รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยหลัก
นวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจ

โครงการวิจัยย่อย
เรื่อง
ประสิทธิภาพของสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม (Punica granatum Linn.)

An Efficiency of Antimicrobial activity from punica (Punica granatum Linn.) peel extracts.

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ (หัวหน้าโครงการ)
รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ดันตระเธียร
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยพัฒนา

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณอย่างสูงต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยในโครงการนี้ ขอบคุณหัวหน้าโครงการวิจัยหลัก โครงการนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ก๊กผล ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ตลอดการวิจัย ขอบคุณคุณบุปผา ไชยนอก สวนเทพพิทักษ์ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเปลือกผลทับทิมเพื่อใช้ในการวิจัย ขอบคุณเจ้าหน้าที่คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัย ขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือเรื่องการใช้เครื่องมือวิเคราะห์แก่ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมพันธุ์พื้นเมือง พันธุ์จากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน พันธุ์แสงตะวันและพันธุ์ศรีปัญญา ด้วยน้ำและเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ พบว่าสารสกัดเปลือกผลทับทิม ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ให้ปริมาณสารสกัดและการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ โดยทับทิมพันธุ์พื้นเมืองให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด สารสกัดสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคส่วนใหญ่ที่ใช้ทดสอบได้ทุกสายพันธุ์ โดยยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 และ *P. fluorescens* TISTR 385 สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมพันธุ์แสงตะวันออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีกว่าพันธุ์พื้นเมือง พันธุ์จากสาธารณรัฐประชาชนจีน และพันธุ์ศรีปัญญา ส่วนพันธุ์จากสาธารณรัฐประชาชนจีน ยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้น้อยกว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมพันธุ์อื่นและสารสกัดด้วยน้ำไม่สามารถยับยั้ง *Salmonella enteritidis* DMST 17368 ได้

คำสำคัญ : เปลือกผลทับทิม , แบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

Abstract

The purpose of this study was to explore the anti-foodborne pathogenic bacteria activity of the extracts from peel of 4 pomegranate varieties; native, commercial variety from China, Saeng-Ta-Wan and Sripanya. The peel was extracted with water and 95% ethanol as solvents. It was found that ethanol extracts of all variety exhibited better anti-microbial activities than water extracts. The ethanol extracts and most extracts from water had ability to inhibit all 10 tested pathogenic bacteria which *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P was the most sensitive, while *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 and *P. fluorescens* TISTR 385 were respective less sensitive. It was found that extracts from Saeng-Ta-Wan showed better anti-microbial activities than other extracts in most of tested microorganisms. The extracts of commercial variety from China showed least anti-microbial activity on tested microorganisms and no inhibitory effect on *Salmonella enteritidis* DMST 17368.

Key words: pomegranate (*Punica. granatum* Linn) pericarp, Foodborne pathogenic bacteria

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	3
สารบัญตาราง	5
สารบัญรูป	6
คำนำ	7
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
วัตถุประสงค์การวิจัย	14
วิธีดำเนินการวิจัย	14
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	19
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	30
เอกสารอ้างอิง	31

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความสามารถในการออกฤทธิยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของสารสกัดเปลือกผลทับทิมพันธุ์ต่างกัน ด้วยวิธี paper-disc diffusion (ค่าเฉลี่ย ± SD) (n = 6)	22
2	ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมพันธุ์ต่างกัน ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์	26
3	ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมพันธุ์ต่างกัน ด้วยน้ำกลั่น	27
4	ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากเปลือกทับทิมพันธุ์ต่างกัน ด้วยการตีปั่นกับน้ำกลั่นและกรองผ่านแผ่นกรองที่มีรู ขนาด 0.45 ไมครอน	28

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

รูปที่ 1 ปริมาณสารที่สกัดได้จากเปลือกผลทับทิมพันธุ์ต่างกัน ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ และ น้ำ 2 วิธี (ค่าเฉลี่ย ± SD) (n = 6) 19

รูปที่ 2 ฤทธิ์การต้าน *S. aureus* ATCC 6538P ของสารสกัดเปลือกผลทับทิม ที่สกัดด้วยวิธีต่างกัน 24

รูปที่ 3 ฤทธิ์การต้าน *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 ของสารสกัด เปลือกผล ทับทิม ที่รสกัดด้วยวิธีต่างกัน 25

คำนำ

ความปลอดภัยของอาหารเป็นเรื่องสำคัญที่ทุกคนให้ความสนใจ ในอุตสาหกรรมอาหาร การประกันความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารสุดท้ายเริ่มตั้งแต่ขั้นตอนการตรวจสอบและควบคุมวัตถุดิบ กระบวนการผลิต ตลอดจนการบรรจุผลิตภัณฑ์ และการเก็บผลิตภัณฑ์อาหารก่อนส่งถึงมือผู้บริโภค นอกเหนือจากการปฏิบัติตามหลักเกณฑ์การปฏิบัติที่ดี (Good Manufacturing Practice; GMP) และการมีระบบวิเคราะห์อันตรายและควบคุมจุดวิกฤต (Hazard Analysis and Critical Control Point; HACCP) ในการผลิตอาหาร การใช้สารต้านแบคทีเรียยังเป็นวิธีที่ผู้ผลิตจำเป็นต้องใช้เพื่อป้องกันอันตรายที่อาจเกิดแก่ผู้บริโภค หากเกิดเหตุสุดวิสัยที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการผลิต และเพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรียในอาหารที่อยู่ระหว่างการรอจำหน่าย การใช้สารต้านการเจริญของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการประกันความปลอดภัยของอาหาร สารที่ใช้ต้านการเจริญของแบคทีเรียในอาหารและผลิตภัณฑ์อื่นๆ ซึ่งโดยทั่วไปเป็นสารสังเคราะห์ในกลุ่มต่างๆ เช่น อนุพันธ์ของกรดอินทรีย์ และเกลือของกรดอินทรีย์ซึ่งหลายๆ ชนิด มีรายงานว่าสามารถสะสมในร่างกายและก่อเกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้นหากมีการพัฒนาสารต้านแบคทีเรียที่สกัดได้จากแหล่งธรรมชาติโดยเฉพาะจากพืชมาใช้ทดแทนสารต้านแบคทีเรียสังเคราะห์เหล่านั้นก็จะเป็นทางออกหนึ่งที่จะทำให้การใช้สารต้านแบคทีเรียในอาหารมีความปลอดภัยมากขึ้น

มีรายงานว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมสามารถนำไปใช้ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรครวมถึงใช้สรรพคุณทางยาในการรักษาโรคติดเชื้อต่าง ๆ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกทับทิมในการต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร ซึ่งจะสามารถใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกสารสกัดที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารต้านแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป

จากแนวทางดังกล่าวงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่หาได้ในประเทศไทย โดยศึกษาการสกัดสารจากเปลือกทับทิมด้วยตัวทำละลายต่างๆ เพื่อให้ได้ crude extract และสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วน และทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แบคทีเรียก่อโรคเกือบทุกชนิดสามารถปนเปื้อนและอยู่รอดในอาหารซึ่งจะส่งผลให้เกิดความเสี่ยงในการก่อโรคต่อผู้ที่บริโภคอาหารนั้น นอกจากนี้ ผู้บริโภคยังมีความต้องการบริโภคอาหารที่มีรสชาติและเนื้อสัมผัสที่ใกล้เคียงกับของสด พร้อมทั้งยังคงคุณค่าของสารอาหารต่างๆ ทำให้มีการจำกัดการใช้ความร้อนในกระบวนการแปรรูปอาหาร เนื่องจากมีผลเสียต่อคุณค่าของสารอาหารและลักษณะเนื้อสัมผัส ดังนั้นจึงต้องมีการใช้วิธีการอื่นร่วมด้วยเพื่อป้องกันการเสียของผลิตภัณฑ์อาหารเนื่องจากแบคทีเรีย และทำลายแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร ผลิตภัณฑ์อาหารพร้อมรับประทานหลายชนิดที่ยังเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีแม้จะเก็บไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ เช่น ในตู้เย็นซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 4-7°C. แบคทีเรียเหล่านี้ได้แก่

- *Staphylococcus aureus* พบมากในเนื้อสัตว์ แฮม มันฝรั่ง สลัดไข่ แซนด์วิช ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เป็นแบคทีเรียที่สร้างสารพิษทิ้งไว้ในอาหาร โดยกระบวนการหุงต้มหรืออุ่นอาหารไม่สามารถกำจัดสารพิษนี้ได้
- *E. coli* พบมากในผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ เป็นแบคทีเรียสำคัญที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้สุขลักษณะของกระบวนการผลิตอาหาร ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ
- *Salmonella spp.* ส่วนใหญ่จะพบในไข่ที่ปรุงไม่สุกหรือเนื้อสัตว์ที่ปรุงไม่สุก หรือน้ำส้มคั้นที่ใส่ขวดเอาไว้โดยไม่ได้ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ ทำให้เกิดโรคท้องร่วง บางสายพันธุ์ เช่น *Salmonella Typhimurium* ทำให้เกิดโรคไทฟอยด์
- *Shigella spp.* เป็นแบคทีเรียกลุ่มเดียวกับ *Salmonella* ส่วนใหญ่มักจะพบในผัก ผลไม้ ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ
- *Bacillus cereus* เป็นแบคทีเรียสามารถสร้างสปอร์ที่ทนความร้อนสูงและสร้างสารพิษทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษมักจะพบในอาหารพวกแป้งและน้ำตาล

การใช้สารสกัดจากพืชต้านการเจริญของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหาร

การใช้สารต้านการเจริญของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการประกันความปลอดภัยของอาหาร สารที่ใช้ต้านการเจริญของแบคทีเรียในอาหารและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ โดยทั่วไปนั้นเป็นสารสังเคราะห์ในกลุ่มต่างๆ เช่น อนุพันธ์ของกรดอินทรีย์และเกลือของกรดอินทรีย์ ซึ่งหลาย ๆ ชนิดนั้นมีรายงานว่าสามารถสะสมในร่างกายและก่อเกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้นหากมีการพัฒนาสารต้านแบคทีเรียที่สกัดได้จากแหล่งธรรมชาติโดยเฉพาะจากพืชมาใช้

ทดแทนสารต้านแบคทีเรียสังเคราะห์เหล่านั้นก็จะเป็นทางออกหนึ่งที่จะทำให้การใช้สารต้านแบคทีเรียในอาหารมีความปลอดภัยมากขึ้น

สมบัติ การก่อโรคและแหล่งของแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

Salmonella เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ ขนาดของเซลล์ประมาณ 0.5-1.3 ไมครอน สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีอากาศหรือไม่มีอากาศ (Facultative anaerobe) สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 37°C และสามารถอยู่รอดได้ในช่วงอุณหภูมิ 5-47 °C เป็นแบคทีเรียที่พบในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลือดอุ่น พบในอาหารที่มีการปนเปื้อนของอุจจาระของผู้ป่วยหรือสัตว์ที่เป็นโรค หรือมีผู้ปฏิบัติงานในการผลิตอาหารเป็นพาหะ เชื้อเข้าสู่ร่างกายโดยการกินอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ โดยที่อาหารนั้นไม่มีการหุงต้มให้สุก หรืออาหารที่ผ่านกระบวนการผลิตที่ไม่มีระบบการสุขาภิบาลที่ดี อาหารที่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้โดยส่วนใหญ่คือ นมดิบ เนื้อสัตว์ ไข่ โดยเฉพาะเนื้อสัตว์ปีก และผลิตภัณฑ์จากสัตว์เหล่านี้ โรคที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดนี้เรียกว่า ซาลโมเนลโลซิส (Salmonellosis) เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายจะมีระยะฟักตัว 6 - 72 ชั่วโมง โดยทั่วไปประมาณ 12 - 36 ชั่วโมง จึงริ่มแสดงอาการของโรค เริ่มด้วยอาการปวดศีรษะ ปวดท้อง ท้องเดิน คลื่นไส้ และบางครั้งมีอาเจียนร่วมด้วย ภาวะการขาดน้ำอาจพบรุนแรงในเด็กทารก อย่างไรก็ตาม Salmonella มีความหลากหลาย โดยระดับความแตกต่างที่เรียกว่าซีโรไทป์ (serotypes) แต่ละซีโรไทป์จะก่อให้เกิดโรคทั้งในสัตว์และคนต่าง ๆ กัน ส่วนใหญ่เป็น S. *Enteritidis* และ *S. Typhimurium* ซึ่งชนิดหลังนี้ทำให้เกิดโรคไทฟอยด์ ซึ่งเป็นโรคที่มีอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงพร้อมกับการมีไข้

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ดีในภาวะมีอากาศ (aerobe) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 37°C และ สามารถอยู่รอดได้ในช่วงอุณหภูมิ 7-50°C เป็นแบคทีเรียที่พบในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลือดอุ่น จึงพบในอาหารที่มีการปนเปื้อนของอุจจาระของผู้ป่วยหรือสัตว์ที่เป็นโรค หรือมีผู้ปฏิบัติงานในการผลิตอาหารเป็นพาหะ เชื้อเข้าสู่ร่างกายโดยการกินอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ โดยที่อาหารนั้นไม่มีการปรุงให้สุก หรืออาหารที่ผ่านกระบวนการผลิตที่ไม่มีระบบการสุขาภิบาลที่ดี อาหารที่มีรายงานการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้ ส่วนใหญ่คือผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ นม น้ำดื่ม น้ำแข็งทำให้เกิดโรคติดเชื้อ Enteropathogenic แบคทีเรียชนิดนี้มีความหลากหลายของสายพันธุ์ สายพันธุ์ก่อโรคมีทั้งชนิดที่สร้างและไม่สร้างสารพิษ ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ผู้ป่วยติดเชื้อ สายพันธุ์ที่มีความสำคัญและเป็นปัญหาก่อโรคอาหารเป็นพิษในปัจจุบันคือ *E.coli* O157: H7 โดยมีอาการ

ท้องร่วงและมีเลือดออกในทางเดินอาหาร อาจถ่ายเป็นเลือด ปวดท้อง และถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำหลังจากได้รับเชื้อประมาณ 3-8 วัน

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะมีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 28-35°C และ สามารถอยู่รอดได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-49°C พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 4.9-9.3 ค่า aw ต่ำสุดประมาณ 0.95 เชื้อเข้าสู่ร่างกายโดยการกินอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ โดยที่อาหารนั้นไม่มีการหุงต้มให้สุก หรืออาหารที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนไม่เพียงพอ แหล่งของแบคทีเรียชนิดนี้ คือ ดิน อาหารที่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้โดยส่วนใหญ่คือผลิตภัณฑ์ธัญพืช เช่น แป้ง ขนมปัง และอาหารแห้ง เช่น นมผง เนื้อแห้ง แบคทีเรียชนิดนี้สามารถปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ โดยเมื่ออยู่ในอาหารที่มีค่า aw ต่ำๆ จะสร้างสปอร์ และสร้างสารพิษไว้ภายในเซลล์ (enterotoxin) โรคที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดนี้จะคล้ายกับ ครอสติเดียม เพอฟรินเจน คือ มีอาการท้องร่วง คลื่นไส้ ท้องเสียถ่ายท้อง และหายไปภายใน 12-24 ชั่วโมง ไม่ค่อยพบอาการอาเจียนแต่ก็อาจมีอาการอาเจียนได้ คือเกิดภายใน 1-5 ชั่วโมง หลังจากการบริโภคอาหาร และหายไปภายใน 6-24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่ร่างกายรับเข้าไปแล้วทำให้เกิดโรคคือ 10^8 เซลล์ สารพิษของแบคทีเรียชนิดนี้มีสมบัติไม่ทนร้อน ดังนั้นการอุ่นอาหารด้วยความร้อนสูงอีกครั้งจะช่วยกำจัดสารพิษของแบคทีเรียนี้ได้

Listeria monocytogenes แบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ทั้งในภาวะมีอากาศและในสภาวะไม่มีอากาศ อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 30-35°C และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำคือ 0-4°C ทน aw ได้ถึง 0.90 ขึ้นอยู่กับสารที่ใช้ปรับค่า aw *Listeria monocytogenes* แพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ อาจพบในผักเน่าเปื่อย ดิน มูลสัตว์ น้ำเสีย และแหล่งน้ำ น้ำนมดิบ เนื้อสัตว์ ในประเทศไทยยังไม่มีการรายงานการการระบาดของแบคทีเรียนี้ในอาหาร แต่ในอุตสาหกรรมอาหารแช่เยือกแข็งเพื่อส่งออกจะต้องมีมาตรการในการป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้ แบคทีเรียชนิดนี้มีระยะฟักตัวนานถึง 1-90 วัน ทำให้การวินิจฉัยเพื่อรักษาโรคมีความคลาดเคลื่อนสูง ความรุนแรงของการเจ็บป่วยเนื่องจากการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ ขึ้นกับภาวะร่างกายของผู้ได้รับเชื้อนี้ การเกิดพิษในคน คือ แบคทีเรียผ่านเข้าสู่ทางเดินอาหารแล้วเกาะกับเซลล์ของลำไส้พร้อมขับสารที่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว แล้วเพิ่มจำนวนในร่างกาย พร้อมกับทำลายเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ทำลายมดลูก ทำลายทารกในครรภ์ทำให้เกิดอาการแท้ง ทำลายต่อมน้ำเหลือง และก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิต จึงเป็นผลให้มีอัตราการตายสูง

Clostridium perfringens เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ดีในสภาวะไม่มีอากาศ (anaerobe) สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 43-47°C และ สามารถอยู่รอดได้ในช่วงอุณหภูมิ 12-50°C พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 6.0-6.7 เซลล์จะไม่เจริญที่ พีเอชต่ำกว่า 5 และในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือมากกว่า 6% aw ต่ำสุดช่วง 0.95-0.97 เชื้อเข้าสู่ร่างกายโดยการกินอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ โดยที่อาหารนั้นไม่มีการหุงต้มให้สุก หรืออาหารที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนไม่เพียงพอ อาหารที่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้โดยส่วนใหญ่คือผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ และอาหารแห้ง ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารอักเสบ แบคทีเรียชนิดทำให้เกิดโรคหลังจากเซลล์ผ่านไปถึงลำไส้เล็กจะสร้างสปอร์พร้อมกับสร้างสารพิษขับออกมานอกเซลล์ สารพิษนี้จะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ อาการของโรค คือ คลื่นไส้ ท้องเสียถ่ายท้อง ส่วนมากไม่อาเจียน แต่อาการไม่รุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต นอกจากผู้ป่วยมีภาวะร่างกายที่อ่อนแอมาก อาการเกิดขึ้นประมาณ 8-24 ชั่วโมงหลังจากการบริโภคอาหาร จำนวนเซลล์ที่ร่างกายรับเข้าไปแล้วทำให้เกิดโรคคือ 10^6-10^8 โคโลนี ต่อกรัมอาหาร

Clostridium botulinum เป็นแบคทีเรียที่เป็นปัญหาของอาหารที่บรรจุในสภาวะสุญญากาศอีกชนิหนึ่ง ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน สามารถสร้างสปอร์ และสร้างสารพิษที่มีผลต่อระบบประสาทได้ (neurotoxin) สปอร์ของ *C. botulinum* ทนต่อความร้อนทำให้สปอร์ยังคงหลงเหลืออยู่ในกระบวนการผลิตอาหารที่ให้ความร้อนไม่เหมาะสม และ minimally processed เมื่อสปอร์อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม คือไม่มีออกซิเจน สปอร์จะงอกเจริญเติบโตเป็น vegetative cell และมีการสร้างสารพิษขึ้น โดยอาการป่วยที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษชนิดนี้เรียกว่า botulism เมื่อผู้ป่วยได้รับสารพิษของ *C. botulinum* เข้าไปในร่างกาย จะเกิดอาการขึ้นภายใน 12-26 ชั่วโมงหลังการบริโภค มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน บางครั้งท้องเสีย อ่อนเพลีย หน้ามืด ตาลาย ปวดศีรษะ ในภายหลังอาจมีอาการท้องผูก เห็นภาพซ้อน และพูดลำบาก ผู้ป่วยอาจมีอาการกระหายน้ำ คอและลิ้นแข็ง ไม่มีไข้หรืออาจมีเพียงเล็กน้อย กล้ามเนื้อเริ่มเป็นอัมพาต และขยายไปถึงระบบทางเดินหายใจและหัวใจ ในที่สุดจะตาย เนื่องจากหายใจไม่ได้ ในรายที่ถึงแก่ชีวิต จะใช้เวลา 3-6 วัน หลังจากการบริโภคสารพิษ อาหารที่มีความสัมพันธ์กับโรคโบทูลิซึม ได้แก่ อาหารแปรรูปบรรจุกระป๋องที่ผลิตในครัวเรือนหรือกลุ่มแม่บ้านซึ่งมักได้รับความร้อนไม่เพียงพอ ชนิดของอาหารมักเป็นพวกผักผลไม้ เนื้อสัตว์ และปลาที่มีความเป็นกรดต่ำ สำหรับอาหารกระป๋องที่ผลิตจากโรงงานอุตสาหกรรมนั้นมีขั้นตอนกรรมวิธีในการฆ่าเชื้อที่ค่อนข้างได้มาตรฐานดังนั้นจึงมักไม่มีปัญหาจากเชื้อนี้ การแปรรูปอาหารในระดับครัวเรือนมักเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคนี้ถึงร้อยละ 72 อาการของโรค (จักรพันธ์ ปัญจะสุวรรณ, 2542) การทำอาหารกระป๋องในครัวเรือนส่วนใหญ่ก็เนื่องมาจากอาหารมีปริมาณมากทำให้กินไม่ทัน หรือเพื่อเก็บสะสมไว้กินตลอดทั้งปีภาชนะที่ใช้บรรจุมักจะเป็นขวดแก้วซึ่งง่ายต่อการปิดผนึก นอกจากนี้ยังมีการผลิต

เป็นอุตสาหกรรมครัวเรือนสำหรับขายในท้องถิ่นซึ่งมักปรากฏในรูปของผลิตภัณฑ์อาหารบรรจุขวด หรือ ปี๊บ เช่น หน่อไม้ดอง หน่อไม้ในน้ำใบหญ้านาง ขนุนอ่อน หัวปลี ถั่วงอก เป็นต้น การปนเปื้อนอาหารเกิดจากการปนเปื้อนสปอร์ของเชื้อ *C. botulinum* ในอาหารโดยเฉพาะอาหารที่ใช้วัตถุดิบที่มีการปนเปื้อนของดิน เมื่ออาหารถูกเก็บในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน เช่นในอาหารที่บรรจุอาหารในกระป๋องหรือขวดที่ปิดสนิท หรือในปี๊บเชื้อก็จะเจริญและสร้างสารพิษในอาหาร

สารสกัดจากทับทิมที่ต้านการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค

ทับทิมมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียที่หลากหลาย มีรายงานว่าสารสกัด เอทานอล 80 เปอร์เซนต์ จากส่วนเหนือดินมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Bacillus anthracis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella paratyphi* A แต่ไม่ต้านเชื้อ *E. coli*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* และ *Vibrio cholerae* (Aynehchi *et al*., 1982) สารสกัดลำต้นทับทิมด้วยอะซีโตนมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, *S. albus*, *E. coli*, *Salmonella* spp, *Salmonella typhosa*, *Salmonella. newport*, *Shigella flexneri* และ *Sh. flexneri* 3A สารสกัดจากลำต้นทับทิมด้วยน้ำก็มีฤทธิ์ต้านเชื้อที่กล่าวมาเช่นเดียวกับสารสกัดด้วยอะซีโตน ยกเว้นไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *Sh. flexneri* 3A (Misas *et al*., 1979) สารสกัด เอทานอล95 เปอร์เซนต์ จากส่วนเหนือดินมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Bacillus anthracis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella* จากเปลือกต้นทับทิม สามารถต้านเชื้อ *B. cereus*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *Sh. dysenteriae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *Yersinia enterolitica (Desta, 1993; Nimri et al., 1999)* สารสกัดเอทานอลจากใบและลำต้นมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Proteus mirabilis* และ *E. coli* (Alkofahi, 1997) สารสกัดด้วยน้ำร้อนและสารสกัดน้ำจากเปลือกผลทับทิมสามารถต้านเชื้อ *S. aureus* (Anesini และ Perez, 1993; Adamu et al, 2005) *E. coli* (Anesini และ Perez, 1993), *Salmonella typhi* (Perez และ Anesini, 1994), *Salmonella. albus* (Desta, 1993), *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabllis* (Adamu et al, 2005) และ *Proteus vugaris* (Desta, 1993) ได้ สารสกัดเอทานอลจากผลมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, *Salmonella albus*, *Proteus vulgaris*, *E. coli* และ *Salmonella gallinarum* (Desta, 1993) มีรายงานเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียว่า สารสกัดด้วยน้ำร้อนจากผลทับทิม ความเข้มข้น 62.5 มก./มล. (Anesini และ Perez, 1993; Perez และ Anesini, 1994), 200 มก./มล. และ สารสกัดด้วยน้ำจากผลทับทิม ความเข้มข้น 0.2 มล./แผ่น *(Desta, 1993;)* สามารถต้านเชื้อ *S. aureus* (Anesini และ Perez, 1993; Perez และ Anesini, 1994), *E.coli* (Anesini และ Perez, 1993), *S. typhi* ((Perez และ Anesini, 1994), *S. albus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. mirabilis* (Anesini และ Perez, 1993) และ *P. vugaris* (Desta, 1993) ได้ สารสกัดเอทานอลจากผล ความเข้มข้น 0.2 มล./แผ่น มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*,

S. albus, *P. vulgaris*, *E. coli* และ *Salmonella. gallinarum* (Desta, 1993) สารสกัด เอทานอล 90 เปอร์เซนต์จากผล มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* โดยมีค่าMIC เท่ากับ 62.5 มคก./มล. แต่ไม่มีผลต่อเชื้อ *B. subtilis* และ *E. coli* (Fabiola และคณะ 2002) สารสกัดจากผลด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 1000 มก./มล. มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. coagulans* และ *S. aureus* (Melendez และคณะ 2006) สารสกัดเดียวกันนี้ที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซนต์ (v/v) จะมีผลทำให้เชื้อ *S. aureus* เจริญเติบโตช้าลง ขณะที่ความเข้มข้น 1เปอร์เซนต์ จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดี และที่ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซนต์ พบว่ามีผลยับยั้งการสร้างสาร enterotoxin A ของแบคทีเรียได้ (Braga และคณะ 2005) สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมด้วยน้ำความเข้มข้น 2.5 มก./แผ่น (ตรีชฎา ศิริรักษ์ และคณะ 2548, ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย และคณะ 2548) สามารถต้านเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. iondons*, *Sh. boydii* (ตรีชฎา ศิริรักษ์ และคณะ 2548), *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin (MRSA) และ *S. aureus* (ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย และคณะ 2548) ได้ โดยมีค่า MIC และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อได้ (MBC) เท่ากับ 0.4-1.6 และ 6.3-12.5 มก./มล. ตามลำดับ และต่อเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 0.4 และ 6.3 มก./มล. ตามลำดับ (ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย และคณะ 2548) สำหรับค่า MIC ต่อเชื้อ *E. coli* มีค่า 0.09-1.56 มก./มล. (สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ และคณะ 2548)

สารสกัด เอทานอล70 เปอร์เซนต์ จากส่วนเหนือดินความเข้มข้น 250 มก./มล. มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Bacillus anthracis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella* (Gritsanapan และคณะ 1982) และจากเปลือกผล ความเข้มข้น150 มก./มล. มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* (Gritsanapan และคณะ 1982; Iqbal และ Arina, 2001), *V. chlorerae*, *V. parahaemolyticus*, *Sh. flexneri* (Gritsanapan และคณะ 1982), *B. subtilis*, *E. coli*, *Sh. dysenteriae* และ *Salmonella. paratyp*hi และมีรายงานเพิ่มเติมว่าสารสกัดนี้ประกอบด้วยสารกลุ่มอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ กลัยโคไซด์ ฟีนอล และแทนนิน (Iqbal และ Arina, 2001) สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมด้วยเอทานอล95 เปอร์เซนต์ ความเข้มข้น 60 มคก./จานเพาะเชื้อ (Alkofahi และคณะ 1996), 10 มก./มล. (Naovi และคณะ 1991), 100 มก./แผ่น (Avirutnant และ Pongpan 1983) และ 10 มคก./มล. (สุรีย์ ประเสริฐสุข และ มรกต สุกโชติรัตน์2529) มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* (Naovi และคณะ 1991; Avirutnant และ Pongpan 1983), *P. mirabilis* (Alkofahi และคณะ 1996), *B. subtilis* , *Salmonella. typhosa* (สุรีย์ ประเสริฐสุข และ มรกต สุกโชติรัตน์ 2529), *Sh. dysenteriae* (Avirutnant และ Pongpan 1983, สุรีย์ ประเสริฐสุข และมรกต สุกโชติรัตน์ 2529), *Sh. flexeneri* และ *Sh. sonnei* (สุรีย์ ประเสริฐสุข และมรกต สุกโชติรัตน์ 2529) สารสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ ความเข้มข้น 2.5 มก./แผ่น (ตรีชฎา ศิริรักษ์ และคณะ 2548, ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย และคณะ 2548) มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella*

londons, *Sh. boydii* (ตรีชฎา ศิริรักษ์ และคณะ 2548), และค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 0.2 มก./มล. (ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย และคณะ 2548) และ 0.19 มก./มล. (Chansakoaw และคณะ 2003) ต่อเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 0.36-3.13 มก./มล. (ตรีชฎา ศิริรักษ์ และคณะ 2548), 0.19-0.78 มก./มล. (สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ และคณะ 2548) และ 6.25 มก./มล. (Chansakoaw และคณะ 2003) ต่อเชื้อ *P. aeruginosa*, *Sh. boydii* และ *Salmonella londons* มีค่า 0.09, 0.09 และ 6.25 มก./มล. ตามลำดับ (ตรีชฎา ศิริรักษ์ และคณะ 2548) ส่วนค่า MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* และ MRSA เท่ากับ 3.2 และ 1.6-3.2 มก./มล. ตามลำดับ (ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย และคณะ 2548) ต่อเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 6.25-25 มก./มล. (ตรีชฎา ศิริรักษ์ และคณะ 2548) และ 1.25-5.0 เปอร์เซนต์ (w/v) (กัลยา เจือจันทร์ และคณะ 2548) ต่อเชื้อ *Salmonella spp.* เท่ากับ 1.25-2.5 เปอร์เซนต์ (w/v) (กัลยา เจือจันทร์ และคณะ 2547) ต่อเชื้อ *P. aeruginosa*, *Sh. boydii* และ *Salmonella londons* มีค่า 3.13, 3.13 และ 25 มก./มล. ตามลำดับ (ตรีชฎา ศิริรักษ์ และคณะ 2548)

ซึ่งจากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมที่รายงานมาทั้งหมดนั้นไม่พบว่ามีรายงานใดได้เปรียบเทียบและกล่าวถึงความสำคัญของพันธุ์ทับทิมต่อสมบัติการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร ดังนั้นหากมีข้อมูลดังกล่าวจะทำให้สามารถใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกสารสกัดที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารต้านแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของสารสกัดเปลือกผลทับทิมสายพันธุ์ต่างกัน

วิธีดำเนินการวิจัย

ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของสารสกัดเปลือกผลทับทิมพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ พันธุ์พื้นเมือง (ซื้อจากตลาดสดเมืองพล อำเภอพล จังหวัดขอนแก่น) พันธุ์นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน (ซื้อจากปากคลองตลาด กรุงเทพมหานคร) พันธุ์แสงตะวัน (ซื้อจากตลาดกลางดง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา) และพันธุ์ศรีปัญญา(จากไร่เทพพิทักษ์ อำเภอพบพระ จังหวัดตาก) เก็บผลทับทิมที่อุณหภูมิตู้เย็นก่อนที่จะแกะเอาเปลือกไปสกัดสารต่อไป

ขั้นตอนโดยสรุปของการวิจัยดังแสดงในแผนผังต่อไปนี้

1. เตรียมวัตถุดิบเปลือกผลทับทิม

↓

2. การสกัดสารจากเปลือกผลทับทิม

↓

3. ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร
(ทุกขั้นตอนทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

วิธีวิเคราะห์และการดำเนินงาน

สารที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ เอทานอล 95 เปอร์เซนต์ และ น้ำกลั่น

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมเปลือกผลทับทิม

นำตัวอย่างผลทิมทิม มาแช่น้ำและล้างให้สะอาด ผ่าผลแล้วแยกเอาเปลือกมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ก่อนนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 นาที ก่อนบรรจุถุงสุญญากาศเก็บที่อุณหภูมิห้อง ตัวอย่างผลทับทิมที่นำเข้าจากต่างประเทศอาจมีการเคลือบด้วยสารเคลือบผิว ดังนั้นหลังล้างน้ำสะอาดแล้วจะแช่ผลทับทิมในสารละลายแอลกอฮอล์ 70 % ประมาณ 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้งก่อนนำไปแยกเอาเปลือกและอบแห้ง

2. การสกัดสารจากเปลือกผลทับทิม

นำตัวอย่างเปลือกผลทับทิมที่เตรียมได้จากข้อ 1 มาบดด้วยเครื่องบดมูลิเน็กซ์ ให้ละเอียด จากนั้นนำตัวอย่างมาร่อนด้วยตะแกรงให้มีขนาดละเอียดเท่ากัน นำตัวอย่างไปสกัด ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ และน้ำกลั่น 2 วิธี

วิธีการสกัดด้วยน้ำกลั่น (วิธีที่1)โดยนำตัวอย่างที่บดละเอียดมาชั่งน้ำหนักแล้วเติมน้ำกลั่นโดยใช้อัตราส่วน เท่ากับ 1 : 15 (w/w) เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนใสที่ได้ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3,000Xg เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำส่วนใสมาระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporatorที่อุณหภูมิน้ำเดือด นำตัวอย่างไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณสารสกัด(ดัดแปลงจาก Ajaikumar *et al.*, 2005) เก็บสารสกัดในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมด้วยน้ำกลั่น (วิธีที่2) โดยใช้อัตราส่วน เปลือกผลทับทิมต่อน้ำกลั่น 1:3 ตีปั่นเป็นเวลา 5 นาที กรองด้วยผ้ากรอง แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3,000Xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองด้วย membrane filter ที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอน(μm) แล้วเก็บสารสกัดในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส หาปริมาณสารสกัดที่ได้โดยใช้ปิเปตดูดสารสกัดมา 5 มิลลิลิตร ใส่ในถาดอลูมิเนียมสะอาดและชั่งน้ำหนักไว้แล้ว (w1) นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนักที่ได้ (w2) ปริมาณสารสกัดที่ได้ เท่ากับ (w2-w1) ×100 / 5 เปอร์เซนต์

การเตรียมสารสกัดด้วยเอทานอลโดยนำตัวอย่างที่บดละเอียดมาชั่งน้ำหนักแล้วเติมเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ โดยใช้อัตรา ส่วนเท่ากับ 1 : 4 เท่า เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนที่กรองได้มาปั่น เหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาเปอร์เซนต์สารสกัดที่ได้ เก็บสารสกัดในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส

รายงานปริมาณสารสกัดเป็นร้อยละของปริมาณสารสกัดของน้ำหนักเปลือกผลทับทิมแห้ง

3. การเตรียมสารสกัดเปลือกผลทับทิมในรูปสารละลาย

ชั่งสารสกัด 1 กรัม ใส่ในvolumetric flask แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปละลาย จากนั้นปรับปริมาตรทั้งหมดเป็น 10 มิลลิลิตรก็จะได้สารสกัดเข้มข้น 1,000,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส

4. เตรียม stock เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

แบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ 10 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 1729, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P และแบคทีเรียแกรมลบ 8 สายพันธุ์ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922 , *Salmonella* Enteritidis DMST 17368, *S.* Anatum DMST 17362, *S.* Derby DMST 16814, *S.* Typhimurium ATCC 13311, *S.* Choleraesuis ATCC 10708 , *Pseudomonas fluorescens* TISTR 385 และ *P. aeruginosa* ATCC 15442 โดยนำเชื้อมาทำให้ active ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ว inoculateลงในflask ที่มีอาหาร Mueller Hinton broth (MHB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปมเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วยการเทียบความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland ด้วย

อาหาร MHB เชื้อในbrothที่ได้จะมีจำนวนประมาณ 1.5 x 10^8 CFU/m (McFarland 0.5 standard เตรียมโดยใช้ $BaCl_2$ ความเข้มข้น 0.048 M ปริมาตร0.5 ml ผสมกับ H_2SO_4 ความเข้มข้น0.18M ปริมาตร 99.5 ml เขย่าให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิต่ำ เมื่อจะนำมาใช้ควรเขย่าก่อนทุกครั้ง) จากนั้นจึงนำsuspension แบคทีเรียมาเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงเป็น 10^4-10^5 CFU/ml เก็บที่อุณหภูมิ 10°C เพื่อเป็น stock เชื้อไว้ใช้ต่อไป

5. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร โดยวิธี agar diffusion assay

ใช้ปิเปตดูดsuspension ของ แบคทีเรีย จากข้อ 4 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใส่ในอาหาร MHA แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัว L spreadให้ทั่ว plate จากนั้นใช้ forcep ที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบ paper disc ที่ปลอดเชื้อวางใน sterile plate แล้วดูดสารสกัดเปลือกผลทับทิม จากข้อ 3 จำนวน 20 ไมโครลิตรหยดใส่บน paper disc ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วคีบ paper disc มาวางบนอาหารดังกล่าว จากนั้นนำไปปมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้น(ดัดแปลงจาก Coutant *et al.*,1996) ทำ 6 ซ้ำ โดยมีน้ำกลั่นเป็น negative control และ tetracycline เป็น positive control

6. การหาค่า MIC(minimal inhibition concentration) และ MBC(minimal bactericidal concentration) ของสารสกัดเปลือกผลทับทิม โดย วิธี macrobroth dilution method

นำสารสกัดจากข้อ 3 มาหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC)และ minimal bactericidal concentration (MBC) ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบ

ตรวจสอบค่า MIC ด้วยวิธี macrobroth dilution (Wikler, 2008) โดยนำหลอดทดลองจำนวน 11 หลอด ที่มีอาหาร MHB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบรรจุอยู่หลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยเรียงหลอดทั้งหมดใน rack เขียนหมายเลขกำกับในแต่ละหลอดเป็น 2 – 12 ส่วนหลอดที่ 1 เป็นหลอดเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้ว จากนั้นปิเปตสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่เตรียมไว้จากข้อ 3 (มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ใส่ลงในหลอดที่ 1 และ 2 หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากัน แล้วดูดสารสกัด จำนวน 1 มิลลิลิตรจากหลอดที่ 2 มาถ่ายลงในหลอดที่ 3 ทำแบบเดียวกันนี้ต่อเนื่องจนถึงหลอดที่ 11 แล้วดูดตัวอย่างจากหลอดที่ 11 จำนวน 1 มิลลิลิตร ทิ้งไป หลอดที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 และ 11มีความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.781, 0.391, 0.195 และ 0.0976 mg/ml ตามลำดับ จากนั้น inoculate suspension เชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้(ข้อ 4) 1 มิลลิลิตร ลงในทุกหลอด แล้ว

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตหลอดที่มีความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย(เทียบกับหลอดควบคุม) ถือว่าความเข้มข้นนั้นเป็นค่า MIC มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

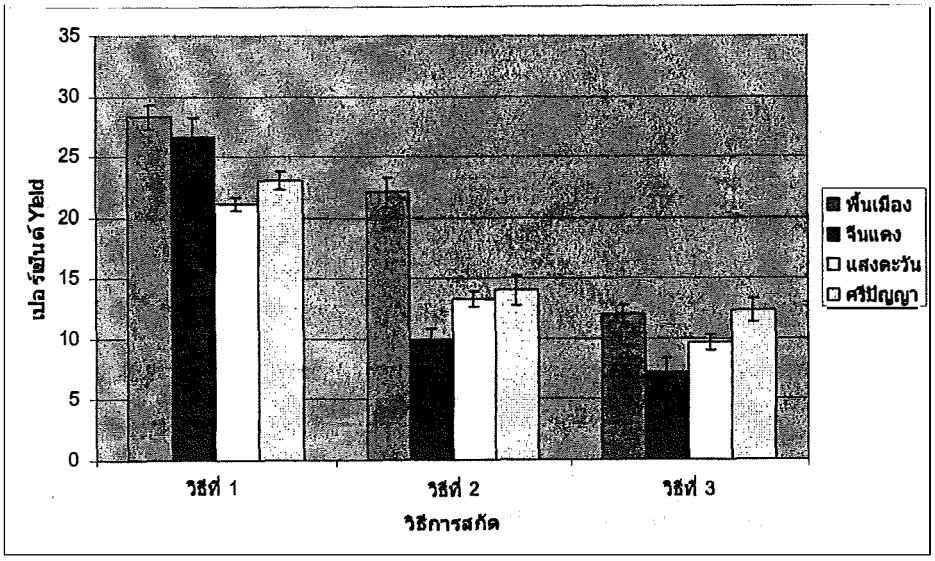
นำหลอดอาหารที่ทำการทดสอบหาค่า MIC ที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย (ไม่มีความขุ่น)ทุกหลอดไป streak บนอาหาร NA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตและบันทึกผล หลอดที่มีความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุด ที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบน plateอาหารNAที่streakดังกล่าว ถือเป็นค่า MBC

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมต่อการเจริญของ แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบทุกครั้งจะใช้สารปฏิชีวนะ tetracycline เป็น positive control และใช้ น้ำเป็น negative control

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. สารสกัดจากเปลือกผลทับทิม

ผลการสกัดสารจากเปลือกทับทิมพันธุ์ต่าง ๆได้แก่ พันธุ์พื้นเมือง พันธุ์จากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน(จีนแดง) พันธุ์แสงตะวัน และ พันธุ์ศรีปัญญา โดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซนต์ และน้ำ 2 วิธี เป็นตัวทำละลาย พบว่า สารสกัดเปลือกผลทับทิมทั้ง 4 พันธุ์ ที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ มีปริมาณสารสกัด (หลังระเหยตัวทำละลายออก) คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักเปลือกผลทับทิมแห้งเท่ากับร้อยละ 28.30±1.04 ,26.65±1.21 21.17±0.75 และ 23.07 ± 0.79 ตามลำดับ ดังในรูปที่ 1 เมื่อใช้น้ำกลั่นเป็นตัวสกัดได้สารสกัด(หลังระเหยตัวทำละลายออก) คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักเปลือกผลทับทิมแห้งเท่ากับร้อยละ 22.07±1.55, 9.89± 0.94 , 13.30 ± 1.22 และ 14.02± 1.2 ตามลำดับ และเมื่อใช้วิธีการสกัดด้วยน้ำโดยการตีปั่น แล้วผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอน พบว่าให้ปริมาณสารสกัด(หลังระเหยตัวทำละลายออก) คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักเปลือกผลทับทิมแห้งเท่ากับ 12.03 ± 0.56, 7.17 ±0.62 , 9.71 ± 0.65 และ 12.32 ± 0.96 ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงว่าเอทานอลมีประสิทธิภาพในการสกัดสารจากเปลือกผลทับทิมได้ดีกว่าน้ำ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำคัญ ที่เป็นสารหลักของเปลือกผลทับทิมเป็นพวกสารประกอบ ฟีนอล (phenolic compounds) และฟลาโวนอยด์(flavonoids) (Ben, Ayed and Metche,1996 และ Al-Zoreky,2009) ซึ่ง Majhenic, Skerget and Knez, (2007) รายงานว่าสารประกอบฟีนอลนี้สกัดออกจากเนื้อเยื่อเมล็ด guarana (*Paullinia cupana*) ด้วยเอทานอลได้ดีกว่าน้ำ ส่วนการที่สารสกัดด้วยน้ำแล้วระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ให้ปริมาณสารสกัดมากกว่าการสกัดด้วยการตีปั่นกับน้ำแล้วกรองด้วย membrane filter ที่มีรูขนาด 0.45ไมครอน ก็เนื่องจากใช้เวลาในการสกัดนานกว่า



รูปที่ 1 ปริมาณสารสกัด(หลังระเหยตัวทำละลายออก) คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักเปลือกทับทิมแห้งพันธุ์ต่างกัน ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ และน้ำ 2 วิธี (ค่าเฉลี่ย ± SD) (n = 6)

วิธีที่ 1 เปลือกผลทับทิมต่อเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ อัตรา 1 : 4

วิธีที่ 2 เปลือกผลทับทิมต่อน้ำกลั่น อัตรา 1 : 15

วิธีที่ 3 เปลือกผลทับทิมตีปั่นกับน้ำกลั่น อัตรา 1: 3

2. ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของสารสกัดเปลือกผลทับทิมพันธุ์ต่าง ๆ

สารสกัดเปลือกผลทับทิมพันธุ์พื้นเมือง พันธุ์จากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน พันธุ์แสงตะวันและพันธุ์ศรีปัญญา สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์และน้ำกลั่น 2 วิธี เพื่อใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารทั้ง 10 สายพันธุ์ เมื่อนำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. cereus* ATCC 1729 และ *S. aureus* ATCC 6538P พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมทั้ง 4 พันธุ์ ที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์และสกัดด้วยน้ำทั้ง 2 วิธี สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ แต่ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 6538Pได้ดีกว่า ดังแสดงในตารางที่ 1 และยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมลบได้ทั้ง 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 , *S.* Enteritidis DMST 17368, *S.* Anatum DMST 17362, *S.* Derby DMST 16814 , *S.* Typhimurium ATCC 13311, *S.* Choleraesuis ATCC 10708 , *P. fluorescens* TISTR 385 และ *P. aeruginosa* ATCC 15442 , โดยส่วนใหญ่จะยับยั้ง *P. aeruginosa* ATCC 15442 ได้ดีกว่าแบคทีเรียก่อโรคแกรมลบอื่น ๆที่ใช้ทดสอบ ซึ่งผลที่ได้ ต่างจาก Ueangpha Suthip (2003) ที่รายงานว่าสารสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซนต์จะยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบพวก *E. coli,*

Salmonella Typhimurium, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*และแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* โดยจะยับยั้ง *E. coli* ได้ดีที่สุด

สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำทั้ง 2 วิธี ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ Sirirat, et al, (2005). ที่พบว่าสารสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยเอทานอลมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 4 strain คือ *E. coli* O157:H7, *E. coli* O26:H11, *E. coli* O111:Nm, *E. coli* O22 ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ และ Majhenic, Skerget and Knez.(2007) รายงานว่าสารสกัดเมล็ดguarana (ซึ่งมีส่วนประกอบเป็นพวกสาร phenolic compounds) ด้วยแอลกอฮอล์ออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์พวกเชื้อรา : *Aspergillus niger*,*Trichoderma viride*, *Penicillium cyclopium* และแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus* ได้ดีกว่าสารที่สกัดด้วยน้ำ

สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมพันธุ์แสงตะวันมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบส่วนใหญ่ได้ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมพันธุ์พื้นเมือง พันธุ์ศรีปัญญาและพันธุ์จากสาธารณรัฐประชาชนจีน ทั้งนี้เนื่องจากทับทิมแต่ละพันธุ์จะมีสารพันธุกรรมแตกต่างกัน ทำให้สร้างสารที่เป็นองค์ประกอบในเปลือกผลได้ต่างกัน ดังเช่นงานวิจัยของ Ben Nasr, Ayed.and Metche,(1996) ที่พบว่า ปริมาณสาร proanthocyanidins.ในเปลือกผลทับทิมพันธุ์ต่าง ๆ (พันธุ์ Kalai, Chelfi, Tounsi, Jebalai, Gabsi และZehri) ที่ปลูกในประเทศตูนีเซีย มีปริมาณสารนี้แตกต่างกัน และทับทิมพันธุ์เดียวกันแต่ปลูกในเขตที่มีการชลประทานที่ดีก็จะมีปริมาณสารสูงกว่าที่ปลูกในเขตไม่มีระบบชลประทาน ดังนั้นทับทิมพันธุ์ต่าง ๆ ที่นำมาวิจัย ซึ่งได้มาจากคนละแหล่งปลูกจึงมีปริมาณสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้แตกต่างกัน

ตารางที่ 1 ความสามารถในการออกฤทธิยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของสารสกัดเปลือกผลทับทิมพันธุ์ต่างกัน ด้วยวิธี paper-disc diffusion (ค่าเฉลี่ย ± SD) (n = 6)

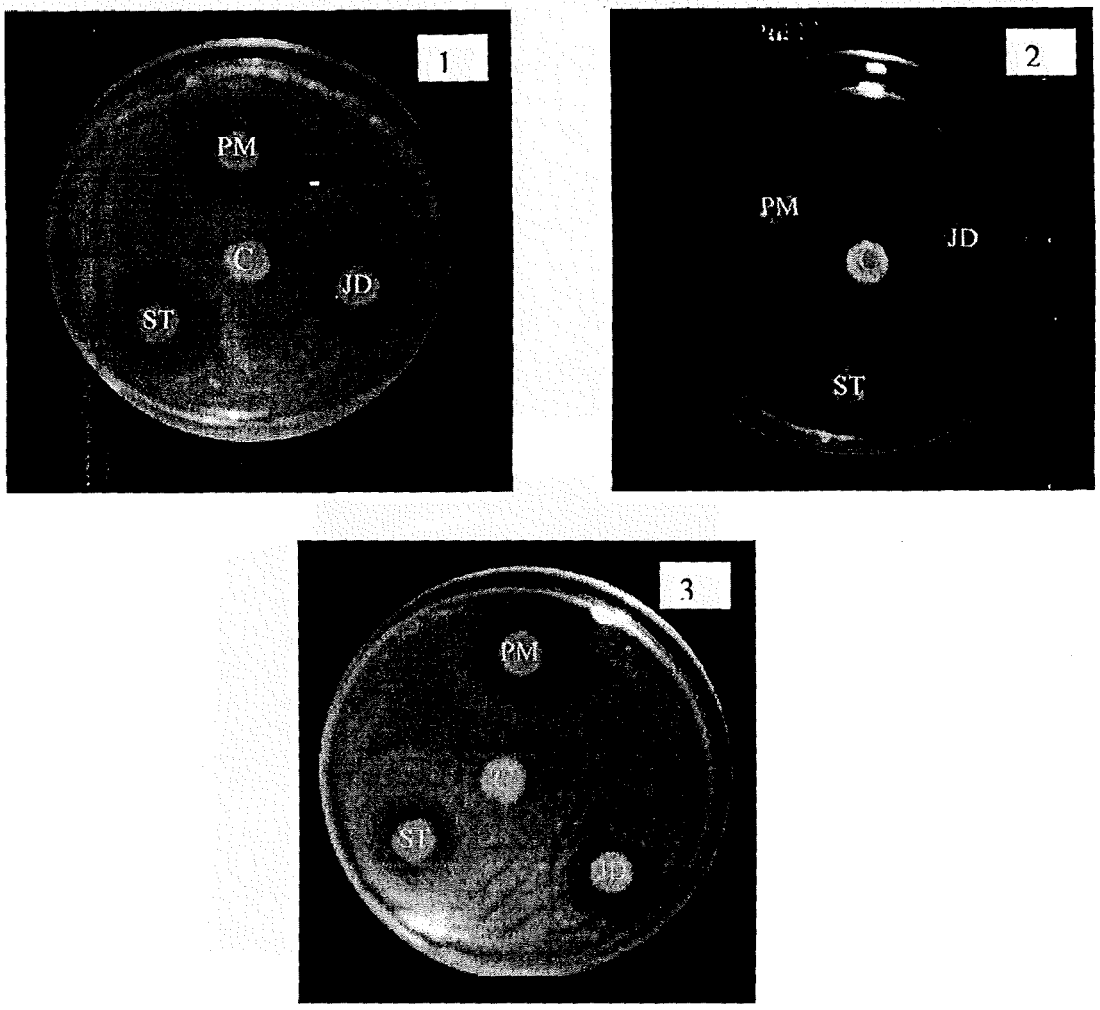
แบคทีเรีย	สารสกัดเปลือกทับทิม											
	วิธีที่ 1				วิธีที่ 2				วิธีที่ 3			
	พื้นเมือง	จีนแดง	แสงตะวัน	ศรีปัญญากับศรีสยาม	พื้นเมือง	จีนแดง	แสงตะวัน	ศรีปัญญากับศรีสยาม	พื้นเมือง	จีนแดง	แสงตะวัน	ศรีปัญญา
Bacillus cereus ATCC 1729	9.50±1.05	5.83±1.47	14.50±1.05	12.35±2.05	7.42±0.80	3.67±0.82	10.33±1.03	8.23±2.65	8.83±0.75	4.33±1.03	11.50±2.26	7.26±1.36
Staphylococcus aureus ATCC 6538P	16.67±0.82	12.00±1.41	21.00±1.10	15.23±2.35	12.33±1.75	5.83±0.75	14.83±1.94	12.85±0.56	18.50±1.05	10.67±1.86	16.67±1.21	15.96±2.36
Escherichia coli ATCC 25922	7.33 ±1.37	3.67 ± 0.82	13.25±0.76	8.21±1.56	5.33±0.52	2.17±0.41	8.00±0.63	6.25±1.56	5.50±1.22	2.33±0.52	8.67± 0.80	6.53±3.65
Salmonella enteritidis DMST 17368	7.50±0.84	2.17±1.17	8.83 ± 1.94	5.36±3.65	4.83±0.75	-	6.83±0.41	4.23±1.24	5.17±1.17	0.67±0.82	6.83±0.41	5.42±3.64
Salmonella anatum DMST 17362	5.75±0.76	2.00±0.89	7.83 ± 1.47	6.32±1.53	2.83±0.75	0.33±0.52	7.33±0.82	4.35±3.24	3.33±0.82	1.67±1.03	7.83±0.75	4.36±3.45

ตารางที่ 1 (ต่อ) ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของสารสกัดเปลือกผลทับทิมพันธุ์ต่างกัน ด้วยวิธี paper-disc diffusion (ค่าเฉลี่ย ± SD) (n = 6)

แบคทีเรีย	สารสกัดเปลือกทับทิม											
	วิธีที่ 1				วิธีที่ 2				วิธีที่ 3			
	พื้นเมือง	จีนแดง	แสงตะวัน	ศรีปัญญากับศรีสยาม	พื้นเมือง	จีนแดง	แสงตะวัน	ศรีปัญญากับศรีสยาม	พื้นเมือง	จีนแดง	แสงดะวัน	ศรีปัญญา
Salmonella derby DMST 16814	7.33±1.03	4.67±0.82	8.17±0.75	7.23±0.89	3.50±0.84	1.33±0.52	6.17±1.17	4.21±1.52	4.25±0.88	1.33±0.52	7.67±1.21	3.26±3.21
Salmonella typhimurium ATCC 13311	7.33±1.03	4.67±0.82	10.17±0.75	8.23±1.65	4.58±0.66	2.67±0.52	7.50±1.22	3.85±0.89	6.33±1.03	3.17±1.17	9.33±0.82	3.85±2.98
Salmonella choleraesuis ATCC 10708	10.17±0.75	6.17±0.75	12.50±1.05	10.89±2.12	9.83±0.41	8.00±0.63	12.67±1.03	4.65±0.65	6.67±0.82	5.50±0.55	5.92±0.80	4.12±1.65
Pseudomonas fluorescence TISTR 385	12.17±1.33	11.83±1.33	16.50±1.52	14.23±1.97	7.83±0.98	5.50±1.22	13.33±1.21	12.36±0.75	6.08±1.20	3.33±2.07	11.50±2.07	9.56±2.65
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	17.17±1.17	13.42±1.63	16.33±1.75	18.26±2.12	13.17±1.17	9.67±2.42	12.83±0.75	16.35±1.56	12.83±0.98	9.33±1.97	14.17±1.72	13.52±1.65

- = ไม่มีการยับยั้ง

** วิธีที่ 1 ใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ระเหยด้วยเครื่องสุญญากาศ ** วิธีที่ 2 ใช้น้ำกลั่น ระเหยด้วยเครื่องสุญญากาศ ** วิธีที่ 3 ใช้น้ำกลั่นกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน



C = disc ควบคุม PM = พื้นเมือง

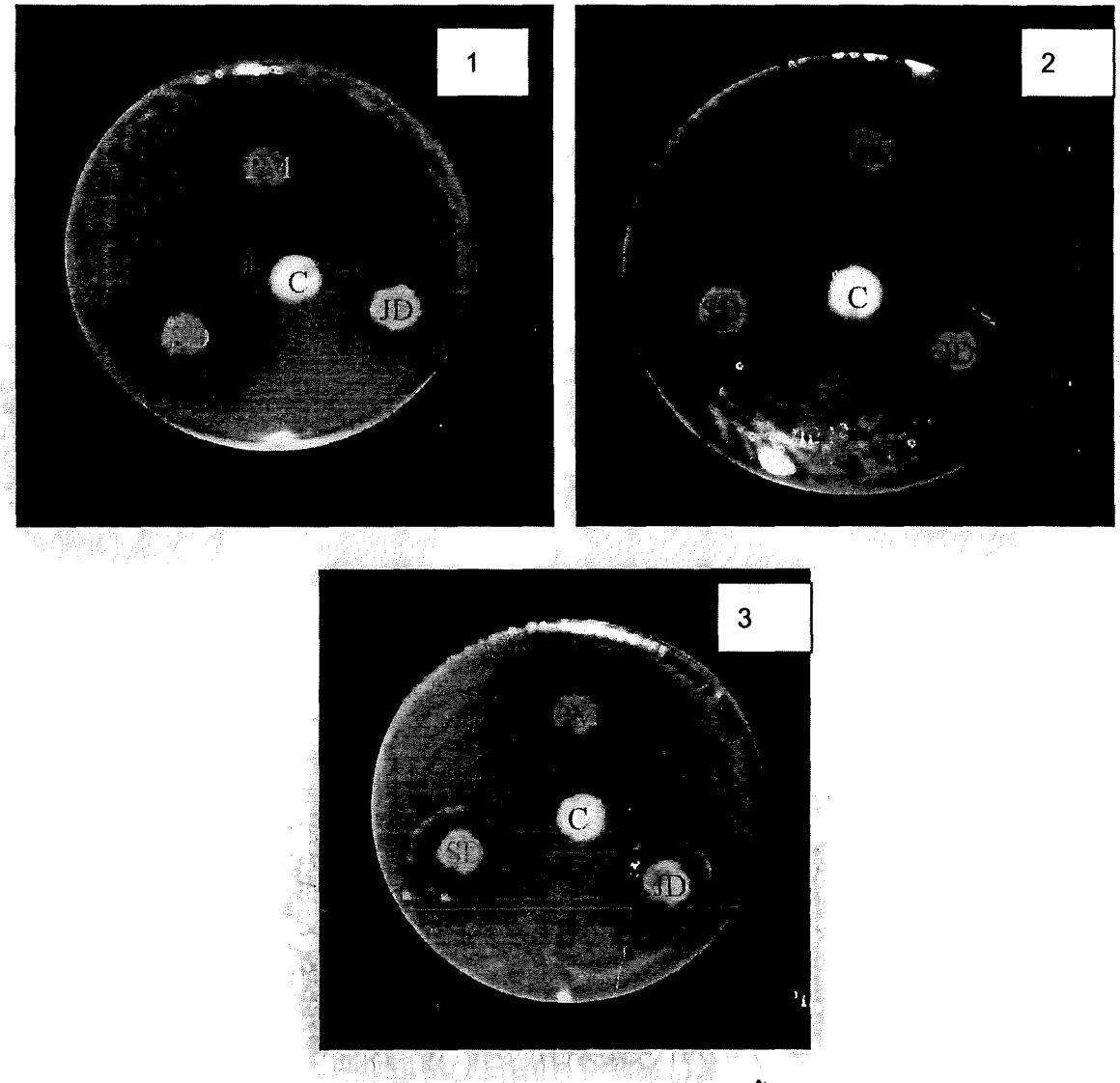
JD = สาธารณรัฐประชาชนจีน ST = แสงตะวัน

รูปที่ 2 ฤทธิ์การต้าน *S. aureus* ATCC 6538P ของสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่สกัดด้วยวิธีต่างกันคือ

วิธีที่ 1 เปลือกผลทับทิมต่อเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ อัตรา1 : 4

วิธีที่ 2 เปลือกผลทับทิมต่อน้ำกลั่น อัตรา1 : 15

วิธีที่ 3 เปลือกผลทับทิมตีปั่นกับน้ำกลั่น อัตรา 1: 3



C = disc ควบคุม PM = พื้นเมือง

JD = สาธารณรัฐประชาชนจีน ST = แสงตะวัน

รูปที่ 2 ฤทธิ์การต้าน *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 ของสารสกัดเปลือกผลทับทิม ที่รสกัดด้วยวิธีต่างกันคือ

วิธีที่ 1 เปลือกผลทับทิมต่อเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ อัตรา1 : 4

วิธีที่ 2 เปลือกผลทับทิมต่อน้ำกลั่น อัตรา1 : 15

วิธีที่ 3 เปลือกผลทับทิมตีปั่นกับน้ำกลั่น อัตรา 1: 3

3. ค่า MIC(minimal inhibition concentration) และ MBC(minimal bactericidal concentration) ของสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่สกัดด้วยสารละลายต่างกัน

สารสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ ของเปลือกผลทับทิมพันธุ์แสงตะวันและพันธุ์ศรีปัญญา มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 ตามลำดับ ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC 0.39 mg/ml เท่ากัน ดังในตารางที่ 2 ร องลงมาเป็นสารสกัดเปลือกผลทับทิมพันธุ์พื้นเมืองในการยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 , และพันธุ์แสงตะวันในการยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Pseudomonas fluorescens* TISTR 385 ตามลำดับโดยมีค่า MIC 0.78 mg/ml เท่ากัน ซึ่งฤทธิ์ของสารสกัดนี้ในการยับยั้ง *S. aureus* มีค่า MIC สอดคล้องกับรายงานของตรีชฎา ศิริรักษ์ และคณะ (2548) ที่กล่าวว่าสารสกัดเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ต้าน *S. aureus* โดยมีค่า MIC ประมาณ 0.2 mg/ml และมีฤทธิ์ด้าน *P. aeruginosa* ได้ดีมากโดยมีค่า MIC 0.09 mg/ml ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองมีความแตกต่างกัน

ส่วนความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์นั้น พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ศรีปัญญา สามารถฆ่าเชื้อ*Staphylococcus aureus* ATCC6538P และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 ตามลำดับ ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MBC 0.78 mg/ml เท่ากัน ซึ่งก็ตรงกับภูมิปัญญาท้องถิ่นที่มีการนำสารสกัดเปลือกผลทับทิมใช้สมานแผล แก้บิด แก้ท้องร่วง (Martindale,1989) ใช้ในการรักษาอาการอักเสบของแผลและสิว ซึ่งมักมีสาเหตุจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Adebamowo *et al.*, 2006)

ตารางที่ 2 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมพันธุ์ต่างกัน ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	สารสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยแอทานอล 95 เปอร์เซนต์ (mg/ml)							
	พื้นเมือง		จีนแดง		แสงตะวัน		ศรีปัญญา	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
B. cereus	12.50	50.00	25.00	50.00	1.56	6.25	1.56	6.25
S. aureus	0.78	0.78	1.56	3.13	0.39	6.25	1.56	1.56
E. coli	3.13	6.25	50.00	>50.00	12.50	6.25	6.25	6.25
S. enteritidis	3.13	3.13	25.00	>50.00	12.50	12.50	6.25	12.50
S. anatum	12.50	6.25	25.00	>50.00	12.50	12.50	6.25	12.50
S. derby	12.50	6.25	25.00	50.00	6.25	3.13	6.25	50.00
S. typhimurium	12.50	6.25	25.00	>50.00	6.25	3.13	6.25	12.50
S. choleraesuis	3.13	3.13	12.50	12.50	12.50	6.25	3.125	12.50
P. fluorescens	1.56	12.50	12.50	>50.00	0.78	6.25	3.13	6.25
P. aeruginosa	0.78	3.125	12.50	12.50	0.78	3.125	0.39	0.78

ส่วนสารสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยน้ำที่ผ่านการระเหยน้ำ ด้วยเครื่อง rotary evaporator พบว่าทับทิมพันธุ์พื้นเมืองสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P ได้ดีที่สุด ดีกว่าแบคทีเรียทดสอบสายพันธุ์อื่นและดีกว่าสารสกัดเปลือกทับทิมพันธุ์อื่น โดยมีค่า MIC 0.78 mg/ml ดังในตารางที่ 3 สารสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารส่วนใหญ่ที่ใช้ทดสอบได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้(ตรีชฎา ศิริรักษ์ และคณะ 2548, ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย และคณะ 2548)

ส่วนความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ใช้ทดสอบของสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำ พบว่าทับทิมพันธุ์พื้นเมืองมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MBC 0.78 mg/ml รองลงมาคือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 โดยมีค่า MBC 1.56 mg/ml ส่วนเชื้อ *Bacillus cereus* ATCC 1729, *Salmonella enteritidis* DMST 17368, *Salmonella anatum* DMST 17362 และ *Salmonella derby* DMST 16814 จะฆ่าได้ต้องใช้สารสกัดมากกว่า 50.0 mg/ml ซึ่งให้ผลต่างจากงานวิจัยของ กัลยา เจือจันทร์และคณะ(2545) ที่พบว่าสารสกัดเปลือกทับทิม สามารถฆ่าเชื้อ Salmonella spp.ที่แยกได้จากไก่ โดยมีค่า MBC 1.25-5.0 เปอร์เซนต์ (1.25-5.0 mg/100 ml)

ตารางที่ 3 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมพันธุ์ต่างกัน ด้วยน้ำกลั่น

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	สารสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยน้ำ (mg/ml)							
	พื้นเมือง		จีนแดง		แสงตะวัน		ศรีปัญญา	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
B. cereus	50.00	>50.00	25.00	50.00	6.25	12.50	3.125	3.125
S. aureus	0.78	0.78	6.25	6.25	6.25	6.25	3.125	12.50
E. coli	25.00	50.00	50.00	>50.00	25.00	50.00	12.50	50.00
S. enteritidis	50.00	>50.00	>50.00	>50.00	25.00	>50.00	12.50	>50.00
S. anatum	12.50	>50.00	>50.00	>50.00	12.50	>50.00	12.50	>50.00
S. derby	12.50	>50.00	>50.00	>50.00	12.50	>50.00	12.50	>50.00
S. typhimurium	12.50	50.00	>50.00	>50.00	12.50	50.00	12.50	12.50
S. choleraesuis	12.50	25.00	25.00	50.00	12.50	12.50	25.00	50.00
P. fluorescens	6.25	12.50	12.50	>50.00	25.00	25.00	25.00	>50.00
P. aeruginosa	1.56	1.56	12.50	12.50	6.25	6.25	3.125	3.125

สำหรับสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม ด้วยวิธีการตีปั่นกับน้ำ แล้วกรองผ่านแผ่นกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอน พบว่าสารสกัดเปลือกผลทับทิมพันธุ์แสงตะวันจะออกฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P ได้ดี เช่นเดียวกับพันธุ์ศรีปัญญาที่ยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 และพันธุ์พื้นเมืองที่ยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองดังกล่าว ได้ดีพอกัน โดยมีค่า MIC 6.25 mg/ml ดังในตารางที่ 4 ส่วนความสามารถในการฆ่าแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบพบว่าพันธุ์แสงตะวันและพันธุ์ศรีปัญญาออกฤทธิ์ฆ่า *B. cereus* ATCC1729, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MBC 12.5 mg/ml เท่ากันเช่นเดียวกับ พันธุ์พื้นเมือง ที่ฆ่า *Staphylococcus aureus* ATCC 6538Pได้ดีพอกัน

สารสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยการตีปั่นกับน้ำวิธีนี้(วิธีที่2)จะออกฤทธิ์ยับยั้ง และฆ่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ใช้ทดสอบได้ต่ำกว่าสารสกัดด้วยน้ำ(วิธีที่1)ที่ผ่านเครื่อง rotary evaporator และสารสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดด้วยน้ำวิธีที่1ใช้ระยะเวลาในการสกัดสั้นกว่าสารสกัดด้วยน้ำวิธีที่ 2 จึงทำให้สกัดสารออกฤทธิ์ได้น้อยกว่า ส่วนสารสกัดเอทานอล 95 เปอร์เซนต์นั้นจะมีประสิทธิภาพในการสกัดสารออกฤทธิ์ได้ดีกว่าน้ำ(Majhenic, Skerget and Knez, 2007) ดังนั้นจึงสามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง และ ฆ่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ได้ดี

ตารางที่ 4 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากเปลือกทับทิมพันธุ์ต่างกัน ด้วยการตีปั่นกับน้ำกลั่นและกรองผ่านแผ่นกรองที่มีรู ขนาด 0.45 ไมครอน

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยน้ำ(mg/ml)							
	พื้นเมือง		จีนแดง		แสงตะวัน		ศรีปัญญา	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
B. cereus	50.00	>50.00	50.00	>50.00	6.25	12.50	6.25	12.50
S. aureus	6.25	12.50	25.00	>50.00	6.25	12.50	12.50	12.50
E. coli	25.00	>50.00	>50.00	>50.00	12.50	50.00	12.50	25.00
S. enteritidis	50.00	>50.00	>50.00	>50.00	25.00	50.00	25.00	50.00
S. anatum	25.00	>50.00	>50.00	>50.00	>50.00	>50.00	25.00	>50.00
S. derby	12.50	25.00	>50.00	>50.00	>50.00	>50.00	25.00	>50.00
S. typhimurium	12.50	25.00	>50.00	>50.00	>50.00	>50.00	25.00	50.00
S. choleraesuis	12.50	25.00	25.00	25.00	12.50	12.50	25.00	25.00
P. fluorescence	12.50	25.00	25.00	25.00	25.00	50.00	25.00	25.00
P. aeruginosa	6.25	25.00	12.50	25.00	12.50	12.50	6.25	12.50

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมพันธุ์ พื้นเมือง พันธุ์จากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน พันธุ์แสงตะวัน และพันธุ์ศรีปัญญาที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ มีปริมาณของสารสกัดสูงกว่าวิธีการสกัดด้วยน้ำ โดยเปลือกผลทับทิมพันธุ์พื้นเมืองที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์จะให้ปริมาณสารสกัดสูงสุดเท่ากับ 28.30 ± 1.04 เปอร์เซนต์

สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารที่ใช้ทดสอบ ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำกลั่น

เมื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมสายพันธุ์พื้นเมือง พันธุ์จากสาธารณรัฐประชาชนจีน พันธุ์แสงตะวันและพันธุ์ศรีปัญญา ด้วยน้ำและเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ เปลือกของผลทับทิมสายพันธุ์แสงตะวันออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีกว่าพันธุ์พื้นเมือง พันธุ์จากสาธารณรัฐประชาชนจีน และพันธุ์ศรีปัญญา

ซึ่งจากผลการวิจัยบ่งชี้ให้เห็นโดยรวมว่าสารสกัดเปลือกผลทับทิม สามารถนำมาใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารได้หลายชนิด แต่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมากน้อยแตกต่างกันไป โดยพบว่าสามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด ดังนั้นหากนำไปใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารอาจต้องใช้ร่วมกับสารสกัดจากพืชชนิดอื่นๆเพื่อให้มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น อย่างไรก็ตามในการนำเปลือกผลทับทิมมาสกัดเพื่อใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ มีปัจจัยที่ต้องพิจารณาคือ พันธุ์ทับทิม และวิธีสกัด ซึ่งพบว่าเปลือกผลทับทิมพันธุ์พื้นเมืองให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุดและมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบอยู่ในระดับดีรองจากพันธุ์แสงตะวัน แต่สายพันธุ์นี้ไม่มีการปลูกในเชิงพานิชย์เนื่องจากไม่นิยมรับประทานเมล็ดเหมือนพันธ์อื่นๆ ดังนั้นการนำเปลือกผลทับทิมพันธุ์พื้นเมืองมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตสารต้านจุลินทรีย์ จะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับทับทิมพันธุ์นี้ได้เป็นอย่างดี อาจทำให้มีการปลูกเป็นการค้าได้

เอกสารอ้างอิง

กัลยา เจือจันทร์ จิโรจ ศศิปรียจันทร์ นันทวัน บุณยะประภัศร. 2547. ผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* spp.ที่แยกได้จากไก่ : ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าทำลายเชื้อ. การประชุมวิชาการสมุนไพรไทย : โอกาสและทางเลือกใหม่ของการผลิตสัตว์, กรุงเทพฯ, 15-16 มกราคม 2547:48-51.

กัลยา เจือจันทร์ จิโรจ ศศิปรียจันทร์ นันทวัน บุณยะประภัศร. 2548. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าทำลายเชื้อของสารสกัดเปลือกผลทับทิม (Punica granatum L.) ต่อเชื้อ *Escherichia coli* ที่แยกได้จากไก่. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2548;15(2):1-7.

ตรีชฎา ศิริรักษ์ ถนอมจิต สุภาวิตา กานดา ปานทอง ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย. 2548. ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม (*Punica granatum* L.) ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคกลุ่ม Gram-negative bacilli. ว *สงขลานครินทร์ วทท* 2548;27(suppl.2):535-44.

ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย และ หลิน กิจพิพิธ. ฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อ 2548. Clinical isolates ของ methicillin-resistant Staphylococcus aureus. ว *สงขลานครินทร์ วทท* 2548;27(suppl.2):525-34.

สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ ศิลาวรรณ วรรณมณี ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย. ฤทธิ์ของสมุนไพรไทยต่อการเกาะกลุ่มของ Escherichia coli O157:H7. ว *สงขลานครินทร์ วทท* 2548;27(suppl.2):545-54.

สุรีย์ ประเสริฐสุข มรกต สุกโชติรัตน์. *ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดที่มีต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคบิด.* การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 12, กรุงเทพฯ, 20-22 ตุลาคม 2529:344-5.

Adamu, H.M., Abayeh, O.J., Agho, M.O., Abdullahi, A.L., Uba, A., Dukku, H.U. & Wufem, B.M. 2005. An ethnobotanical survey of Bauchi State herbal plants and their antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 99(1): 1-4.

Adebamowo CA, Spiegelman D, Berkey CS, Danby FW, Rockett HH, Colditz GA. 2006. Milk consumption and acne in adolescent girls. *Dermatol Online J*:12-25.

Al-Zoreky NS. 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*. 134(3):244-248.

Ajaikumar KB, Asheef M, Babu BH, Padikkala J. 2005. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology* 96(1-2):171-176.

Alkofahi A, B.R., Owais W, Najib N. 1997. Biological activity of some Jordanian medicinal plant extracts Part II. *Fitoterapia* 68(2), 163-182.

Avirutnant W, Pongpan A. 1983. The antimicrobial activity of some Thai flowers and plants. *Mahidol J Pharm Sci.*10(3):81-6.

Aynehchi, Y., Salehi Sormaghi, M.H., Shirudi, M. & Souri, E. 1982. Screening of Iranian plants for antimicrobial activity. *Acta Pharm Suecica* 19(4): 303-308.

A.O.A.C.1990. *Official Method of Analysis of the Association of official Analytical Chemists*. 15 ed Virginia. The Association of Official Analytical chemists Inc.

Ben Nasr,C., Ayed, N.and Metche, M.1996. Quatitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel. *Z. Lebensm Unters Forsch*. 203:374-378.

Braga LC. Shupp JW and Cummings C, 2005. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *J Ethnopharmacol* 96:335-9.

Chansakoaw S, Yosprasit K, Tharavichitkul, Leelaporanpisid P. 2003. *Topical antibacterial formulation from extract of Punica granatum.* The Sixth JSPS-NRCT Joint Seminar : Recent advances in natural medicine research, Bangkok, Thailand, 2-4 Dec 2003.

Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI). 2007. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. Approved Standard—Seventh Edition (M7-A7).

Coutant C, Olden D, Bell J, Turnidge JD. 1996. Disk diffusion interpretive criteria for fusidic acid susceptibility testing of Staphylococci by the National Committee for

Clinical Laboratory Standards method. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 25(1):9-13.

Desta, B. (1993) Ethiopian traditional herbal drugs. Part II: Antimicrobial activity of 63 medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 39(2), 129-139.

Fabiola BH, Greisiele LP, Neviton RS, Diogenes, Aparicio GC, Celso VN, Benedito PDF. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97(7):1027-31.

Gritsanapan W, Chulasiri M. A preliminary study of antidiarrhreal plants: I, antibacterial acitivity. *Mahidol J Pharm Sci* 1983;10(4):199-23.

Hatano T, Kusuda M, Inada K, Ogawa T-o, Shiota S, Tsuchiya T, Yoshida T. 2005. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Phytochemistry* 66(17):2047-2055.

Iqbal S, Haleem S, Akhtar M, Zia-ul-Haq M, Akbar J. 2008. *Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions*. Food Research International 41(2):194-200.

Iqbal A, Arina ZB. 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J Ethnopharmacol*;74:113-23.

Majhenic, L.; Skerget, M. and Knez, Z. 2007. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104:1258-1268.

Martindale. 1989 . *The extra pharmacopocia.* Reynolds JEF; ed. London: The Pharmaceutical Press, p.779.

Melendez PA, Capriles VA. 2006. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine*;13:272-6.

Naovi SAH, Khan MSY, Vohora SB. 1991. Anti-bacterial, anti-fungal and anthelmintic investigations on Indian medicinal plants. *Fitoterapia*;62(3):221-8.

Perez, C. & Anesini, C. 1994 In vitro antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against Salmonella typhi. *Journal of Ethnopharmacology* 44(1), 41-46.

Shan B, Cai Y-Z, Brooks JD, Corke H. 2007. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology* 117(1):112-119.

Sirirat, T.,Supavite, T. Panthong, K and Varavuthikunchai, S. 2005. Antibacterial activity of crude extract of Punlca granatum pericarp on pathogenic gram negative bacilli. Songklanakarin Journal of Science and Technology(Thailand), *Warasan Songklanakarin*, 27(2):535-544.

Ueangpha Suthip. 2003. *Compariasion inhibitory activity extract of manngosteen, pomegranate and babana pericarp on bacteria 5 species*. Research and Academic Office. Rajabhat Institue Bansomdejchaopraya, Bangkok, 69-8-69 p.