสดงในภาคผนวก ข

1.2 การสกัด

1.2.1. การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extractsion) นำผิวส้มจากข้อ 1.1 ตัวอย่างละ 500 กรัม ปั่นด้วยเครื่องบดแล้วเติมเอธิลอะซิเตต จำนวน 1 ลิตรปั่นรวมกันเป็นเวลา 20 นาที กรองสารที่สกัดได้ด้วยสำลี เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เติมเอธิลอะซิเตตจำนวน 1 ลิตร ลงในตัวอย่างผิวส้มอีกครั้ง โดยเขย่าที่ 130 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 8 ชั่วโมง จะได้สารสกัดหยาบ แล้วเติม Na_2SO_4 anhydrous เพื่อกำจัดน้ำออก นำสารสกัดมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลได้จากสูตรข้างล่าง เก็บสารสกัดภายใต้สภาวะที่มีการเติมก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ดัดแปรจาก Ponce *et al*., 2003)

1.2.2. การสกัดโดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ (hydrodistillation) นำผิวส้มหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำมากลั่นด้วยเครื่องกลั่นไอน้ำดังแสดงในภาพที่ 4 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้มาแยกชั้นน้ำออกโดยใช้กรวยแยก แล้วเติม Na_2SO_4 anhydrous เพื่อกำจัดน้ำออก ชั่งน้ำหนัก คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลได้จากสูตรข้างล่าง และเก็บภายใต้สภาวะที่มีการเติมก๊าซไนโตรเจนที่ 4 องศาเซลเซียส (ดัดแปรจาก Yadav *et al*., 2004) คำนวณหาปริมาณสารสกัดที่ได้จากสมการต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณสารสกัดที่ได้ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดแห้งที่ได้}}{\text{น้ำหนักสดของเปลือกส้มที่ใช้สกัด}} \times 100$$

ภาพที่ 4 เครื่องกลั่นไอน้ำ

Figure 4. Hydrodistillation equipment.

2. การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากผิวพืชตระกูลส้มโดยวิธี broth microdilution assay

2.1 การเตรียมจุลินทรีย์

เขี่ยเชื้อจากอาหารวุ้นแข็งเอียงที่เก็บใน stock มา 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB สำหรับแบคทีเรีย และ YM สำหรับยีสต์ จำนวน 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดที่เตรียมจากข้อ 1.2.1-1.2.2 โดยเจือจางเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร (ค่า OD ในภาคผนวก ก) ส่วนเชื้อราเตรียมโดยการเลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ โดยใช้น้ำที่ผสม tween 80 1 เปอร์เซ็นต์ปลอดเชื้อเทใส่จานเพาะเชื้อรา ใช้แท่งแก้วคนปลอดเชื้อขูดให้สปอร์ออกมาชะล้างกับน้ำ แล้วกรองผ่านกรวยแก้วที่มีสำลีปลอดเชื้อ เพื่อแยกเส้นใยออกจากสปอร์จะได้สารแขวนลอยสปอร์ นับจำนวนสปอร์โดยใช้ hemacytometer (ภาคผนวก ข) ปรับให้ได้ปริมาณสปอร์ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้อาหาร PDB เจือจาง

2.2 การเตรียมสปอร์ของ *B. cereus*

ละลาย manganese sulfate 3.08 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB 1 ลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเขี่ยเชื้อ *B. cereus* จากอาหารวุ้นแข็งเอียงที่

เก็บใน stock มา 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดตัวเซลล์ แล้วทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth microdilution assay ตามวิธีในข้อ 2.4 โดยมีปริมาณสปอร์สุดท้ายเป็น 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.3 การเตรียมสารสกัด

ชั่งสารสกัดผิวส้มจากข้อ 1.2.1-1.2.2 จำนวน 250 มิลลิกรัม ละลายใน Dimethylsulfoxide (DMSO : เป็นตัวทำละลายที่ดีใช้กันอย่างกว้างขวาง มีสมบัติเป็นตัวนำสารสกัดเพื่อทำปฏิกิริยาได้ดีและเพิ่มประสิทธิภาพในการละลาย) จำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นเป็น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มา 1 มิลลิลิตร เจือจางในอาหารเหลว MHB สำหรับแบคทีเรีย YM สำหรับยีสต์ และ PDB สำหรับราจำนวน 9 มิลลิลิตร จะได้สารที่มีความเข้มข้นเป็น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นของ DMSO เริ่มต้นเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีของสารบริสุทธิ์คือ limonene และ citronellal วิธีการเตรียมเช่นเดียวกัน

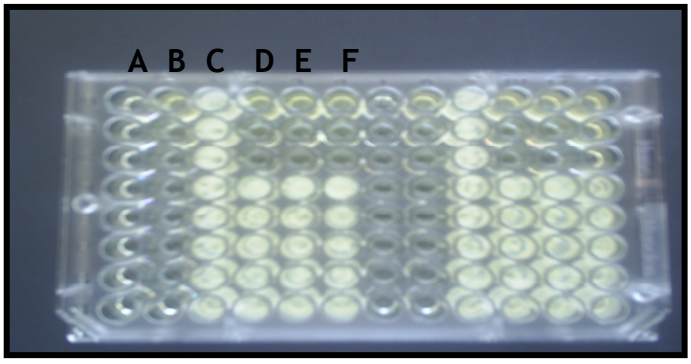
2.4 วิธีการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์

ทดสอบโดยวิธี broth microdilution assay (ดัดแปรจาก Lorian, 1980) ในถาดหลุม 96 หลุม ดังแสดงในภาพที่ 5 โดยแต่ละหลุมมีปริมาตรเท่ากับ 200 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดที่มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาอย่างละ 360 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมที่แถวแรก แล้วเจือจางแบบครั้งละสองเท่า (two–fold dilution) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB สำหรับแบคทีเรีย YM สำหรับยีสต์ และ PDB สำหรับรา ปริมาตร 180 ไมโครลิตรของทุกหลุม โดยดูดสารสกัดจากหลุมแรกปริมาณ 180 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมแถวที่สองแล้วผสมกัน โดยดูดขึ้นลง 5 ครั้ง จากนั้นดูดสารสกัดใส่ลงในหลุมต่อไปเรื่อย ๆ โดยหลุมสุดท้ายจะดูดปริมาตร 180 มิลลิลิตรทิ้ง ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, และ 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบที่เตรียมในข้อ 2.1 ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ซึ่งทำให้มีปริมาณจุลินทรีย์สุดท้ายเป็น 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร (ค่า OD ในภาคผนวก ก) ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเป็น 2.25, 1.13, 0.56, 0.28, 0.14 และ 0.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เป็น 0.9, 0.45, 0.23, 0.11, 0.06 และ 0.03 เปอร์เซ็นต์ (การทดสอบผลของ DMSO ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเจริญของจุลินทรีย์แสดงในภาคผนวก ข) มีชุดควบคุม (control) เป็น positive control ซึ่งเป็นอาหารเหลวที่ไม่เติมสารสกัดแต่เติมเชื้อจุลินทรีย์และ negative control เป็นอาหารที่มีสารสกัดแต่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ วัดการเจริญของจุลินทรีย์โดยวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48 ทำการทดสอบเพื่อหาค่า MBC (Minimum Bactericidal Concentration) กรณี

แบคทีเรีย และ MFC (Minimum Fugicidal Concentration) กรณียีสต์และราโดยนำชุดการทดลองที่ไม่พบการเติบโตของจุลินทรีย์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA YMA และ PDA สำหรับแบคทีเรีย ยีสต์ และราตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 2 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ

2.5 การอ่านผล

อ่านค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากผิวส้มที่ให้ผลยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียทดสอบที่ 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อราและยีสต์ที่ 48 ชั่วโมง โดยค่าที่มีระดับความขุ่นไม่แตกต่างไปจากชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์ อ่านค่า MBC /MFC ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ไม่พบการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการนำเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ ที่ให้ค่า MIC มา streak ในอาหาร สังเกตเชื้อเติบโตหรือไม่ สำหรับเชื้อราจะนำหลุมที่ให้ค่า MIC มา spread ในอาหาร สังเกตเชื้อเติบโตหรือไม่เช่นกัน หากเชื้อไม่เติบโตแสดงว่าค่า MIC เท่ากันกับค่า MBC หรือ MFC คัดเลือกสารสกัดพืชตระกูลส้มที่มีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยพิจารณาสารสกัดที่มีกิจกรรมการยับยั้งในช่วงกว้างและมีค่า MIC ต่ำสุด



ภาพที่ 5 การยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth microdilution assay

Figure 5. Antimicrobial by broth microdilution assay.

เมื่อ A = control (อาหารเลี้ยงเชื้อ)

B = negative control (อาหารเลี้ยงเชื้อ + สารสกัด)

C = positive control (อาหารเลี้ยงเชื้อ + เชื้อ)

D – F = ตัวอย่าง (อาหารเลี้ยงเชื้อ+ สารสกัด+ เชื้อ)

3. วิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากผิวพืชตระกูลส้ม

นำสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มที่ให้ผลการยับยั้งดีที่สุดวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารเชิงคุณภาพด้วยเครื่อง GC-MS โดยใช้คอลัมน์แบบ Rtx-5MS fuse silica gel (Restex, USA) หนา 0.25 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 25 เมตร ภายใต้สภาวะการวิเคราะห์ดังนี้ อุณหภูมิของ injector เท่ากับ 240 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มจาก 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพิ่มขึ้นเป็น 220 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 4 องศาเซลเซียสต่อนาที และเพิ่มเป็น 300 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงที่ที่ 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ส่วนอุณหภูมิของ detector เท่ากับ 300 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีอัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม เมื่อ GC-MS พร้อมสำหรับการวิเคราะห์ ฉีดสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ที่ injector port (Atilep, USA) และสแกนด้วยระบบสแกนอัตโนมัติ (ดัดแปรจาก Agnihotri *et al.,* 2004) ซึ่งจะวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดแต่ละชนิดจาก retention time ของพีค พื้นที่ใต้พีคและเปรียบเทียบกับ mass spectra กับฐานข้อมูลใน Wiley 275. L (Hewlett Packard company Americans, technical center 20, terimeter summit, BCW, Atlanta, GA 30319.) การวิเคราะห์ในเชิงปริมาณของสารสกัดใช้สภาวะเช่นเดียวกับวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพียงแต่ว่าการวิเคราะห์ในเชิงปริมาณเทียบกับสารมาตรฐานที่ต้องการทดสอบ

4. ผลของพีเอช อุณหภูมิ และองค์ประกอบในอาหารที่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากผิวส้มที่คัดเลือกได้ด้วยวิธี broth microdilution assay

4.1 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดที่คัดเลือก

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB YM และ PDB ด้วยซิเตตฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ คือ 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7 และ 7.5 นำมาเจือจางกับสารสกัดผิวส้มที่ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์จากข้อ 2.5 โดยใช้สัดส่วนเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.4 จากนั้นเติมจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบลงไปโดยมีปริมาณเชื้อสุดท้ายเป็น 10^5CFU ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง อ่านค่า MIC และค่า MBC/MFC (ดัดแปรจาก Stonsaovapak *et al*., 2000)

4.2 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดที่คัดเลือก

เตรียมสารสกัดผิวส้มที่คัดเลือกได้เหมือนวิธีในข้อ 2.5 ให้มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 72, 100 และ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เมื่อครบเวลาจุ่มในน้ำเย็นทันที นำสารสกัดที่ผ่านความร้อนและที่ยังไม่ผ่านความร้อน (ชุดควบคุม) วัดการเปลี่ยนแปลงของค่า MIC และ MBC/MFC

4.3 ผลขององค์ประกอบในอาหารต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดที่คัดเลือก

ทำการทดสอบสารสกัดผิวส้มที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต โดยเติมหางนม น้ำมันพืช และแป้งสาลีตามลำดับ ในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB สำหรับทดสอบกับแบคทีเรีย YM สำหรับทดสอบกับยีสต์ และ PDB สำหรับทดสอบกับรา นำสารสกัดที่มีและไม่มีองค์ประกอบของอาหาร (ชุดควบคุม) วัดการเปลี่ยนแปลงของค่า MIC และ MBC/MFC

5. ผลของสารสกัดจากผิวส้มต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

นำสารสกัดผิวส้มจากการคัดเลือกได้ในข้อ 2.5 มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ต่อ *S. aureus*, *B. cereus, Salmonella* sp., *L. monocytogenes*, *E. coli* 0157 : H7 DMST 12743, *C. albicans, S. cerevisiae* var. *sake* และ *A. fumigatus* TISTR 3180 ในสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการศึกษาในข้อ 4.1- 4.3 โดยวิธี broth microdilution assay ในข้อ 2.4

6. ผลของสารสกัดผิวส้มต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์

เตรียมสารสกัดจากผิวส้มที่คัดเลือกได้ในข้อ 2.5 ให้มีระดับความเข้มข้น 2.5, 1.25, 0.63 และ 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 4.5 มิลลิลิตร ใน MHB สำหรับแบคทีเรีย YM สำหรับยีสต์ และ PDB สำหรับรา เติมเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.5 ปริมาณเป็น 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.25, 1.13, 0.56 และ 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณเชื้อสุดท้ายเป็น10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง นับจำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตโดยวิธี plate count ในอาหาร MHA YMA และ PDA สำหรับแบคทีเรีย ยีสต์และรา ตามลำดับ(ดัดแปลงจาก Moreira *et al*., 2005)

7. ศึกษาเป้าหมายการทำลายของสารสกัดต่อเซลล์จุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค TEM

การเตรียมตัวอย่างของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.5 โดยนำ MIC ของสารสกัดจากผิวส้มที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จากการทดลองนี้ได้เตรียมเซลล์ *B. cereus* โดยนำสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูด และ citronellal ที่มีความเข้มข้น 0.56 และ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 270 และ 119 มิลลิลิตร ตามลำดับ เติม *B. cereus* (10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร) จำนวน 30 มิลลิลิตร ปริมาตรรวม 300 มิลลิลิตร ในอาหาร MHB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารมาเหวี่ยงแยกที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อแยกเซลล์ออก

แล้วเก็บเซลล์ใน 2.5 เปอร์เซ็นต์ glutaraldehyde เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วย 0.1 โมล phosphate buffer นำตัวอย่างทำ TEM (ดัดแปรจาก Ngapo *et al*., 1996) รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก

8. ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากผิวส้มต่อเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity assay)

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดลองมี 4 ชนิดคือเซลล์มะเร็งลำไส้ (colon cancer, HT-29) เซลล์มะเร็งช่องปาก (oral cavity cancer, KB) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer, Hela) และเซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer, MCF-7) นำมาเลี้ยงในอาหาร Eagle 's Minimal Essential Medium (EMEM) เป็นเวลา 3 วัน เตรียมสารแขวนลอยเซลล์เพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับเซลล์ที่รอดชีวิตด้วย hemacytometer (trypan blue exclusion) นำเซลล์เลี้ยงในถาดหลุม 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร (2,500 -3,000 เซลล์ต่อหลุม) เลี้ยงใน CO_2 incubator 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะเป็น monolayer ใส่สารสกัดผิวส้มที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมหลุมละ 100 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชุดควบคุมคือหลุมที่มีเซลล์มะเร็งแต่ไม่ได้มีการเติมสารสกัดลงไป จากนั้นนำมาเลี้ยงใน CO_2 incubator เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Sulphorhodamine B assay (SRB assay) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยใช้ 40 เปอร์เซ็นต์ trichloroacetic acid (TCA) ที่ละลายด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ acetic acid ลงในถาดหลุม 96 หลุมเพื่อตรึงเซลล์ไว้ วางถาดหลุม 96 หลุมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วยน้ำกลั่นและย้อมสีเซลล์ด้วย SRB stain เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น วางถาดหลุม 96 หลุมให้แห้งแล้วเติมสารละลาย 10 มิลลิโมล Tris-Base หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าถาดหลุม 96 หลุมด้วยเครื่องเขย่า 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร (Skehan *et al*., 1990) แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเซลล์มะเร็งจากสูตรข้างล่าง โดยพิจารณาสารที่ทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ >80 เปอร์เซ็นต์

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{\text{OD ชุดควบคุม} - \text{OD ที่วัดได้}}{\text{OD ชุดควบคุม}} \times 100$$