บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. แบคทีเรียทดสอบ ใช้เชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด ในการทดลองนี้ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Tryptic soy agar slant บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บเชื้อในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และถ่ายเชื้อใหม่ทุก 1 เดือน จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลอง
2. น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบ ใช้น้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพรา (*Ocimum sanctum* Linn.; Holy Basil) ซึ่งได้มาจากการสกัดด้วยไอน้ำ ซื้อจากบริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด จังหวัดพระนครศรีอยุธยา
3. ผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ ไส้กรอกหมู ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากบริษัท ซีพีอินเตอร์ฟู้ด จำกัด มีส่วนผสมสำคัญคือ เนื้อหมู เกลือ น้ำตาลและเครื่องเทศ

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทำวิจัย

1. Tween 80 (Labchem, Australia)
2. Mueller Hinton broth (Merck, Germany)
3. Peptone (Merck, Germany)
4. Trypticase soy broth (Merck, Germany)
5. Mannitol salt agar (Merck, Germany)
6. Salmonella Shigella Agar (Merck, Germany)
7. Standard Plate Count Agar (Merck, Germany)
8. Chitosan (degree of deacetylation: 96.85%; Taming Enterprises Co., Ltd.)
9. Glacial acetic acid (บริษัทศรีจันทร์สหโอสถ จำกัด)

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Model 1245 PC: SHEL LAB, USA)
2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (KT 30L: ALP, Japan)
3. เครื่องตีป่นอาหาร (Stomacher 400: SEWARD, USA)
4. ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ (Model 1535: SHELDON, USA)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน (Biofuge stratos, Germany)
6. เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO ; Model PE 503-s)

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างสารละลายแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยง *S. aureus* ATCC 25923 และ *Sal. typhimurium* ATCC 14028 ในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (Merck, Germany) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการล้างทำความสะอาดเซลล์ด้วยสารละลายเปปโตน 0.1% 3 ครั้ง ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 30 นาที แล้ววินของเหลวส่วนบนทิ้งไป นำเซลล์ที่ได้ไปปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยสารละลายเปปโตน 0.1% ให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 1 x 10^6 CFU/ml

2. ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเจือจางน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพราในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MH (Mueller Hinton broth) เนื่องจากเป็นอาหารที่นิยมใช้ทดสอบความไวของเชื้อ เพราะไม่มีสารรบกวนการออกฤทธิ์ของสารทดสอบและยอมให้เชื้อทุกชนิดเจริญ ให้มีความเข้มข้นเป็นร้อยละ 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 โดยปริมาตร โดยใช้ Tween 80 ร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ จากนั้นทำการปลูกถ่ายเชื้อลงในอาหารแต่ละหลอดโดยให้มีปริมาณเชื้อตั้งต้นประมาณ 10^6 CFU/ml นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อเหลือรอดที่เวลา 0, 1, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยเทคนิคการสเปรดเพลทบนอาหารเฉพาะ โดยใช้อาหาร Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA, Merck, Germany) สำหรับ *S. aureus* ATCC 25923 และ Salmonella Shigella Agar (SSA, Merck, Germany) สำหรับ *Sal. typhimurium* ATCC 14028 ตามลำดับ นำผลที่ได้มาสร้างกราฟการรอดชีวิตของเชื้อแต่ละชนิด ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยต่างๆ

3. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (minimum inhibitory concentration) ของน้ำหอมระเหยจากใบกะเพราต่อเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี broth dilution test (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000)

MIC (minimum inhibitory concentration) **หรือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง**การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ หมายถึง ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยซึ่งสามารถลดจำนวน จุลินทรีย์ลงได้ 90 % (Moreira et al., 2005) ในการทดลองนี้ ทำการหาค่า MIC โดยใช้วิธี broth dilution โดยทำการเจือจางน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพรา ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MH ให้มีความเข้มข้นเป็นร้อยละ 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 โดยปริมาตร โดยใช้ Tween80 ร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ จากนั้นทำการปลูกถ่ายเชื้อลงในอาหารแต่ละหลอดให้ได้ปริมาณเชื้อตั้งต้นประมาณ 10^6 CFU/ml นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยเทคนิคการสเปรดเพลทบนอาหารเฉพาะ โดยใช้อาหาร MSA สำหรับ *S. aureus* ATCC 25923 และอาหาร SSA สำหรับ *Sal. typhimurium* ATCC 14028 ค่า MIC คำนวณได้จากค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ลดจำนวนลงได้ 90% เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง และนำค่า MIC ที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

4. ผลของการใช้ไคโตซานร่วมกับน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพราต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในไส้กรอก

นำค่า MIC ที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.3 มาใช้ในการศึกษาผลของการใช้ไคโตซานร่วมกับน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพรา โดยเตรียมสารละลายไคโตซานร้อยละ 1.0 โดยปริมาตรในกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร ผสมกับน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพราซึ่งมีความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองข้างต้น แล้วนำไส้กรอกตัวอย่างละ 10 กรัม ไปทำให้ปลอดเชื้อโดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) ความยาวคลื่น 260 nm เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไส้กรอกจุ่มลงในสารละลายแขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมไว้ (*S. aureus* ATCC 25923 และ *Sal. Typhimurium* ATCC 14028) เป็นเวลา 2 นาที โดยทำให้มีปริมาณเชื้อตั้งต้นในผลิตภัณฑ์ประมาณ 1 x 10^5 CFU/g ทำให้แห้งภายในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปจุ่มในสารละลายไคโตซานและน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพราที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็นเวลา 3 นาที ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องในตู้ปลอดเชื้อประมาณ 30 นาที แล้วบรรจุในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างไส้กรอกจะถูกนำมาวิเคราะห์ปริมาณ *S. aureus* ATCC 25923 และ *Sal. typhimurium* ATCC 14028 ทุก 3 วัน เป็นเวลา 21 วัน โดยนำไส้กรอก 10 กรัม บรรจุใน stomacher bag เติมสารละลายเปปโตน 0.1% 90 มิลลิลิตร นำไปตีป่นด้วย

เครื่อง stomacher (stomacher 400: SEWARD, USA) ด้วยความเร็วปานกลางเป็นเวลา 30 วินาที นำของเหลวที่ได้ไปนับหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยเจือจางตัวอย่างอาหารตามลำดับ (serial dilution) ในสารละลายเปปโตน 0.1% แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณ *S. aureus* ATCC 25923 และ *Sal. typhimurium* ATCC 14028 โดยเทคนิคการสเปรดเพลทบนอาหาร MSA และ SSA ตามลำดับ นำเพลทที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวนโคโลนีด้วยเครื่องนับโคโลนี รายงานผลเป็น CFU/g

5. การศึกษาอายุการเก็บรักษาของไส้กรอก

ดัชนีที่ใช้ในการวิเคราะห์อายุการเก็บรักษาของไส้กรอก ได้แก่ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และ Psychrotrophic plate count ตัวอย่างไส้กรอกซึ่งจุ่มด้วยไคโตซานร้อยละ 1 โดยปริมาตร ร่วมกับน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพราที่มีความเข้มข้นเหมาะสม ตัวอย่างควบคุมประกอบด้วยตัวอย่างซึ่งจุ่มด้วยกรดอะซิติกร้อยละ 2.0 โดยปริมาตร(+) และตัวอย่างไส้กรอกที่ไม่จุ่มสารใดเลย (-) จะถูกนำมาวิเคราะห์ทุก 5 วัน ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 15 วัน หรือจนกว่าผลิตภัณฑ์จะเน่าเสีย โดยมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดมากกว่า 10^4 CFU/ml ; มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน) โดยนำไส้กรอกขนาด 10 กรัม บรรจุใน stomacher bag เติม 0.1% peptone water 90 มิลลิลิตร นำไปตีด้วยเครื่อง stomacher ด้วยความเร็วปานกลางเป็นเวลา 30 วินาที นำของเหลวที่ได้ไปศึกษาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยเจือจางตัวอย่างอาหารตามลำดับ (serial dilution) ในสารละลายเปบโตน 0.1% แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยการเทเพลทด้วยอาหาร standard plate count agar (Merck, Germany) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สำหรับหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และบ่มที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน สำหรับ psychrotrophic plate count จากนั้นตรวจนับจำนวนโคโลนีด้วยเครื่องนับโคโลนี รายงานผลเป็น CFU/g

6. การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส

ตัวอย่างไส้กรอกซึ่งจุ่มด้วยไคโตซานร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร ร่วมกับน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพราที่มีความเข้มข้นเหมาะสม ตัวอย่างควบคุมบวกซึ่งจุ่มด้วยกรดอะซิติกร้อยละ 2.0 โดยปริมาตร และตัวอย่างควบคุมลบที่ไม่จุ่มสารใดเลย แล้วจัดวางไส้กรอกในจานนึ่งในลังถึง จับเวลาขณะน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำมาทดสอบคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ทดสอบชิม 50 คน ประเมินคุณภาพเกี่ยวกับ สี กลิ่น รสชาติ ลักษณะเนื้อสัมผัส และการยอมรับรวมในไส้กรอก ด้วยสเกลความชอบ (Hedonic scale) 9 ระดับ วางแผนการทดลองแบบ Randomized completely block design (RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี

Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรมสำเร็จรูป

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการประมวลผลการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

สถานที่ทำการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

มีนาคม 2550 – พฤศจิกายน 2551