RESEARCH ARTICLE

Effect of *Punica granatum* L. Rind Extract Against *Salmonella* Enteritidis on Eggshells and Eggshell Membranes

Tawatchai Pohuang[1], Kanlaya Chuachan[1*], Kingkarn Sarachu[1]

Abstract

Objective — To evaluate efficacy of *Punica granatum* L. rind extracted by 95% ethyl alcohol against *Salmonella* Enteritidis localized on eggshells and eggshell membranes.

Materials and Methods — *Punica granatum* L. rinds were dried, grinded and macerated with 95% ethyl alcohol. The macerated product was then dried with a rotary evaporator. Concentration of the extract solution was prepared either 1.25% or 2.5% (w/v) in distilled water. To test efficacy of the extract against *S.* Enteritidis, we dipped eggs in 3X (1/10 of 0.5 McFarland) concentration of *S.* Enteritidis for 1 minute, and additionally dipped in 1.25 or 2.5% (w/v) of the extracted solution for 5 or 10 minutes. Then, the eggshells and eggshell membranes were sampled to test for the presence of *Salmonella* group D.

Results — Concentration of *S.* Enteritidis at 3X (1/10 of 0.5 McFarland) was suitable for this study, because it was the lowest concentration that still caused 100% contamination on eggshells and eggshell membranes, even after dipping eggs in PBS for 5 minutes. However, after contaminated eggs were dipped in the extract of *Punica granatum* L. with conditions described as the above, their shells and membranes were still contaminated with *Salmonella* group D. Rates of contaminated eggs were not different between treated and control groups.

Conclusion — The alcohol extract of *Punica granatum* L. rind cannot completely eliminate *S.* Enteritidis localized on eggshells and eggshell membranes when the extract was used at concentration 1.25%, or 2.5% by dipping contaminated eggs for 10 minutes.

KKU Vet J. 2009;19(1):38-47 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

Keywods: *Punica granatum* L. rind; Extract; *Salmonella* Enteritidis; Eggshell; Eggshell membrane

[1]Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand 40002

*__Corresponding Author__ E-mail: kchuachan@hotmail.com, kanchu1@kku.ac.th

ผลของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม (*Punica granatum* L.) ต่อการต้านเชื้อ *Salmonella* Enteritidis บนเปลือกไข่และเยื่อไข่

ธวัชชัย โพธิ์เฮือง[1], กัลยา เจือจันทร์[1*], กิ่งกาญจน์ สาระชู[1]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม (*Punica granatum* L.) ที่สกัดโดยใช้เอธิลแอลกอฮอล์ 95% ต่อการทำลายเชื้อ *Salmonella* Enteritidis บนเปลือกไข่และเยื่อไข่

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ นำเปลือกผลทับทิมแห้งมาบดให้เป็นผง จากนั้นหมัก (macerate) ในเอธิลแอลกอฮอล์ 95% สารสกัดที่ได้นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) จนได้ผงสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม นำผงสารสกัดที่ได้มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1.25% หรือ 2.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วทดสอบการทำลายเชื้อ *S.* Enteritidis บนเปลือกไข่และเยื่อไข่ ซึ่งไข่ถูกทำให้ติดเชื้อ *S.* Enteritidis โดยการจุ่มสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis ความเข้มข้น 3X (1/10 ของ 0.5 McFarland) นาน 1 นาที จากนั้นนำไข่ดังกล่าวมาจุ่มในสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมเป็นเวลา 5 หรือ 10 นาที ต่อมานำเปลือกไข่และเยื่อไข่ที่ผ่านการทดลองไปตรวจหาเชื้อ *Salmonella* group D

ผลการศึกษา ความเข้มข้นของเชื้อ *S.* Enteritidis ที่เหมาะสม ที่ทำให้พบเชื้อที่เปลือกไข่และเยื่อไข่ได้ 100% แม้ทำการตรวจหลังจากจุ่มไข่ใน PBS นาน 5 นาทีคือ ความเข้มข้น 3X (1/10 ของ 0.5 McFarland) และเมื่อนำไข่ที่ผ่านการจุ่มสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis ความเข้มข้นดังกล่าวนาน 1 นาที มาจุ่มฆ่าเชื้อด้วยสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมที่ความเข้มข้น 1.25% หรือ 2.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 5 หรือ 10 นาที พบว่าให้ผลในการพบเชื้อ *Salmonella* group D ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้จุ่มสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม

ข้อสรุป สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมในระดับความเข้มข้น 1.25% และ 2.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไม่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *S.* Enteritidis บนเปลือกไข่และเยื่อไข่ได้หมด เมื่อสารสกัดนี้มีเวลาสัมผัสเชื้อดังกล่าวเพียง 10 นาที

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2552;19(1):38-47 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

คำสำคัญ: เปลือกผลทับทิม สารสกัด *Salmonella* Enteritidis เปลือกไข่ เยื่อไข่

[1]ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

* **ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ** E-mail: kchuachan@hotmail.com, kanchu1@kku.ac.th

บทนำ

โรคติดเชื้อซัลโมเนลลา (salmonellosis) เป็นโรคที่ทำให้เกิดอาการท้องร่วงในคน พบได้ทั้งในประเทศไทยและประเทศต่างๆ ทั่วโลก สาเหตุเกิดจากเชื้อซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.) ซึ่งมีหลายซีโรไทป์ โดยพบว่าเชื้อ *Salmonella* Enteritidis เป็นซีโรไทป์ที่มีอุบัติการณ์สูงขึ้นเรื่อยๆ จากการเฝ้าระวังและติดตามการระบาดโดยศูนย์ทดสอบซัลโมเนลลาและชิกเกลลาแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข (National Salmonella and Shigella Center, Thailand) และยังพบว่าปัญหาโรคท้องร่วงเนื่องจากเชื้อ *S.* Enteritidis ของประชากรในประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2543 ถึง พ.ศ. 2545 ตรวจพบเชื้อ *S.* Enteritidis จากผู้ป่วยคิดเป็น 7.5%, 8.6% และ 12.7% ตามลำดับ [1] การปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในสัตว์ปีกโดยเฉพาะไก่ และไก่งวง เป็นแหล่งแพร่เชื้อซัลโมเนลลามาสู่คน ผลการศึกษาของ Boonmar และคณะ [2] ในปี พ.ศ. 2539 พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาจากตัวอย่างเนื้อไก่สด ในอัตราที่ค่อนข้างสูง (จำนวน 72 จาก 100 ตัวอย่าง) และพบเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อไก่แช่แข็งจากโรงงานที่ส่งออกต่างประเทศ (จำนวน 20 จาก 200 ตัวอย่าง) รวมทั้งพบเชื้อซัลโมเนลลาจากอุจจาระไก่ในฟาร์มไก่ 3 แห่ง ในภาคตะวันออกของประเทศไทย (จำนวน 19 จาก 285 ตัวอย่าง) โดยพบซีโรไทป์ที่สำคัญ คือ *S.* Enteritidis จากเนื้อไก่ในตลาดสด 28% เนื้อไก่ส่งออก 4.5% และอุจจาระไก่ 6.6% นอกจากเนื้อไก่แล้วยังพบว่าไข่เป็นแหล่งของการปนเปื้อนเชื้อซัลโมเนลลาได้อีกทางหนึ่ง โดยเชื้อซัลโมเนลลาสามารถปนเปื้อนมากับไข่ได้สองวิธีคือ การติดเชื้อในอวัยวะสืบพันธุ์ของแม่ไก่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อในไข่ก่อนที่จะมีการสร้างเปลือกไข่ และการปนเปื้อนวิธีที่สองคือ เปลือกไข่สัมผัสเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่บริเวณช่องคลอด (vagina) ของแม่ไก่ แล้วเชื้อแทรกผ่านเปลือกไข่เข้าไป [3] จากรายงานของ Saitanu และคณะ [4] ได้ทำการสุ่มตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในไข่ที่ขายตามท้องตลาดของจังหวัดกรุงเทพมหานคร ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ลพบุรี นครราชสีมา และอ่างทอง พบว่าตัวอย่างไข่ที่สุ่มมาตรวจรวมทั้งหมดมีการปนเปื้อนของเชื้อบนเปลือกไข่ 13.2%

เนื่องจากไข่มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดรวมทั้งเชื้อ *S.* Enteritidis จึงมีการนำสารเคมีต่างๆ มาใช้ฆ่าเชื้อบนเปลือกไข่ เช่น quaternary ammonium [5] hydrogen peroxide [6] แต่การใช้สารเคมีเพื่อฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนบนเปลือกไข่ที่ใช้เพื่อการบริโภคนั้น อาจทำให้ผู้บริโภคไม่เชื่อมั่นในความปลอดภัย ดังนั้นจึงควรนำสารที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อและไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคมาใช้ทดแทนในปัจจุบันพบว่าสารสกัดที่ได้จากสมุนไพรหลายชนิดมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เช่น สารสกัดจากเปลือกผลทับทิม (*Punica granatum* L.) มีการใช้รักษาอาการท้องร่วงในคน [7] และมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* *Klebsiella pneumonia* *Proteus vulgaris* *Bacillus subtilis* และ *S.* Typhi [8] สารสำคัญในเปลือกผลทับทิมมีหลายชนิด หากพิจารณาแยกเป็นกลุ่มของสารสำคัญจะพบว่ามี flavonoids และ tannins เป็นส่วนประกอบหลัก [9] โดยเฉพาะ tannins พบได้ประมาณ 26-28% ของน้ำหนักแห้ง [10] และยังอาจพบสารกลุ่ม alkaloids และ saponin ได้ด้วย [11] อย่างไรก็ตามที่ผ่านมายังไม่มีรายงานระบุแน่ชัดว่านอกเหนือจาก tannins

แล้ว มีสารสำคัญชนิดใดอีกบ้างในส่วนของเปลือกผลทับทิมที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ และสารสำคัญชนิดต่างๆ เหล่านั้นออกฤทธิ์ร่วมกันหรือไม่อย่างไร ดังนั้นการใช้เอธิลแอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายจึงน่าจะเหมาะสมที่สุด เพราะแอลกอฮอล์มีความสามารถในการสกัดสารได้กว้าง [12] ทั้ง flavonoids, tannins และ alkaloids สามารถละลายได้ในตัวทำละลายชนิดนี้ [13] และจากการศึกษาของกัลยาและคณะ [14] พบว่า ผงสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมที่ได้จากการใช้เอธิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นตัวทำละลาย มีฤทธิ์ฆ่าทำลายเชื้อ *S.* Enteritidis ที่แยกได้จากไก่ และให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าทำลายเชื้อ (minimal bactericidal concentration) อยู่ระหว่าง 1.25-2.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้คณะผู้วิจัยสนใจศึกษาผลของสารสกัดจากผลทับทิมต่อการฆ่าเชื้อ *S.* Enteritidis บนเปลือกไข่ โดยต้องการทราบว่าสารสกัดที่ได้จากเปลือกผลทับทิมแห้งบดและหมัก (macerate) ด้วยเอธิลแอลกอฮอล์มีความสามารถในการทำลายเชื้อนี้บนเปลือกไข่และเยื่อไข่ (shell membrane) หรือไม่ โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดและระยะเวลาการจุ่มฆ่าเชื้อที่แตกต่างกัน

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม

ดัดแปลงจากวิธีของ Chulasiri และคณะ [15] โดยนำเปลือกผลทับทิมแห้งมาบดให้เป็นผงบรรจุใส่ถุงผ้า แล้วหมักในเอธิลแอลกอฮอล์ 95% โดยเติมเอธิลแอลกอฮอล์จนท่วม ทำการหมักซ้ำรวมทั้งหมด 12 ครั้ง โดยการหมักใน 6 ครั้งแรกหมักนานครั้งละ 1 คืน อีก 5 ครั้งต่อมาหมักนานครั้งละ 2 คืน และครั้งสุดท้ายหมักทิ้งไว้นาน 7 คืน ในการเก็บสารสกัดแต่ละครั้งจะกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman filter paper No. 1, Whatman, England) ถุงบรรจุกาก เปลือกผลทับทิมนำไปหมักตามขั้นตอนเดิม ส่วนที่เป็นของเหลวนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นภายใต้สุญญากาศ ผงสารสกัดหยาบที่ได้คือส่วนที่จะนำไปใช้ทดสอบต่อไป

***การเตรียมสารละลายเชื้อ S.* Enteritidis**

เชื้อ *S.* Enteritidis ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้เป็นเชื้อที่แยกได้จากไข่ตายโคม (dead-in-shell chicken embryo) จากโรงฟักไข่ไก่ของบริษัทเอกชนรายหนึ่งของประเทศไทย เมื่อปี พ.ศ. 2545 เตรียมเชื้อ *S.* Enteritidis ใน phosphate buffered saline (PBS) pH 7.0 ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland สารละลายเชื้อที่ได้นี้จะถือว่ามีความเข้มข้น 4X จากนั้นเจือจางเชื้อด้วย PBS ในระดับ 1:10 (3X) 1:100 (2X) และ 1:1000 (1X) ตามลำดับ จากนั้นนำไปทำการทดลอง โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 หาความเข้มข้นของเชื้อ S.* Enteritidis *ที่เหมาะสมในการจุ่มไข่

ซื้อไข่ไก่จากท้องตลาด จำนวน 50 ฟอง นำมาเช็ดฆ่าเชื้อที่เปลือกไข่ด้วยแอลกอฮอล์ 70% จากนั้นสุ่มแบ่งไข่ออกเป็น 10 กลุ่มๆ ละ 5 ฟอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 จุ่มสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis ที่ความเข้มข้น 4X นาน 1 นาที

กลุ่มที่ 2 จุ่มสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis ที่ความเข้มข้น 4X นาน 1 นาที จุ่ม PBS นาน 5 นาที

กลุ่มที่ 3 จุ่มสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis ที่ความเข้มข้น 3X นาน 1 นาที

กลุ่มที่ 4 จุ่มสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis ที่ความเข้มข้น 3X นาน 1 นาที จุ่ม PBS นาน 5 นาที

กลุ่มที่ 5 จุ่มสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis ที่ความเข้มข้น 2X นาน 1 นาที

กลุ่มที่ 6 จุ่มสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis ที่ความเข้มข้น 2X นาน 1 นาที จุ่ม PBS นาน 5 นาที

กลุ่มที่ 7 จุ่มสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis ที่ความเข้มข้น 1X นาน 1 นาที

กลุ่มที่ 8 จุ่มสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis ที่ความเข้มข้น 1X นาน 1 นาที จุ่ม PBS นาน 5 นาที

กลุ่มที่ 9 ไม่จุ่มสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis

กลุ่มที่ 10 ไม่จุ่มสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis แต่จุ่ม PBS นาน 5 นาที

หลังจากจุ่มไข่ในสารละลายเชื้อหรือ PBS นำไข่ไปผึ่งในตู้ปลอดเชื้อให้ผิวเปลือกไข่แห้ง แล้วจึงนำมาเพาะแยกเชื้อ *S.* Enteritidis แยกรายฟอง

การทดลองที่ 2 หาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมในการฆ่าเชื้อ S. Enteritidis ที่เปลือกไข่

ซื้อไข่ไก่จากท้องตลาดจำนวน 120 ฟอง นำมาเช็ดฆ่าเชื้อที่เปลือกไข่ด้วยแอลกอฮอล์ 70% สุ่มแบ่งไข่ออกเป็น 6 กุล่มๆ ละ 20 ฟอง ทั้งนี้สารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis ที่เลือกใช้ทดสอบในการทดลองนี้จะเลือกใช้สารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis ที่เจือจางที่สุดในการทดลองที่ 1 ที่ยังสามารถตรวจพบเชื้อที่เปลือกไข่และเยื่อไข่ได้ 100% แม้ทำการตรวจหลังจากจุ่มไข่ใน PBS นาน 5 นาที ส่วนสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมที่ใช้ นำมาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1.25% และ 2.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ

กลุ่มที่ 1 จุ่มสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis 1 นาที จุ่ม PBS นาน 5 นาที

กลุ่มที่ 2 จุ่มสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis 1 นาที จุ่ม PBS นาน 10 นาที

กลุ่มที่ 3 จุ่มสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis 1 นาที จุ่มสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม ความเข้มข้น 1.25% นาน 5 นาที

กลุ่มที่ 4 จุ่มสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis 1 นาที จุ่มสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม ความเข้มข้น 1.25% นาน 10 นาที

กลุ่มที่ 5 จุ่มสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis 1 นาที จุ่มสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม ความเข้มข้น 2.5% นาน 5 นาที

กลุ่มที่ 6 จุ่มสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis 1 นาที จุ่มสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม ความเข้มข้น 2.5% นาน 10 นาที

หลังจากจุ่มไข่ในสารละลายเชื้อ *S.* Enteritidis หรือ PBS นำไข่ไปผึ่งในตู้ปลอดเชื้อให้เปลือกไข่แห้ง แล้วจึงนำมาเพาะแยกเชื้อ *S.* Enteritidis แยกรายฟอง

***การเพาะแยกเชื้อ S.* Enteritidis**

นำไข่ใส่ในถุงพลาสติกที่มี buffer peptone water (Oxoid, England) ปริมาณ 30 มิลลิลิตรต่อฟอง จุ่มแช่นาน 1 นาที โดยใช้มือช่วยขูดเบาๆ บริเวณเปลือกไข่ (จากด้านนอกถุง) จากนั้นเช็ดเปลือกไข่ด้วยทิงเจอร์ไอโอดีน แล้วกะเทาะเปลือกไข่ นำส่วนเยื่อไข่มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ สำหรับการทดลองที่ 1 จะเพาะเชื้อจากเยื่อไข่แยกจากเปลือกไข่ ส่วนการทดลองที่ 2 จะเพาะเชื้อจากเยื่อไข่รวมกับเปลือกไข่ จากนั้นนำถุงตัวอย่างทั้งหมดเข้าบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สำหรับชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและขั้นตอนในการเพาะเชื้อในลำดับต่อไปได้ดัดแปลงจากวิธีของ Saitanu และคณะ [4] ดังนี้

(1) เมื่อบ่มถุงตัวอย่างครบเวลาตามที่กำหนด ใช้ไมโครปิเปต ดูดของเหลวจำนวน 100 ไมโครลิตร หยดลงบน Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) medium (Oxoid, England) เข้าบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

(2) ตัวอย่างที่ทำให้สีของ MSRV เปลี่ยนจากสีเขียวแกมน้ำเงินใส เป็นสีขาวขุ่นบริเวณรอบ ๆ จุดที่หยดเชื้อ ให้นำไปเพาะใน triple sugar iron (TSI) agar (Oxoid, England) และ lysine iron agar (LIA) (Scharlau, Spain) โดยใช้เข็มเขี่ยแตะเชื้อ ณ จุดที่แผ่ไปไกลที่สุด บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

(3) ตัวอย่างที่สามารถเปลี่ยนสีของ TSI agar ให้มีสีเหลืองบริเวณก้นหลอด และมีสีแดงบริเวณ slant และตัวอย่างที่ไม่มีการเปลี่ยนสีของ LIA agar slant และบริเวณที่ stab เป็นสีดำ นำไปตรวจยืนยันด้วยวิธีทางซีรัมวิทยาด้วยแอนติซีรัมต่อ Salmonella group D (เนื่องจาก *S.* Enteritidis จัดอยู่ใน Salmonella group D)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างกลุ่ม โดยการเปรียบเทียบสัดส่วนจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *Salmonella* group D ด้วยวิธี Chi-square test โดยใช้โปรแกรม SAS version 6.12

ผลการศึกษา

ปริมาณผงของสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่เตรียมได้

น้ำหนักรวมของผงสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมที่ได้ในครั้งนี้คิดเป็น 24.69% เมื่อเทียบกับน้ำหนักผงเปลือกผลทับทิมแห้งตั้งต้น

การทดลองที่ 1 หาความเข้มข้นของเชื้อ S.* Enteritidis *ที่เหมาะสมในการจุ่มไข่

พบว่าความเข้มข้นของเชื้อที่น้อยที่สุดที่ยังสามารถตรวจพบเชื้อทั้งที่เปลือกไข่และเยื่อไข่ได้ 100% แม้ตรวจหลังจากจุ่มไข่ใน PBS นาน 5 นาที คือ ความเข้มข้น 3X (1/10 ของ 0.5 McFarland) **(Table 1)**

Table 1. Recovery of *Salmonella* group D from Egg Shells and Shell Membranes[a]

Concentrations of *S.* Enteritidis	Dipped in PBS (minute)	Number of Eggs with *Salmonella* group D/Total Eggs	
		Eggshells (%)	Eggshell Membranes(%)
4X	0	5/5 (100)	5/5 (100)
4X	5	5/5 (100)	5/5 (100)
3X	0	5/5 (100)	5/5 (100)
3X	5	5/5 (100)	5/5 (100)
2X	0	5/5 (100)	5/5 (100)
2X	5	1/5 (20)	3/5 (60)
1X	0	5/5 (100)	0/5 (0)
1X	5	5/5 (100)	1/5 (20)
0	0	1/5 (20)	3/5 (60)
0	5	1/5 (20)	2/5 (40)

[a] After dipped in various concentrations of *S.* Enteritidis for 1 minute then, with or without additionally dipped in PBS for 5 minutes

การทดลองที่ 2 หาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมในการฆ่าเชื้อ S. Enteritidis ที่เปลือกไข่

ความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ทดสอบคือ ความเข้มข้น 3X (1/10 ของ 0.5 McFarland) ซึ่งเป็นความเข้มข้นของเชื้อที่น้อยที่สุดที่ยังสามารถตรวจพบเชื้อได้ 100% ทั้งที่เปลือกไข่และเยื่อไข่ (จากการทดลองที่ 1) และความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมที่ใช้ทดสอบมี 2 ความเข้มข้นคือ 1.25% และ 2.5% ใช้เวลาในการจุ่มไข่นาน 5 หรือ 10 นาที พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมไม่สามารถทำลายเชื้อ *S.* Enteritidis บนเปลือกไข่และเยื่อไข่ ในทุกๆ กลุ่มของการทดลอง เนื่องจากยังตรวจพบเชื้อดังกล่าวในทุกตัวอย่างของการทดลอง

วิจารณ์

ปริมาณผงสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมที่เตรียมได้ในครั้งนี้ คิดเป็น 24.69% เมื่อเทียบกับผงเปลือกผลทับทิมแห้งตั้งต้น ซึ่งปริมาณที่ได้นี้ใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Gritsanapan และคณะ [16] ที่ใช้แอลกอฮอล์ 70% เป็นตัวทำละลาย แล้วได้สารสกัดหยาบคิดเป็น 29.1%

จากการทดลองหาความเข้มข้นของเชื้อ *S.* Enteritidis ที่น้อยที่สุดที่ยังสามารถตรวจพบเชื้อบนเปลือกและเยื่อไข่ได้ 100% แม้ทำการตรวจหลังจากจุ่มไข่ใน PBS นาน 5 นาที คือ ความเข้มข้น 3X (1/10 ของ 0.5 McFarland) และจากการทดลองจะเห็นว่าสามารถตรวจพบเชื้อที่เยื่อไข่ได้แม้ไม่ได้จุ่มเชื้อ นั่นแสดงว่าไข่มีการปนเปื้อนเชื้ออยู่แล้วก่อนการทดลอง สอดคล้องกับผลการศึกษา

ของ Saitanu และคณะ [4] ซึ่งพบการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในไข่ที่ขายตามท้องตลาด ส่วนการพบเชื้อที่เยื่อไข่ได้นั้น Cox และคณะ [17] กล่าวไว้ว่าเชื้อสามารถเคลื่อนผ่านรูพรุนของเปลือกไข่เข้าไปภายใน ทำให้ตรวจพบเชื้อที่เยื่อไข่ได้ อย่างไรก็ตามเชื้อที่ตรวจพบดังกล่าวเป็นเชื้อ *Salmonella* group D ซึ่งเป็นเชื้อกลุ่มเดียวกับที่ทำการทดลอง เพราะฉะนั้นหากสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมสามารถทำลายเชื้อ *S.* Enteritidis ได้ ย่อมน่าจะมีผลทำลายเชื้อ *Salmonella* group D ที่ปนเปื้อนอยู่ก่อนแล้วนั้นได้ด้วย และจากการทดลองที่ 1 ที่เพาะเชื้อแยกระหว่างเปลือกไข่กับเยื่อไข่แล้วพบว่า สามารถตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาที่เยื่อไข่ได้แม้ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้จุ่มสารละลายเชื้อ (กลุ่มที่ 9 และ 10) และเมื่อจุ่มเชื้อแล้วยิ่งพบการปนเปื้อนที่เยื่อไข่ในสัดส่วนที่สูงขึ้น ดังนั้นในการทดลองที่ 2 คณะผู้วิจัยจึงได้เพาะเชื้อจากเยื่อไข่รวมกับเปลือกไข่ เนื่องจากต้องการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมว่าจะสามารถแทรกผ่านรูพรุนของเปลือกไข่เข้าไปทำลายเชื้อที่เยื่อไข่ได้หรือไม่ รวมถึงเพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภคจริง วิธีที่ใช้ในการทำลายเชื้อต้องมีศักยภาพพอที่จะทำลายเชื้อได้ทั้งบนเปลือกไข่และเยื่อไข่ จากเหตุผลข้างต้นคณะผู้วิจัยจึงนำเปลือกไข่และเยื่อไข่มาตรวจรวมกันดังกล่าว

จากการศึกษาของ กัลยาและคณะ [14] ที่พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อ *S.* Enteritidis ได้ และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าทำลายเชื้ออยู่ระหว่าง 1.25-2.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) แต่จากการศึกษาครั้งนี้เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมในระดับเดียวกันมาใช้ทำลายเชื้อบนเปลือกไข่และเยื่อไข่ พบว่าไม่สามารถทำลายเชื้อที่ปนเปื้อนบนเปลือกไข่และเยื่อไข่ได้เลย ผลการทดลองที่แตกต่างนี้อาจเกิดจาก ระยะเวลาที่สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมสัมผัสกับเชื้อแตกต่างกัน โดยการทดสอบฤทธิ์ในห้องปฏิบัติการเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าทำลายเชื้อนั้น ได้ให้สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมสัมผัสเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง (ภายใต้ข้อกำหนดของวิธีการทดสอบ) แต่การศึกษาในครั้งนี้ใช้เวลาในการสัมผัสเชื้อ 5 หรือ 10 นาที ซึ่งคณะผู้วิจัยเห็นว่า เป็นระยะเวลาที่สะดวกและเหมาะสมในการใช้งานจริงสำหรับผู้บริโภคทั่วไป นอกจากนี้อาจเกิดจากเชื้อบนผิวเปลือกไข่และเยื่อไข่มีความเข้มข้นสูง จึงทำให้สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมที่มีความเข้มข้น 1.25-2.5% ไม่สามารถทำลายเชื้อได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตามผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Cutter [18] ที่พบว่าการใช้สารสกัดจากสมุนไพรที่มีชื่อทางการค้า Protecta I และ Protecta II ไม่สามารถทำลายเชื้อ *E. coli* O157:H7 *S. Typhimurium* และ *Listeria monocytogenes* ได้ทันทีภายหลังจากสัมผัสกับสารสกัดจากสมุนไพร แต่จะตรวจพบเชื้อลดลงอย่างมากในวันที่ 7 ภายหลังจากสัมผัสกับสารสกัดจากสมุนไพร Davies และ Breslin [19] พบปัญหาจากการนำสมุนไพรมาใช้ในการทำลายเชื้อที่เปลือกไข่เช่นกัน โดยได้ทดลองใช้สารสกัดจากสมุนไพรที่มีชื่อทางการค้าว่า Protecta II มาประยุกต์ใช้ในการทำลายเชื้อ *S.* Enteritidis บนเปลือกไข่ พบว่าสารสกัดสมุนไพรดังกล่าวให้ผลในการทำลายเชื้อไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดจากสมุนไพร และได้สรุปว่าการใช้สมุนไพรในการฆ่าเชื้อต้องการเวลาในการสัมผัสเชื้อนาน ในการศึกษาครั้งต่อไปควรมีการทดสอบผลการทำลายเชื้อโดยเพิ่มระยะเวลาในการสัมผัสกับเชื้อให้นานกว่า 10 นาที และควรมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมมากกว่า 2.5%

สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมแห้งที่สกัดโดยการหมักในเอธิลแอลกอฮอล์ 95% พบว่าในระดับความเข้มข้นของสารสกัดนี้ที่ 1.25% และ 2.5% ไม่สามารถทำลายเชื้อ *S.* Enteritidis บนเปลือกไข่และเยื่อไข่ได้หมด เมื่อสารสกัดนี้มีเวลาสัมผัสเชื้อดังกล่าวเพียง 10 นาที

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย จากงบประมาณเงินรายได้คณะฯ ประจำปี 2547

เอกสารอ้างอิง

1. Bangtrakulnonth A, Pornreongwong S, Pulsrikarn C, Sawapanyalert P, Hendriksen RS, Lo Fo Wang DMA, et al. Salmonella serovars from humans and other sources in Thailand, 1993-2002. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(1):131-136.
2. Boonmar S, Bangtrakulnoth A, Pornruangwong S, Marnrin N, Kaneko K, Ogawa M. Salmonella in broiler chickens in Thailand with special reference to contamination of retail meat with *S.* Enteritidis. *J Vet Med Sci.* 1998;60(11):1233-1236.
3. Okamura M, Kamijima Y, Miyamoto T, Tani H, Sasai K, Baba E. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian Dis.* 2001;45:61-69.
4. Saitanu K, Koowatananukul C, Jerngklinchan J, Sasipreeyajan J. Detection of Salmonella in hen eggs in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1994;25(2):324-331.
5. Brake J, Sheldon BW. Effect of a quaternary ammonium sanitizer for hatching eggs on their contamination, permeability, water loss, and hatchability. *Poult Sci.* 1990;69(4):517-525.
6. Sheldon BW, Brake J. Hydrogen peroxide as an alternative hatching egg disinfectant. *Poult Sci.* 1991;70(5):1092-1098.
7. Das AK, Mandal SC, Banerjee SK, Sinha S, Das J, Saha BP, et al. Studies on antidiarrhoeal activity of Punica granatum seed extract in rats. *J Ethnopharmacol.* 1999;68(1-3):205-208.
8. Prashanth D, Asha MK, Amit A. Antibacterial activity of *Punica granatum. Fitoterapia.* 2001;72(2): 171-173.
9. Mavlyanov SM, Islambekov SY, Karimdzhanov AK, Ismailov AI. Polyphenols of the fruits of some varieties of pomergranate growing in Uzbekistan. *Chem Nat Comp.* 1997;33(1):98-99.
10. วัฒนา วิริวุฒิกร. ความสำคัญของแทนนินที่มีต่ออุตสาหกรรมอาหาร (บทความวิชาการ). *อาหาร.* 2539;26(3): 157-167.
11. Debelmas AM, Dobremez JF, Michel S, Benarroche L. Medicinal plants of Nepal. *Plant Med Phytother.* 1973;7:104.

12. นันทวัน บุณยะประภัศร, นพมาศ สรรพคุณ, วีณา จิรัจฉริยากูล, เอมอร โสมนะพันธุ์. เภสัชวินิจฉัย เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2532.
13. เอมอร โสมนะพันธุ์, นันทวัน บุณยะประภัศร, นพมาศ สรรพคุณ. เภสัชวินิจฉัย เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2529.
14. กัลยา เจือจันทร์, จิโรจ ศศิปรียจันทร์, นันทวัน บุญยะประภัศร. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าทำลายเชื้อของสารสกัดเปลือกผลทับทิม (*Punica granatum* L.) ต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่และผลศึกษาการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ. *วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.* 2549;16(2):8-16.
15. Chulasiri M, Thakerngpol K, Temsirirkkul R. A water-soluble component with antimicrobial activity from promegranate rind: electron microscopic and preliminary chemical studies. *Mahidol J Pharm Sci.* 1995;22(3):107-112.
16. Gritsanapan W, Chulasiri M. A preliminary study of antidiarrheal plants: I, Antibacterial activity. *Mahidol Univ J Pharm Sci.* 1983;10(4):119-123.
17. Cox NA, Berrang ME, Cason JA. Salmonella penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs-a review. *Poult Sci.* 2000;79:1571-1574.
18. Cutter CN. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes,* and *Salmonella* Typhimurium associated with beef. *J Food Prot.* 2000;63(5):601-607.
19. Davies RH, Breslin M. Investigations into possible alternative decontamination methods for *Salmonella Enteritidis* on the surface of table eggs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003;50:38-41.