การใช้สารสกัดพืชและจุลินทรีย์เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* ในการผลิตผักสด

Efficacy of Plants and Microbial Extracts on Controlling *E. coli* and *Salmonella* Contamination in Vegetable Produce

ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์ อารีรัตน์ การุณสถิตชัย และ อมรา ชินภูติ

Chawalert Trikarunasawat, Areerat Karunsatitchai and Amara Chinaphuti

กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผลิตผลเกษตร

สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

Abstract

Efficacy of plant extracts on controlling *E. coli* contamination in Kitchen Mint (*Melissa officinalis*) was conducted by extracting the crude extracts from Pomegranate (Punica Granatum) fruit rind and leaf, Guava (*Psidium guajava* Linn.) leaf, Galanga (*Alpinia galanga*) rhizome, Finger root (*Boesenbergia rotunda*) and Mangosteen (*Garcinia mangostana*) fruit rind with 95% EtOH. Mangosteen fruit rind gave the highest yield of crude extracts was 745.44 mg/g DW. followed by pomegranate fruit rind cultivar 'Sripanya' (465.97 mg/g DW.) and Pomegranate fruit rind commercial powder (302.99 mg/g DW.) respectively. The crude extracts were introduced to test for inhibitory effects on growth of *E. coli* using filter paper disc method. All of crude extracts from pomegranate fruit rind showed their ability to inhibition the growth of *E. coli*. They're provided the lowest effective concentration on *E. coli* growth inhibition was 4,000 ppm approximately by using Gradient plate technique. Pomegranate fruit rind commercial powder extracts were selected to test for controlling of *E. coli* contamination on Kitchen Mint. The difference concentrations of crude extract were 4,000, 8,000 and 12,000 ppm. At the beginning of experiment, the crude extract at concentration of 12,000 ppm reduces load of *E. coli* contamination better to washed with clorox 120 ppm and washed with distilled water only. And still be able to control up to 6 hour after experiment, However, at 24 hour after experiment, every treatments gave the results of *E. coli* contamination higher than 100 cfu/ml.

Keywords : plant extracts, Pomegranate, Kitchen Mint, *E. coli,* contamination

บทคัดย่อ

การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดพืชชนิดต่างๆ เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในการผลิตผักสด ได้ดำเนินการโดยเริ่มจากการสกัดสารสกัดหยาบจาก เปลือกผลทับทิมจากแหล่งต่างๆ ใบทับทิม ใบฝรั่ง เหง้าข่า รากกระชาย และเปลือกผลมังคุด โดยใช้ 95 % EtOH เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เมื่อวัดปริมาณผลผลิตสารสกัดหยาบที่ได้ พบว่าเปลือกผลมังคุดให้ผลผลิตสูงสุดคือ 745.44 mg/g น้ำหนักแห้ง รองลงมาคือเปลือกผลทับทิมพันธุ์ศรีปัญญา และเปลือกผลทับทิมผงให้ผลผลิต 465.97 และ 302.99 mg/g น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อในระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธี filter paper disc method พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมทุกชนิดให้ผลการควบคุมเชื้อ *E. coli* ขณะที่สารสกัดจากพืชอื่นไม่มีผลในการควบคุม จึงเลือกกลุ่มสารสกัดเปลือกผลทับทิมมาทำการประเมินความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถควบคุมเชื้อได้ ด้วยวิธี Gradient plate technique พบว่าอยู่ที่ประมาณ 4000 ppm และได้เลือกสารสกัดเปลือกผลทับทิมผงที่ความเข้มข้น 4000 8000 และ 12000 ppm มาทำการทดสอบการควบคุมการปนเปื้อนในผักสะระแหน่ พบว่าที่ความเข้มข้น 12000 ppm ช่วยลดการปนเปื้อนเริ่มต้นได้ดีกว่าการล้างด้วยคลอร็อกซ์ 120 ppm และการล้างน้ำกลั่นอย่างเดียว และยังคงฤทธิ์การควบคุมถึงช่วง 6 ชม.หลังการทดลอง อย่างไรก็ตาม ที่ 24 ชม.หลังการทดลองไม่มีกรรมวิธีใดที่สามารถควบคุมการปนเปื้อนให้ต่ำกว่า 100 cfu/ml

คำสำคัญ : สารสกัด เปลือกผลทับทิม สะระแหน่ ปนเปื้อน ผักสด

คำนำ

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชผักสดเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทย แม้ว่าจะมีปริมาณและมูลค่าการส่งออกไม่สูงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับพืชเศรษฐกิจอื่นๆ แต่ปริมาณการใช้พืชผักสดและเครื่องปรุงประเภทสมุนไพร ถูกนำไปประกอบในอาหารที่มีชื่อเสียงของไทยหลายชนิด ทำให้สินค้าประเภทนี้เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมและการส่งออกสินค้าเกษตรอื่นๆ ได้แก่ กุ้ง และไก่ ดังนั้นปัญหาที่จะเกิดขึ้นกับการส่งออกสินค้าพืชผักสด เช่น การใช้มาตรการเข้มงวดหรือการระงับการนำเข้าจากประเทศผู้ซื้อ เนื่องจากการตรวจพบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ซึ่งเป็นประเด็นปัญหาใหม่ที่ถูกหยิบยกขึ้นมาเป็นเหตุผลในการกีดกันทางการค้า นอกเหนือจากการตกค้างของสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการส่งออกสินค้าเกษตรของประเทศทั้งทางตรงและทางอ้อม

นอกเหนือจากปัญหาด้านการส่งออกแล้ว ความปลอดภัยของผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศก็เป็นสิ่งที่ควรให้ความสำคัญไม่ยิ่งหย่อนไปกว่ากัน เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ที่พบการปนเปื้อนนั้นเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อเกิดโรคให้กับมนุษย์ คือ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. โดยเชื้อ *E. coli* ทำให้เกิดอาการท้องเสีย และเป็นเชื้อที่บ่งชี้ว่ามีสุขลักษณะการผลิตที่ไม่เหมาสม สำหรับเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นเชื้อโรคร้ายแรง ทำให้เกิดโรคไทฟอยด์และท้องร่วงรุนแรง เชื้อทั้งสองชนิดดังกล่าวเป็นเชื้อที่พบใน

ประเทศไทย และมีหลายสายพันธุ์ อาจพบได้ในน้ำ และในดิน จึงทำให้มีโอกาสปนเปื้อนในระบบการผลิตพืชผักหลายชนิด ในกระบวนการผลิตอาหารให้ปลอดภัยจะต้องคำนึงถึงการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ และมีมาตรการสำหรับควบคุมเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้

กรมวิชาการเกษตรได้ออกประกาศกรมวิชาการเกษตรกำหนดหลักเกณฑ์วิธีการและเงื่อนไขการส่งออกผักรวม 23 ชนิด ได้แก่ ผักชีไทย ผักชีฝรั่ง ใบกระเพรา ใบโหระพา ผักแขยง ใบสะระแหน่ ผักแพรว ต้นหอม ผักคื่นไช่ ใบกุยไช่ ดอกกุยไช่ ชะอม ตะไคร้ ผักบุ้ง ผักแว่น ผักกระเฉด ใบบัวบก ใบชะพลู ผักโขมแดง ถั่วผักยาว หน่อไม้ฝรั่ง พริกขี้หนู และผักปลัง ให้มีการผลิตอย่างเป็นระบบที่สามารถทวนสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตได้ ตั้งแต่แปลงเกษตรกรที่จะต้องได้รับรองระบบ GAP (Good Agricultural Practice) โรงคัดบรรจุที่ได้การรับรองกระบวนการผลิต GMP (Good Manufacturing Practice) และผู้ส่งออกจดทะเบียนจากกรมวิชาการเกษตร

เนื่องจากผักสดเป็นผลิตผลทางการเกษตรที่มีการเสื่อมสภาพได้ง่าย กระบวนการผลิตจึงผ่านวิธีการที่สะอาดและปลอดภัยต่อการบริโภค จากรายงานการเกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจาก การบริโภคผักผลไม้ พบว่ามีสาเหตุมาจากผักเป็นส่วนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งผักสลัด ซึ่งมักเป็นผักสดที่ต้องผ่านการจับต้องจากผู้ประกอบอาหาร ดังนั้น ผู้ที่ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องจึงต้องระมัดระวังเรื่องสุขอนามัยเป็นอย่างยิ่ง แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษและมักพบว่าปนเปื้อนมากับ ผักผลไม้พร้อมบริโภค คือ *Escherichia coli* O 157 : H7, *Listeria monocytogenes*, *Shigella*, *Salmonella* และไวรัสตับอักเสบเอ (Singh *et.al*., 2002)

นอกจากผัก-ผลไม้จะมีการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลงหรือสารเคมีแล้ว ยังมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม โดยอาจมาจากดิน น้ำ หรือปุ๋ย (Brackett, 2000) ชนิดของแบคทีเรียที่มักพบในดินและทำให้เกิดโรค คือ *Bacillus*, *Clostridium* และ *Listeria* โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่สามารถสปอร์ที่ทนต่อความร้อน เช่น *Clostridium botulinum* และ *Clostrtidium perfringens* บริเวณพื้นที่ที่ใช้เลี้ยงสัตว์มักมี จุลินทรีย์ที่ อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปะปนออกมากับสิ่งขับถ่ายของสัตว์ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในมนุษย์ ดังนั้นการใช้ปุ๋ยคอกบำรุงพืชอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนสู่อาหาร เช่น มีการตรวจพบแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* และ *Escherichia coli* O157:H7 ที่ใบและรากของผักที่ปลูกโดยการใช้ปุ๋ยคอก (Natving *et.al*., 2002) นอกจากนี้ยังพบว่า *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* สามารถรอดชีวิตอยู่ในปุ๋ยคอกได้เป็นระยะเวลานาน (Tauxe, 1997; Brackett, 1999) ผักผลไม้ต่างชนิดกันจะมีจำนวนและชนิดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนต่างกัน จำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนเริ่มต้นจะบ่งถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยหากมีจุลินทรีย์เริ่มต้นปนเปื้อนในวัตถุดิบมาก จะทำให้ผักผลไม้มีคุณภาพที่ด้อยลงและมีอายุการเก็บที่สั้นกว่าปกติ (Zagory, 1999)

การใช้น้ำในการล้างและกำจัดสิ่งสกปรกที่ผิวผักจะช่วยยืดอายุการเก็บ การเติมสารฆ่าเชื้อลงในน้ำล้างจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดจุลินทรีย์ที่ผิวเพิ่มขึ้นประมาณ 100 เท่า (Burnett and Beuchat,

2001) การฆ่าเชื้อจะมีประสิทธิภาพเพียงใดขึ้นกับกลไกในการทำลายจุลินทรีย์ของสารนั้นๆ ชนิดจุลินทรีย์ ชนิดของผักและบริเวณที่จุลินทรีย์ยึดเกาะ เช่น บริเวณที่เป็นร่องลึกล้างทำความสะอาดได้ยากกว่าบริเวณที่เป็นผิวเรียบ

โดยทั่วไปนิยมใช้คลอรีนในการการล้างผักและผลไม้ โดยใช้ในรูปของสารละลายไฮโปคลอไรต์ ปริมาณ 50-200 ppm (Active chlorine) อย่างไรก็ตามไม่ควรนำน้ำที่ใช้ในการล้างผักและผลไม้กลับมาหมุนเวียนใช้ใหม่ เพราะจะทำให้มีการสะสมของจำนวนจุลินทรีย์มากขึ้นและเป็นการเพิ่มการปนเปื้อนให้กับตัววัตถุดิบ (Hulland, 1980) สารอินทรีย์ที่สะสมในน้ำจะทำให้ประสิทธิภาพของคลอรีนลดลง นอกจากนี้จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้านทานต่อคลอรีนที่แตกต่างกัน *Listeria monocytogenes* มีความต้านทานต่อคลอรีนมากกว่า *Salmonella* และ *E. coli* O157:H7 (Burnett and Beuchat, 2001)

นอกจากสารประกอบคลอรีนแล้ว ยังมีสารอีกหลายชนิดที่นิยมนำมาใช้กับผัก เช่น คลอรีนไดออกไซค์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหรือแอมโนเนียเกิดเป็นคลอรามีนซึ่งเป็นสารที่เป็นพิษ Food and Drug Administration แห่งประเทศสหรัฐอเมริกา (USFDA) อนุญาตให้ใช้คลอรีนไดออกไซด์ในการล้างผักและผลไม้ (Singh *et.al*., 2002) นอกจากนี้ยังมีการใช้โอโซนซึ่งได้รับการรับรองแล้วว่าเป็นสารทีมีความ ปลอดภัยที่จะนำมาใช้กับอาหาร (Generally Recognized as Safe-GRAS) เพื่อล้างผักและผลไม้ (Xu, 1999) โดยโอโซนสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคได้หลากชนิดกว่าคลอรีน

ผักประเภทใบเป็นผักที่มีโอกาสในการปนเปื้อนสูงที่สุด เนื่องจากมีพื้นผิวสัมผัสมากทำให้ง่ายต่อการยึดเกาะของจุลินทรีย์ ถึงแม้ว่าการตัดแต่งส่วนที่เน่าเสียออกก่อนการล้างจะช่วยกำจัดจุลินทรีย์ออกบางส่วนก็ตาม แต่การตัดแต่งอาจทำให้เนื้อเยื่อพืชฉีกขาดทำให้จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับ น้ำหรือสิ่งแวดล้อมสามารถเข้าทำลายได้ง่ายขึ้น ผักบางชนิดไม่สามารถทำความสะอาดโดยวิธีการล้างเนื่องจากมีลักษณะทางกายภาพที่ค่อนข้างช้ำได้ง่าย เช่น พริกหวาน (Green pepper) จึงอาจใช้การฉายรังสีที่ความเข้มต่ำ (Low dose ionizing radiation) (NACMCF, 1999) ทดแทนเพื่อยืดอายุการเก็บ

ด้วยเหตุที่ผักมักพบการปนเปื้อนที่ผิวโดยอาจเนื่องมาจากเซลล์อาจเกิดความเสียหาย ตั้งแต่แปลงเพาะปลูก จากการเข้าทำลายของแมลง นกหรือจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังอาจเกิดความเสียหายในระหว่างการเก็บเกี่ยว เมื่อผักผลไม้เข้าสู่กระบวนการผลิต กรรมวิธีการผลิตก็อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์พืชสูญเสียความแข็งแรง สารอาหารภายในเซลล์จึงออกมาภายนอก ทำให้จุลินทรีย์ที่ผิวพืชสามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญและเพิ่มจำนวน หากกำจัดจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคเหล่านี้ไม่หมดในระหว่างกระบวนการผลิต หรือประกอบอาหาร และผู้บริโภครับประทานเข้าไปจะทำให้ผู้บริโภคได้รับโรคอาหารเป็นพิษในที่สุด การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดพืชชนิดต่างๆ เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในการผลิตผักสด

อุปกรณ์และวิธีการ

1 การเตรียมสารสกัดพืช

โดยนำตัวอย่างพืชแห้ง ได้แก่ เปลือกผลทับทิม (จากต้นทับทิมในบริเวณอาคารสำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร) เปลือกผลทับทิมพันธุ์ศรีปัญญา เปลือกผลทับทิมผง ใบทับทิม ใบฝรั่ง เหง้าข่า รากกระชาย และเปลือกผลมังคุด มาบดให้ละเอียด แล้วสกัดด้วย 95 % EtOH นานข้ามคืน (overnight) กรองส่วนของเหลวเก็บไว้ กากที่ได้นำมาสกัดซ้ำตามวิธีการเดิมอีก 2 ครั้ง รวบรวมของเหลวที่สกัดได้เข้าด้วยกันเป็นสารสกัดหยาบ นำมาลดปริมาตรด้วย vacuum rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 55 °C วัดปริมาณผลผลิตสารสกัดที่ได้ต่อกรัมตัวอย่างพืชแห้ง

2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืชในการควบคุมเชื้อ E. coli ในระดับห้องปฏิบัติการ

นำสารสกัดพืชที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี filter paper disc method (Dhingra และ James, 1995) โดย

- เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีเชื้อ *E. coli* ความหนาแน่น 10^{-4} cfu/ml ในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 9 ซม.
- เตรียมชิ้นกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำมาหยดด้วยสารสกัดจากพืชสมุนไพรความเข้มข้น 4,000 และ 8,000 ppm ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้ง แล้วหยดซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยมีชิ้นกระดาษกรองที่หยด 95 % EtOH เป็นตัวเปรียบเทียบ นำชิ้นกระดาษกรองวางลงในจานเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่เตรียมไว้ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสที่เกิดขึ้นทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 วัน

3. การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้สารสกัดพืช

ทำการประมาณค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดพืชในการนำมาใช้ควบคุมเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี Gradient plate technique (Dhingra และ James, 1995) (Figure 1) โดยเตรียมจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. นำอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ผสมสารสกัดจากพืชที่ความเข้มข้น 8,000 ppm ปริมาตร 5 ml ต่อจาน เทลงในจานเลี้ยงเชื้อแล้วเอียงจานเลี้ยงเชื้อให้ความหนาของอาหารด้านหนึ่งของจานหนาและอีกด้านหนึ่งบางลงถึงก้นจานเลี้ยงเชื้อ เมื่ออาหารแข็งตัวจึงวางจานเลี้ยงเชื้อให้ได้ระดับเดียวกันทั้งสองด้านแล้วเททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ปกติปริมาตร 5 ml ต่อจาน จากนั้นนำ loop เขี่ยเชื้อแตะเชื้อ *E. coli* แล้วขีดบนผิวหน้าอาหารเป็นเส้นตรงจากขอบด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่งของจานตามแนวการเอียงของอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดความยาวโคโลนีที่เกิดขึ้นที่ 48 ชั่วโมง

4. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืชเพื่อลดการปนเปื้อนในผักสะระแหน่ระหว่างการเก็บรักษา

ผลจากการทดลองที่ 1 พบว่าผงเปลือกผลทับทิมให้ผลผลิตสารสกัดมากเป็นอันดับสอง รองจากสารสกัดเปลือกผลมังคุด จากการทดลองที่ 2 พบว่ากลุ่มสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *E. coli* และจากการทดลองที่ 3 พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมผงมีค่าประมาณของความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้อยู่ที่ประมาณ 4,000 ppm จึงเลือกสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมผงมาทำการทดลองการลดการปนเปื้อนในผักสะระแหน่ระหว่างการเก็บรักษา โดยกำหนดความเข้มข้นของสารสกัดเริ่มต้นที่ 4,000 ppm

เตรียมสะระแหน่ตามขั้นตอนของโรงคัดบรรจุโดยล้างน้ำประปา 2 ครั้งแล้วตามด้วยกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ทำอะไรเลย

กรรมวิธีที่ 2 ล้างด้วยน้ำกลั่น (control 0 ppm)

กรรมวิธีที่ 3 ล้างด้วยเอทานอล (control solvent)

กรรมวิธีที่ 4 ล้างด้วยคลอร็อกซ์ 120 ppm

กรรมวิธีที่ 5 ล้างด้วยสารสกัดเปลือกผลทับทิมผง 12,000 ppm

กรรมวิธีที่ 6 ล้างด้วยสารสกัดเปลือกผลทับทิมผง 8,000 ppm

กรรมวิธีที่ 7 ล้างด้วยสารสกัดเปลือกผลทับทิมผง 4,000 ppm

ล้างน้ำอีก 1 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง บรรจุถุงพลาสติก 100 กรัมต่อถุง เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ 12 °C และตรวจสอบเชื้อเชื้อ *E. coli* ในสะระแหน่ด้วยวิธี plate count technique วางแผนการทดลองประกอบด้วย 7 กรรมวิธี 4 ซ้ำ โดยมีหน่วยทดลอง (experiment unit) เท่ากับ 3 จานเลี้ยงเชื้อ นับจำนวน cfu/ml ที่ 0, 6 และ 24 ชม. หลังการทดลอง

ผลการทดลองและวิจารณ์

1 การเตรียมสารสกัดพืช

จากการสกัดสารสกัดพืชจากตัวอย่างพืชแห้งมีปริมาณผลผลิตสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนัก 1 กรัมตัวอย่างพืชแห้ง ได้ผลตาม Table 1 โดยพบว่าพืชที่ให้ผลผลิตสารสกัดมากที่สุดคือเปลือกผลมังคุด ให้สารสกัด 745.44 mg/g Sample DW รองลงมาคือเปลือกผลทับทิมพันธุ์ศรีปัญญา และเปลือกผลทับทิมผง ให้ปริมาณสารสกัด 465.97 และ 302.99 mg/g sample DW ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหากเปลือกผลมังคุดมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *E. coli* ที่ดีก็จะเป็นพืชที่มีศักยภาพในการผลิตสารสกัดหยาบซึ่งมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ผลิตในปริมาณมากได้ อย่างไรก็ตาม แม้ว่าเปลือกผลทับทิมพันธุ์ศรีปัญญา และเปลือกผลทับทิมผงที่ให้ผลผลิตต่ำกว่าแต่ก็ยังอยู่ในระดับที่สูงพอที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้

2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืชในการควบคุมเชื้อ *E. coli* ในระดับห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *E. coli* ในระดับห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี filter paper disc method พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมทุกชนิดให้ผลการควบคุมเชื้อ *E. coli* โดยการสร้างบริเวณใส (clear zone) รอบชิ้นกระดาษกรองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยที่สารสกัดเปลือกผลทับทิม สวป. ความเข้มข้น 8,000 ppm มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสกว้างที่สุดคือ 1.32 ซม. รองลงมาคือสารสกัดเปลือกผลทับทิมผงความเข้มข้น 8,000 ppm และสารสกัดเปลือกผลทับทิมพันธุ์ศรีปัญญาความเข้มข้น 4,000 ppm มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส 1.27 และ 1.22 ซม.ตามลำดับ (Table 2) ขณะที่สารสกัดจากพืชอื่นไม่มีการสร้างบริเวณใส

3. การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้สารสกัดพืช

เนื่องจากผลการทดลองที่ 2 แสดงให้เห็นว่ากลุ่มสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมทุกชนิดให้ผลการควบคุมเชื้อ *E. coli* ได้ดี จึงเลือกเฉพาะกลุ่มสารสกัดนี้มาทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี Gradient plate technique จากการทดลองพบว่าความยาวของโคโลนีเชื้อบน gradient agar ที่สั้นที่สุดคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารสกัดเปลือกผลทับทิมผง โดยมีความยาว 4.10 ซม. รองลงมาคือ สารสกัดเปลือกผลทับทิมศรีปัญญาและสารสกัดเปลือกผลทับทิม สวป. มีความยาว 4.15 และ 4.66 ซม. ตามลำดับ (Table 3) อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบความยาวของโคโลนีเชื้อ *E. coli* บนอาหารที่ผสมสารสกัดกับความยาวของโคโลนีบนอาหารที่ไม่ได้ผสมสารสกัด (control) พบว่าค่าประมาณของความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้อยู่ที่ประมาณ 4,000 ppm

4. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืชเพื่อลดการปนเปื้อนในผักสะระแหน่ระหว่างการเก็บรักษา

จากการทดลองที่ 1 พบว่าสารสกัดจากผงเปลือกผลทับทิมให้ผลผลิตสารสกัดต่อกรัมตัวอย่างพืชแห้งเป็นอันดับสองรองจากสารสกัดเปลือกผลมังคุด และการทดลองที่ 2 พบว่ามีเพียงสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมเท่านั้นที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *E. coli* และจากการทดลองที่ 3 พบว่ากรรมวิธีสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมผงมีความยาวโคโลนีเชื้อ *E. coli* สั้นที่สุด เมื่อทำการทดสอบผลของ

สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมผงที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อการลดการปนเปื้อนในผักสะระแหน่ระหว่างการเก็บรักษา พบว่าที่ระยะเริ่มการทดลอง (o hr) ค่าการปนเปื้อนในกรรมวิธีที่ 1 (ไม่ทำอะไรเลย) อยู่ที่ 151 cfu/ml (Table 4) ซึ่งเป็นค่าการปนเปื้อนเริ่มต้นของสะระแหน่ ขณะที่กรรมวิธีที่ใช้สารสกัดเปลือกผลทับทิมผง 12,000 ppm มีค่าต่ำที่สุด (46 cfu/ml) ล้างคลอร็อกซ์ 120 ppm อยู่ที่ 112 cfu/ml ล้างน้ำกลั่น (control 0 ppm) อยู่ที่ 125 cfu/ml เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชม. (6 hr) ค่าการปนเปื้อนใน Tr1 non-treated เพื่อขึ้นเป็น 335 cfu/ml ขณะที่ทรีตเม้นที่ใช้สารสกัดเปลือกผลทับทิมผง 12,000 ppm อยู่ที่ 61 cfu/ml ล้างคลอร็อกซ์ 120 ppm อยู่ที่ 47 cfu/ml ล้างน้ำกลั่น (control 0 ppm) อยู่ที่ 100 cfu/ml และที่ 24 ชม. (24 hr) ค่าการปนเปื้อนใน Tr1 non-treated เพื่อขึ้นเป็น 425 cfu/ml ขณะที่ทรีตเม้นที่ใช้สารสกัดเปลือกผลทับทิมผง 12,000 ppm อยู่ที่ 354 cfu/ml ล้างคลอร็อกซ์ 120 ppm อยู่ที่ 412 cfu/ml ล้างน้ำกลั่น (control 0 ppm) อยู่ที่ 501 cfu/ml จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากผงเปลือกผลทับทิมที่ความเข้มข้น 12,000 ppm (เทียบเท่ากับ 18.179 กรัมน้ำหนักแห้งของผงเปลือกทับทิมต่อน้ำ 1 ลิตร) ช่วยลดการปนเปื้อนเริ่มต้นได้ดีกว่าการล้างด้วยคลอร็อกซ์ 120 ppm และการล้างน้ำกลั่นอย่างเดียว และยังคงฤทธิ์การควบคุมถึงช่วง 6 ชม.หลังการทดลอง อย่างไรก็ตาม ที่ 24 ชม.หลังการทดลองไม่มีกรรมวิธีใดที่สามารถควบคุมการปนเปื้อนให้ต่ำกว่า 100 cfu/ml ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานการปนเปื้อนที่ยอมให้พบได้ในผักสดส่งออกไปยังกลุ่มสหภาพยุโรป ด้วยเหตุนี้ การระมัดระวังในกระบวนการผลิตผักสดไม่ให้มีระดับการปนเปื้อนเริ่มต้นของเชื้อ *E. coli* ก่อนเข้าโรงคัดบรรจุที่สูงเกินไป ยังคงเป็นสิ่งที่ต้องให้ความสำคัญ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

- จากการการสกัดสารสกัดพืชจากตัวอย่างพืชแห้งพบว่าสารสกัดจากผงเปลือกผลทับทิมให้ผลผลิตสารสกัดต่อกรัมตัวอย่างพืชแห้งมากเป็นอันดับสองรองจากสารสกัดเปลือกผลมังคุด

- การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืชในการควบคุมเชื้อ *E. coli* ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่ามีเพียงสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมเท่านั้นที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *E. coli*

- จากการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้สารสกัดพืช พบว่ากรรมวิธีสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมผงมีความยาวโคโลนีเชื้อ *E. coli* สั้นที่สุด มีค่าประมาณของความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้อยู่ที่ประมาณ 4,000 ppm

- การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืช เพื่อลดการปนเปื้อนในผักสะระแหน่ระหว่างการเก็บรักษา สารสกัดจากผงเปลือกผลทับทิมที่ความเข้มข้น 12,000 ppm ซึ่งเทียบเท่ากับ 18.179 กรัมน้ำหนักแห้งของผงเปลือกทับทิมต่อน้ำ 1 ลิตร ช่วยลดการปนเปื้อนเริ่มต้นได้ดีกว่าการล้างด้วยคลอร็อกซ์ 120 ppm และการล้างน้ำกลั่นอย่างเดียว และยังคงฤทธิ์การควบคุมถึงช่วง 6 ชม.หลังการทดลอง อย่างไรก็ตาม ที่ 24 ชม.หลังการทดลองไม่มีกรรมวิธีใดที่สามารถควบคุมการปนเปื้อนให้ต่ำกว่า 100 cfu/ml

เอกสารอ้างอิง

Brackett, R.E. 1999. Incidence, contributing factors and control of bacterial pathogens in produce. Postharvest Biological and Technology 15, 305-311.

Burnett, S.L. and Beuchat, L.R. 2001. Food-borne pathogens: human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices and difficulties in decontamination. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 27, 107-110.

Dhingra, Onkar D. and James B. Sinclair. 1995. Basic plant pathology methods. 2nd ed., CRC. Press, Boca Raton. 434 p.

Hulland, E.D. 1980. Hygienic handling and the influence of raw material condition, pp. 143-153. In : Jowitt, R. (Editor), Hygienic Design and Operation of Food Plant. Westport: The AVI Publishing Company, Inc.

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF). 1999. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. Food Control 10, 117-143.

Natvig, E.E., Ingham, S.C., Ingham, B.H., Cooperband, L.R. and Roper, T.R. 2002. *Salmonella enterica* serovars *typhimurim* and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. Applied and Environmental Microbiology 68, 2737-2744.

Singh, N., Singh, R.K., Bhunia, A.K. and Stroshine, R.L. 2002. Effect of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against *Eshcerichia coli* O157:H7. Food Microbiology 19, 183-193.

Tauxe, R.V. 1997. Emerging food borne diseases: an evolving public health challenge. Special issue : Emerging Infectious Diseases 3, 425-434.

Xu, L. 1999. Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. Food Technology 53, 58-63.

Zagory, D. 1999. Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations. Postharvest Biology and Technology 15, 313-321.

ภาคผนวก

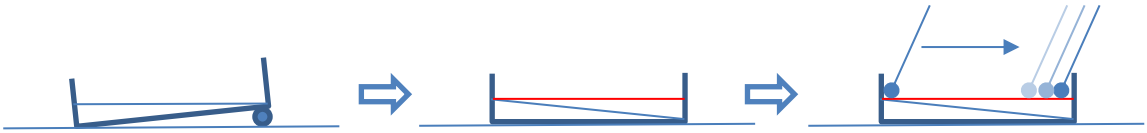

Figure 1 Gradient plate technique

Table 1 Yield of plant extracts (mg/g sample dry weight) extracted from dried plant samples with 90 % EtOH.

Plants	Yields [1/](mg/g sample DW)
Pomegranate (*Punica Granatum*) fruit rind 'PPRDO'	294.56
Pomegranate fruit rind cultivar 'Sripanya'	465.97
Pomegranate fruit rind commercial powder	302.99
Pomegranate leaf	183.31
Guava (*Psidium guajava*) leaf	9.77
Galanga (*Alpinia galanga*) rhizome	28.23
Finger root (*Boesenbergia rotunda*)	7.49
Mangosteen (*Garcinia mangostana*) fruit rind	745.44

[1/] Yields (mg) = Extracts Wt. (mg)/Sample DW (g)

Table 2 Clear zone diameter (cm) from plant extracts against E. coli on nutrients agar (NA) with filter paper disc method. (Dhingra and James, 1995)

Plant extracts	Concentrations (ppm)	Clear zone diameter (cm)
Pomegranate (*Punica Granatum*) fruit rind 'PPRDO'	4,000	1.17[1/]
	8,000	1.32
Pomegranate fruit rind cultivar 'Sripanya'	4,000	1.22
	8,000	1.20
Pomegranate fruit rind commercial powder	4,000	1.17
	8,000	1.27
Pomegranate leaf	4,000	0
	8,000	0
Guava (*Psidium guajava*) leaf	4,000	0
	8,000	0
Galanga (*Alpinia galanga*) rhizome	4,000	0
	8,000	0
Finger root (*Boesenbergia*	4,000	0

rotunda)	8,000	0
Mangosteen (*Garcinia*	4,000	0
mangostana) fruit rind	8,000	0

[1/]Average of 4 replications

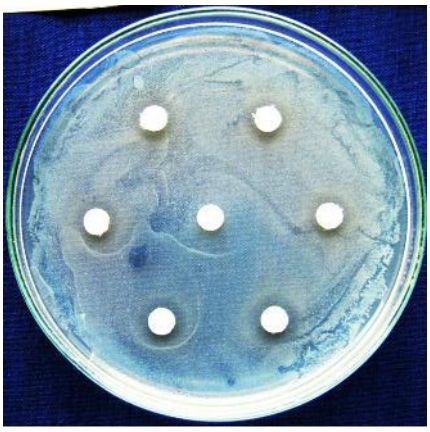

Figure 2 Efficiency of pomegranate rind extract to inhibit *E. coli* in the laboratory by using filter paper disc method.

Table 3 The average length of *E. coli* colonies (cm) on Nutrients agar (NA) mixed with extracts of pomegranate, at 8,000 ppm concentration using Gradient plate technique.

NA mixed with extracts	length of colonies [1/]
Pomegranate (*Punica Granatum*) fruit rind cultivar 'Sripanya'	4.15[1/]
Pomegranate fruit rind 'PPRDO'	4.66
Pomegranate fruit rind commercial powder	4.10
Not mixed (control)	9.00

[1/] Average of 10 replications

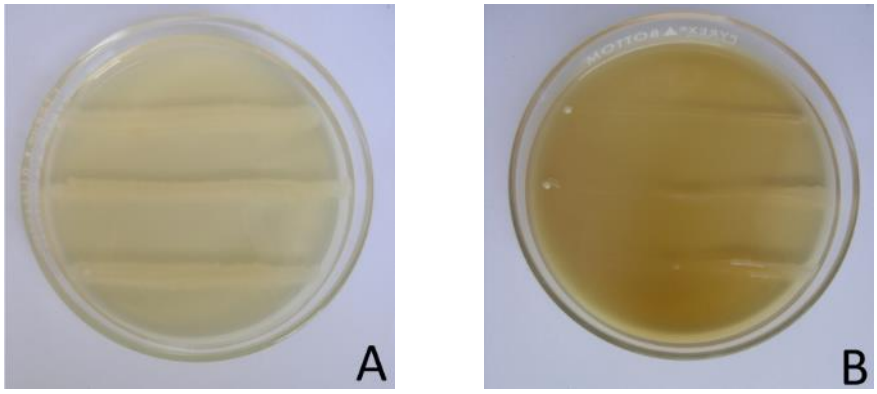

Figure 3 Colonies of *E. coli* growing on nutrient agar (A) not mixed (control) and (B) are mixed with extracts of pomegranate rind at concentrations of 0 to 8000 ppm by using Gradient plate technique.

Table 4 The amount of *E. coli* contamination (cfu/ml) in the Kitchen Mint (*Melissa officinalis*) leaves washed with extracts from Pomegranate fruit rind commercial powder (PCP) at concentrations of 0, 4000, 8000 and 12000 ppm compared to Non treated and Clorox 120 ppm

	Treatments	0 hr	6 hr	24 hr
1	Non treated	151[1/]	335	425
2	Washed with distilled water (control 0 ppm)	125	100	501
3	Washed with ethanol (control solvent)	196	81	118
4	Washed with Clorox 120 ppm	112	47	412
5	Washed with PCP extract at 12,000 ppm	46	61	354
6	Washed with PCP extract at 8,000 ppm	85	213	478
7	Washed with PCP extract at 4,000 ppm	64	185	314

[1/] Average of 4 replications