



ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอิมัลชันจากน้ำมันหอมระเหยกานพลูและสะระแหน่ต่อ
Salmonella Typhimurium และการประยุกต์ใช้เป็นสารล้างทำความสะอาดใบโหระพา
Antibacterial Activity of Clove and Peppermint Essential Oil Emulsions against
Salmonella Typhimurium and Its Applicability as Sanitizer for Washing of Basil Leaves

เขมวัฒน์ บุญเกิด, สโรศินี นวลจันทร์ และ อูมาพร ทาไธสง*

Khemmawat Boonkerd, Sarosinee Nuanchan and Umaporn Thathaisong*

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศไทย

Microbiology Department, Faculty of Science, Burapha University, Thailand

Received : 15 May 2024, Received in revised form : 14 July 2024, Accepted : 16 July 2024

Available online : 19 July 2024

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : การศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยกานพลูและสะระแหน่ต่อ *Salmonella Typhimurium* ทั้งในหลอดทดลองและบนใบโหระพา

วิธีดำเนินการวิจัย : หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) และฆ่าเชื้อได้ (MBC) ด้วยวิธี broth macrodilution ทดสอบหาระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ (time-kill assay) เพื่อประเมินฤทธิ์ในการทำลาย ศึกษารูปร่างของเซลล์ในสภาวะที่สัมผัสกับอิมัลชันภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy, SEM) ทำการใส่เชื้อ *S. Typhimurium* ลงบนใบโหระพา จากนั้นล้างใบโหระพาที่ใส่เชื้อด้วยอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ความเข้มข้น 1xMIC (0.125%) เป็นเวลา 5 นาที และอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ ความเข้มข้น 1xMIC (0.25%) เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มี Tween 80 เป็นชุดควบคุม และทำการนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตบนใบโหระพา นอกจากนี้ยังประเมินการเปลี่ยนแปลงสีของใบโหระพาล้างด้วยสารทดสอบ

ผลการวิจัย : ค่า MIC และ MBC ของอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยกานพลู มีค่าเท่ากัน คือ 0.125% ส่วนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ มีค่าเท่ากัน คือ 0.25% การหาระยะเวลาในการฆ่าเชื้อแสดงให้เห็นว่าอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยกานพลูและสะระแหน่ ที่ความเข้มข้น 1xMIC สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* เริ่มต้นลงได้ $>3 \log \text{CFU/mL}$ ที่เวลา 5 นาที และ 10 นาที ตามลำดับ ภาพจากกล้อง SEM พบว่าเซลล์ในสภาวะที่สัมผัสกับอิมัลชันมีรูปร่างผิดปกติและเซลล์แตกเมื่อเทียบกับเซลล์ในชุดควบคุม อิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดสามารถลดจำนวนเชื้อที่ใส่ลงบนใบโหระพาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยไม่มีผลต่อสีของใบโหระพา

สรุปผลการวิจัย : อิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยกานพลูและสะระแหน่มีประสิทธิภาพต้าน *S. Typhimurium* ทั้งในหลอดทดลองและบนใบโหระพา ซึ่งอาจสามารถนำมาใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเป็นสารทำความสะอาดผักสดได้

คำสำคัญ : กานพลู ; ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ; สะระแหน่ ; อิมัลชัน ; *S. Typhimurium*



Abstract

Background and Objectives : This study examined the antibacterial activity of clove and peppermint essential oil emulsions against *Salmonella* Typhimurium both *in vitro* and on basil leaves

Methodology : The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were determined using the broth microdilution method. A time-kill assay was performed to evaluate the bactericidal activity. The morphology of the bacteria exposed to the essential oil emulsions was examined with scanning electron microscopy (SEM). The basil leaves were artificially inoculated with *S. Typhimurium*, the inoculated basil leaves were then washed in clove essential oil emulsions at 1xMIC (0.125%) concentration for 5 min and peppermint essential oil emulsion at 1xMIC (0.25%) concentration for 10 min. Sterile distilled water containing Tween 80 was used as the control. The population of *S. Typhimurium* on basil leaves was evaluated. In addition, the color changes in the treated basil leaves were determined.

Main Results : The MIC and MBC values for clove essential oil emulsion were both 0.125%, while those for peppermint essential oil emulsion were both 0.25%. The time-kill assay indicated that the clove and peppermint essential oil emulsions at concentration of 1xMIC effectively decreased the initial bacterial population by >3 log CFU/mL within 5 and 10 min, respectively. SEM showed that the treated cells had morphological changes and cell lysis when compared to control ones. Both essential oil emulsions significantly reduced ($p<0.05$) the population of *S. Typhimurium* on basil leaves without affecting the color of basil leaves.

Conclusions : The clove and peppermint emulsion has anti-*S. Typhimurium* activity both *in vitro* and on basil leaves which can be applied to be as an alternative as a sanitizer for fresh vegetables.

Keywords : clove ; antibacterial activity ; peppermint ; emulsion ; *S. Typhimurium*

*Corresponding author. E-mail : umaporn@buu.ac.th

บทนำ

ผักที่ผ่านการแปรรูปเล็กน้อย เป็นที่นิยมในตลาดผักผลไม้สด เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูงและง่ายต่อการบริโภค โหระพาเป็นผักชนิดหนึ่งที่คนไทยนิยมรับประทานสด เช่น ทานกับก๋วยเตี๋ยวเรือ ลาบ และน้ำตก เป็นต้น จึงมีความเสี่ยงต่อแบคทีเรียก่อโรคที่อาจปนเปื้อนอยู่ในอาหาร เช่น *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* รวมทั้ง *Salmonella* Typhimurium (Islam *et al.*, 2004 ; Nou & Luo, 2010) ในปี ค.ศ. 2007 มีรายงานการเกิดโรคติดต่อผ่านทางอาหารจากการบริโภคโหระพาสดที่ปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* ในประเทศอังกฤษและเวลส์ (Delbeke *et al.*, 2015) สำหรับในประเทศไทย มีรายงานจากสำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติระบุว่าผักสวนครัวไทยที่ส่งออกไปยังสหภาพยุโรปตรวจพบจุลินทรีย์ปนเปื้อนอย่างต่อเนื่องและบ่อยครั้ง โดยเฉพาะ *Salmonella* และ *E. coli* (Chungsamanukoo *et al.*,

2010) ซึ่งการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในผักอาจมาจากแปลงเพาะปลูก กระบวนการผลิต ระหว่างหรือหลังการเก็บเกี่ยว การขนส่ง จนกระทั่งถึงระหว่างการจัดจำหน่าย หรือการเตรียมอาหารในครัวเรือน ดังนั้นการล้างด้วยวิธีที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญในการลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผักสด

การล้างเป็นเทคนิคที่ใช้กันทั่วไปในการลดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและสิ่งตกค้างต่าง ๆ เช่น ดิน แมลง และยากำจัดศัตรูพืชบนผิวของผักสด (Gil *et al.*, 2009) โดยคลอรีนเป็นสารฆ่าเชื้อที่นิยมนำมาใช้ล้างผักผลไม้เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตต่ำ (Chun *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตามการล้างผักและผลไม้สดด้วยคลอรีนอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดสารก่อมะเร็งได้ (Ramose *et al.*, 2013) จึงมีนักวิจัยจำนวนมากสนใจทางเลือกจากธรรมชาติ โดยเฉพาะน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีคุณสมบัติต้านแบคทีเรียต้านอนุมูลอิสระ และคุณสมบัติฆ่าเชื้อรา รวมทั้งได้รับการยอมรับโดยทั่วไปว่าปลอดภัย อย่างไรก็ตามน้ำมันหอมระเหยมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์คือมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ กลิ่นแรง และความคงตัวต่ำ (Prakash & Kiran, 2016) ดังนั้นการทำให้อยู่ในรูปอิมัลชันอาจเข้ามาช่วยแก้ปัญหาเหล่านี้ และยังช่วยให้น้ำมันหอมระเหยของพืชมีการกระจายตัวได้ดีขึ้น (Varona *et al.*, 2009)

อิมัลชันเป็นคอลลอยด์ประเภทหนึ่ง ซึ่งเกิดจากของเหลว 2 ชนิดขึ้นไปที่ไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้ตัวทำอิมัลชันหรืออิมัลซิฟายเออร์ (emulsifier) เป็นตัวผสมให้มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีการศึกษาโดยนำน้ำมันหอมระเหยในรูปอิมัลชันไปประยุกต์ใช้เป็นสารล้างทำความสะอาดผักสด พบว่าอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยอบเชยสามารถลดจำนวน *Listeria monocytogenes* และ *Escherichia coli* O157:H7 บนใบคะน้าได้ 1.83 log CFU/กรัม และ 1.54 log CFU/กรัม ตามลำดับ (Kang *et al.*, 2019) ส่วนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยเจอเรเนียม (Geranium) สามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ที่ใส่ลงในผักสด ได้ 1.57–1.66 log CFU/กรัม และ *E. coli* O157:H7 ได้ 1.45–1.56 log CFU/กรัม (Park *et al.*, 2018a)

กานพลู (*Syzygium aromaticum* Linn.) เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณหลายอย่าง เช่น ช่วยขับลม ขับระดู แก้เลือดออกตามไรฟัน เป็นต้น (Soonthornchareonnon & Ruangwiset, 2008) มีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลูมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *Porphyromonas gingivalis* และ *Panax notoginseng* (Kang & Song, 2018 ; Ebani *et al.*, 2019 ; Ma *et al.*, 2019 ; Zhang *et al.*, 2017 ; Budri *et al.*, 2015)

สะระแหน่ (*Mentha* spp.) เป็นพืชสมุนไพรที่มีหลากหลายชนิด เช่น *Mentha aquatica*, *Mentha piperita*, *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* รวมทั้ง *Mentha cordifolia* Opiz. ซึ่งเป็นชนิดที่พบในประเทศไทย (Chawla & Thakur, 2013) สะระแหน่มีคุณสมบัติหลายประการ เช่น แก้อาการปวดหัว ปวดฟัน หนำมีดตาลาย ต้านอนุมูลอิสระ และกระตุ้นการหลั่งน้ำดี เป็นต้น (Saensuk, 2010; Mkaddem *et al.*, 2009) นอกจากนี้มีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ชนิด *M. cordifolia* Opiz. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* รวมทั้ง *S. Typhimurium* (Pudpila *et al.*, 2011)

จากข้อมูลข้างต้น จะเห็นได้ว่าน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและสะระแหน่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ แต่ยังไม่มีการศึกษาที่นำน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่และกานพลูในรูปอิมัลชันมาล้างผัก ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและสะระแหน่ มาใช้ในการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *S. Typhimurium* ที่ใส่ลงบนใบโหระพา เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำสารจากธรรมชาติมาใช้แทนสารเคมีในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารล้างทำความสะอาดผักและผลไม้สดในครัวเรือน รวมทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อป้องกันอุบัติเหตุการของโรคระบาดที่ติดต่อผ่านทางอาหาร และใช้ในการเก็บรักษาอาหารให้ผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บนานขึ้น

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและสะระแหน่

น้ำมันหอมระเหยจากกานพลู (*S. aromaticum* Linn.) และน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ (*M. cordifolia* Opiz.) ที่ใช้ในการทดลองเตรียมมาจากวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (hydro distillation) โดยใช้ส่วนของดอกของกานพลู (แห้ง) ซึ่งซื้อจากร้านเวชพงศ์ไอสถ กรุงเทพมหานคร และส่วนใบและลำต้นของสะระแหน่ (สด) ซึ่งซื้อจากตลาดหนองมน ตำบลแสนสุข อำเภอเมืองชลบุรี

เตรียมอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู ความเข้มข้น 10% (w/w) โดยผสมน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูบริสุทธิ์ 10 กรัม, Tween 80 4 กรัม และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 89 กรัม ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่นผสมความเร็วสูง (High speed homogenizer) เป็นเวลา 15 นาที ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เก็บรักษาอิมัลชันที่อุณหภูมิ 4 °C

เตรียมอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ ความเข้มข้น 2% (w/w) โดยผสมน้ำมันหอมระเหยน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่บริสุทธิ์ 3 กรัม, Tween 80 1.5 กรัม และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 145.5 กรัม ให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยเครื่องปั่นผสมความเร็วสูง (High speed homogenizer) เป็นเวลา 15 นาที ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เก็บรักษาอิมัลชันที่อุณหภูมิ 4 °C (เตรียม 1% Tween 80 เป็นชุดควบคุม)

2. การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentration, MIC) และที่สามารถทำลายเชื้อได้ (Minimum bactericidal concentration, MBC) ของอิมัลชันต่อ *S. Typhimurium* ด้วยวิธี broth macrodilution (ดัดแปลงจาก Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012)

ถ่ายโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *S. Typhimurium* (ATCC 14028) ลงในอาหาร Mueller-Hinton broth (MHB) ปริมาตร 5 mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง ทำการปรับปริมาณเชื้อด้วย 0.85% NaCl ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ซึ่งมีจำนวนเชื้อ $\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/mL จากนั้นถ่ายเชื้อ ปริมาตร 0.1 mL ใส่ลงในอาหาร MHB ปริมาตร 9.9 mL จะได้ปริมาณเชื้อ $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL (ใช้ภายใน 15 นาที)

เจือจางอิมัลชันแต่ละชนิดแบบสองเท่า (two-fold dilution) ในอาหาร MHB ปริมาตร 1 mL ให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.065, 0.0313 และ 0.0156% จากนั้นเติมเซลล์แขวนลอยของเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 mL ลงไปในแต่ละหลอดที่มีสารทดสอบ ผสมให้เข้ากัน จะได้ปริมาณเชื้อสุดท้ายในหลอดเท่ากับ 5×10^5 CFU/mL ส่วนความเข้มข้นสุดท้าย

ของสารทดสอบในหลอดเท่ากับ 0.5, 0.25, 0.125, 0.065, 0.0313, 0.0156 และ 0.0078% ตามลำดับ และได้ใช้น้ำมันหอมระเหยบริสุทธิ์ (pure essential oil) มาหาค่า MIC โดยเตรียมให้ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 1-0.0156% จากนั้นเติม resazurin (ความเข้มข้น 20 mg/mL) ปริมาตร 5 μ L ลงในทุกหลอด (ความเข้มข้นสุดท้ายของ resazurin เท่ากับ 0.05 mg/mL) [ชุดควบคุมประกอบด้วย negative control คืออาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่มี Tween 80 ความเข้มข้นสุดท้าย 0.25% และเชื้อทดสอบ growth control คือ MHB และเชื้อทดสอบ sterility control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB] นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านค่า MIC โดยสังเกตจากสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูแสดงว่ามีการเจริญของเชื้อทดสอบ ซึ่งค่า MIC คือ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ (อาหารเลี้ยงสีน้ำเงิน)

ถ่ายสารละลายจากหลอดทดสอบที่อาหารเลี้ยงเชื้อสีน้ำเงิน จากการหาค่า MIC ปริมาตร 10 μ L หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller-Hinton agar หลอดละ 3 หยด จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านค่า MBC โดยสังเกตจากการเจริญของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งค่า MBC คือ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารที่ไม่พบการเจริญของเชื้อทดสอบบนผิวหน้าอาหาร (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

3. การทดสอบหาระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ (time-kill assay) (ดัดแปลงจาก Elcocks et al., 2019)

เตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *S. Typhimurium* โดยเชื้อโคโลนีบนอาหาร Tryptic Soy agar (TSA) ใส่ลงใน 0.1% peptone water ปรับปริมาณเชื้อให้เท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ซึ่งมีจำนวนเชื้อ $\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/mL แล้วถ่ายเซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.1 mL ใส่ลงใน 0.1% peptone water ปริมาตร 9.9 mL จะได้ปริมาณเชื้อ 1×10^6 CFU/mL จากนั้นเติมอิมัลชัน ให้ได้ความเข้มข้น $1 \times \text{MIC}$ ส่วนชุดควบคุม เติม 1% Tween 80 นำหลอดทดลองไปบ่มที่ 37 °C และทำการเก็บตัวอย่าง ปริมาตร 0.1 mL ที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที ของการบ่ม เจือจางตัวอย่างแบบสิบเท่า (ten-fold dilution) ใน 0.1% peptone water ให้ได้ความเจือจางที่เหมาะสม จากนั้นถ่ายตัวอย่าง ปริมาตร 0.1 mL ของแต่ละความเจือจางลงบนจานอาหาร TSA (2 ซ้ำ) ทำการ spread plate นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18.24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนี และคำนวณหาปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต โดยแสดงในหน่วย log CFU/mL (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

4. การศึกษารูปร่างของเซลล์ *S. Typhimurium* ในสภาวะที่สัมผัสกับอิมัลชัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy, SEM) (ดัดแปลงจาก Park et al., 2018b)

เตรียมเซลล์แขวนลอยของ *S. Typhimurium* ใน Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.0) ให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ($\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/mL) แล้วถ่ายเซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.1 mL ใส่ลงใน PBS ปริมาตร 9.9 mL จะได้ปริมาณเชื้อ 1×10^6 CFU/mL จากนั้นเติมอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยลงไปให้ได้ความเข้มข้น $1 \times \text{MIC}$ ส่วนชุดควบคุม เติม 1% Tween 80 ลงในเซลล์แขวนลอย นำหลอดไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 5 หรือ 10 นาที (จากผลการทดสอบ time-kill assay) ทำการเก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์โดยละลายตะกอนเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 10 mL และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง (ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง) หยดเซลล์แขวนลอยลงบนแผ่นกระจก (0.5x0.5 cm) ที่เคลือบด้วย alcian blue จากนั้นหยด 2.5% glutaraldehyde ใน PBS ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

แล้วล้างด้วย PBS จากนั้น fix ด้วย 1% osmium tetroxide ใน PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C ล้างด้วย PBS ทำการ dehydrate ด้วย ethanol ความเข้มข้น 70%, 80%, 90%, 95% และ 100% ตามลำดับ ทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤติด้วยเครื่อง critical point dryer และเคลือบทอง แล้วนำไปส่องภายใต้กล้อง SEM ยี่ห้อ LEO รุ่น LEO1450VP ที่ 10kV

5. การทดสอบประสิทธิภาพของอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยในการลดจำนวน *S. Typhimurium* ที่ใส่ลงบนใบโหระพา

เตรียมสารทดสอบ ดังนี้ เติมน้ำมันหอมระเหยกลีบกุหลาบ (ความเข้มข้น 10%) ลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 500 mL ให้ได้ความเข้มข้น 1x MIC (0.125%) และเติมน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ (ความเข้มข้น 2%) ลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 500 mL ให้ได้ความเข้มข้น 1x MIC (0.25%) ส่วนชุดควบคุม ทำการเติม 1% Tween 80 ลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (ความเข้มข้นสุดท้ายของ Tween 80 เท่ากับ 0.0125% สำหรับชุดควบคุมของอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยกลีบกุหลาบ/0.125% สำหรับชุดควบคุมของอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่) แล้วผสมให้เข้ากัน

เตรียมใบโหระพาและใส่หัวเชื้อ ตามวิธีของ Park *et al.* (2018b) ซึ่งมีการดัดแปลงเล็กน้อย ดังนี้ นำใบโหระพา จำนวน 50 กรัม มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 1000 mL แล้วนำใบโหระพามาผึ่งให้สะเด็ดน้ำ นำไปฉายรังสี UV-C ทั้งด้านหน้าและด้านหลังใบ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำลายจุลินทรีย์ประจำถิ่น จากนั้นเตรียมเซลล์แขวนลอยของ *S. Typhimurium* โดยเชื้อโคไลบนอาหาร TSA ใส่ลงใน 0.1% peptone water ทำการปรับปริมาณเชื้อให้เท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ซึ่งมีจำนวนเชื้อ $\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/mL แล้วถ่ายเชื้อ 0.1 mL ใส่ลงใน 0.1% peptone water ปริมาตร 9.9 mL จะได้ปริมาณเชื้อประมาณ 1×10^6 CFU/mL จากนั้นใส่เชื้อปริมาณ 500 μ L ลงบนใบโหระพาที่เตรียมไว้จำนวน 5 กรัม (อัตราส่วนของผักต่อหัวเชื้อ คือ 1 กรัม:100 μ L) โดยแบ่งหยดเป็นจุด และปล่อยให้แห้ง เป็นเวลา 40 นาที ภายในตู้ biosafety cabinet เพื่อให้เชื้อเกาะบนใบโหระพา แล้วนำใบโหระพา จำนวน 5 กรัม (2 ซ้ำ) ที่ใส่เชื้อแล้วใส่ถุงปราศจากเชื้อ (stomacher bag) เพื่อนำไปนับจำนวน *S. Typhimurium* ที่เกาะบนใบโหระพาก่อนการล้าง และแสดงจำนวนเซลล์ในหน่วย log CFU/กรัม ส่วนใบโหระพาที่เหลือนำไปล้างด้วยสารทดสอบ

การล้างใบโหระพาที่ใส่เชื้อแล้ว ตามวิธีของ Park *et al.* (2018b) ซึ่งมีการดัดแปลงเล็กน้อย ดังนี้ นำใบโหระพาที่ผ่านการใส่เชื้อแล้วมาล้างโดยแช่ในสารละลาย ได้แก่ สารละลายอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยกลีบกุหลาบที่ความเข้มข้น 1x MIC สารละลายอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ที่ความเข้มข้น 1x MIC และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่เติม 1% Tween 80 (ชุดควบคุม) โดยใช้ใบโหระพาจำนวน 10 กรัม ต่อสารละลาย ปริมาตร 500 mL (อัตราส่วน 1:50 w/v) และล้างเป็นเวลา 5 หรือ 10 นาที (จากผลการทดสอบ time-kill assay)

การนับจำนวน *S. Typhimurium* ที่รอดชีวิตบนใบโหระพา ทำตามวิธีของ Karagözü & Ergönül (2011) ซึ่งมีการดัดแปลงเล็กน้อย ดังนี้ นำใบโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารทดสอบจากแต่ละชุดการทดลอง จำนวน 5 กรัม (2 ซ้ำ) ใส่ลงใน stomacher bag ซึ่งมี 0.1% peptone water ปริมาตร 45 mL แล้วผสมด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 1 นาที (ความถี่ 10⁻¹) ทำการเจือจางต่อแบบสิบเท่า ให้ได้ความเจือจางที่เหมาะสม ถ่ายสารละลาย ปริมาตร 0.1 mL ของแต่ละความเจือจาง ใส่บนจานอาหาร Brilliant Green Agar (Modified) (2 ซ้ำ) และทำการ spread plate จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C

เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีเฉพาะของ *Salmonella* โดยโคโลนีมีสีชมพู และสีของอาหารรอบ ๆ โคโลนีเปลี่ยนจากสีแดงเป็นใส คำนวณหาปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตโดยแสดงในหน่วย log CFU/กรัม

การทดสอบประสิทธิภาพของอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยในการลดจำนวน *S. Typhimurium* ที่ใส่ลงบนใบโหระพา ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) ด้วยโปรแกรม Minitab 17 statistical software และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Tukey's studentized range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

6. การวัดสีของใบโหระพา

นำใบโหระพาที่ไม่ผ่านการล้าง (ชุดควบคุม) และผ่านการล้างด้วยสารทดสอบ (อัตราส่วนผักต่อสารทดสอบ คือ 1 กรัม : 50 mL) ซึ่งได้แก่ ล้างด้วยอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหย และล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เป็นเวลา 5 หรือ 10 นาที ไปวัดสีด้วยเครื่อง Colorimeter โดยใช้ระบบการวัดสี CIE L*a*b* หรือ CIELAB เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงสีของใบโหระพา โดยวัดค่า L* (ความสว่างหรือมืด), a* (เขียวหรือแดง) และ b* (น้ำเงินหรือเหลือง) รวมทั้งคำนวณค่า ΔE จากสูตร ดังต่อไปนี้ $[(L^*_{\text{sample}} - L^*_{\text{control}})^2 + (a^*_{\text{sample}} - a^*_{\text{control}})^2 + (b^*_{\text{sample}} - b^*_{\text{control}})^2]^{1/2}$ (Park *et al.*, 2018a) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Tukey's studentized range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัย

ค่า MIC และ MBC ของอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากพริกและสะระแหน่

จากการหาค่า MIC และ MBC ของอิมัลชันต่อ *S. Typhimurium* ด้วยวิธี broth microdilution ให้ผลดัง Table 1 ซึ่งพบว่า ค่า MIC และ MBC มีค่าเท่ากัน โดยค่า MIC และ MBC ของอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากพริก เท่ากับ 0.125% ส่วนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ เท่ากับ 0.25% นอกจากนี้ยังพบว่าค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหยจากพริกบริสุทธิ์และน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่บริสุทธิ์ มีค่าเท่ากัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.25% และ 0.5% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าของอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยดังกล่าว 2 เท่า

Table 1 MIC and MBC values of essential oil emulsions and pure essential oils against *S. Typhimurium*.

Tested samples	MIC (%)	MBC (%)
Clove essential oil emulsion	0.125	0.125
Peppermint essential oil emulsion	0.25	0.25
Pure clove essential oil	0.25	0.25
Pure peppermint essential oil	0.5	0.5

การทดสอบหาระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ (Time-kill assay)

นำอิมีลชัน ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC (1xMIC) มาทดสอบ time-kill assay เพื่อหาเวลาที่น้อยที่สุดในการทำลาย *S. Typhimurium* ให้ผลดัง figure 1 โดยจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่เวลา 0 นาที ในสภาวะที่มีอิมีลชันของน้ำมันหอมระเหยจากพลูและสะระแหน่ รวมทั้งชุดควบคุม เท่ากับ 5.77 ± 0.039 , 5.85 ± 0.05 และ 5.83 ± 0.1 log CFU/mL ตามลำดับ ส่วนที่เวลา 5 นาที ในสภาวะที่มีอิมีลชันของน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ พบว่าจำนวนเชื้อเริ่มต้นลดลงเหลือเท่ากับ 2.93 ± 0.16 log CFU/mL ในขณะที่เวลา 10, 15, 20 และ 30 นาที จำนวนเชื้อลดลงจากเริ่มต้นต่ำกว่าระดับที่สามารถตรวจนับได้ (< 2 log CFU/mL, limit detection of spread plate method) จะเห็นได้ว่าเวลา 10 นาที เป็นเวลาที่สั้นที่สุดของอิมีลชันของน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ (1xMIC, 0.25%) ที่สามารถทำลายเชื้อเริ่มต้นได้ $>99.9\%$ (>3 log reduction)

เมื่อพิจารณาสภาวะที่มีอิมีลชันของน้ำมันหอมระเหยจากพลู พบว่าตั้งแต่ที่เวลา 5 นาที เป็นต้นไป จำนวน *S. Typhimurium* ลดลงจากจำนวนเชื้อเริ่มต้นต่ำกว่าระดับที่สามารถตรวจนับได้ (< 2 log CFU/mL) แสดงให้เห็นว่าที่เวลา 5 นาที เป็นเวลาที่น้อยที่สุดของอิมีลชันของน้ำมันหอมระเหยจากพลู ที่ทำให้เชื้อเริ่มต้นลดลง $>99.9\%$ นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนเชื้อในหลอดควบคุมที่เวลา 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที ใกล้เคียงกับเชื้อเริ่มต้นที่เวลา 0 นาที (~ 5.8 log CFU/mL)

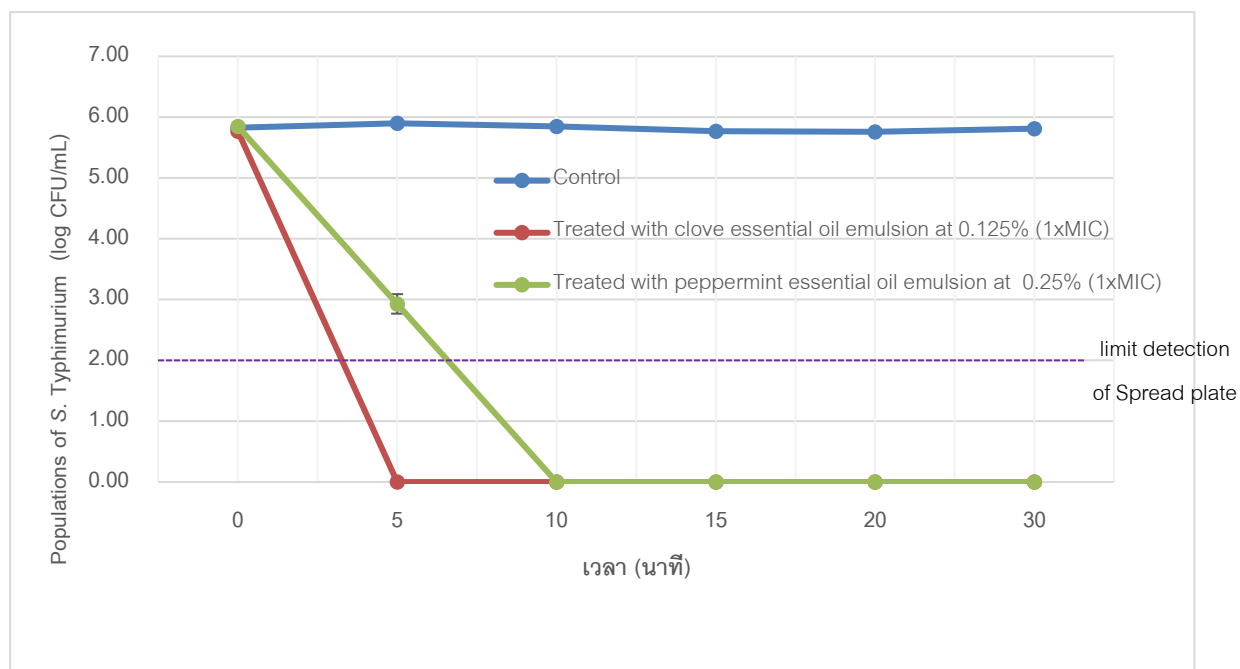


Figure 1 Time-kill of *S. Typhimurium* in the presence of clove and peppermint essential oil emulsions

ศึกษารูปร่างของเซลล์ *S. Typhimurium* ในสภาวะที่สัมผัสกับอิมัลชัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

จากการศึกษารูปร่างของเซลล์แบคทีเรียทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดให้ผลดัง Figure 2 ซึ่งพบว่าเซลล์ที่อยู่ในสภาวะที่สัมผัสกับอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยกานพลู ความเข้มข้น 1xMIC (0.125%) (Figure 2C) เป็นเวลา 5 นาที และอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ ความเข้มข้น 1xMIC (0.25%) (Figure 2D) เป็นเวลา 10 นาที มีรูปร่างผิดปกติ เนื่องจากเซลล์แตกสลาย (lysis) ส่วนเซลล์ในชุดควบคุม ซึ่งอยู่ใน PBS ที่มี tween 80 (0.0125%) เป็นเวลา 5 นาที (Figure 2A) และ tween 80 (0.125%) เป็นเวลา 10 นาที (Figure 2B) มีรูปร่างปกติ คือเป็นรูปท่อน และเซลล์ไม่แตก

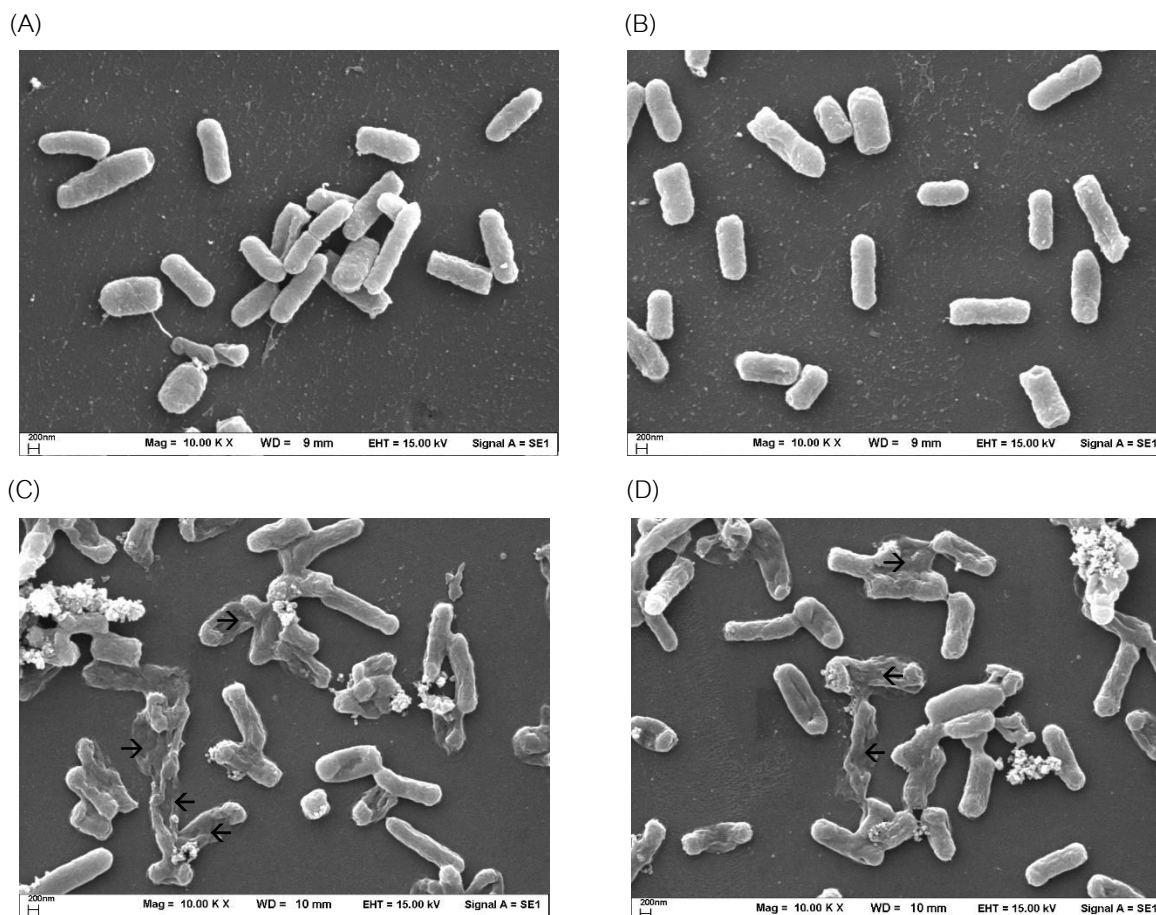


Figure 2 Scanning electron photograph of *S. Typhimurium*. (A) = bacteria in PBS (control) containing tween 80 for 5 min; (B) = bacteria in PBS (control) containing tween 80 for 10 min; (C) = bacteria treated with clove essential oil emulsion at 0.125% for 5 min; (D) = bacteria treated with peppermint essential oil emulsion at 0.25% for 10 min.

ประสิทธิภาพของอิมัลชันของน้ำมันหอมในการลดจำนวน *S. Typhimurium* ที่ใส่ลงบนใบโหระพา

การศึกษานี้ได้นำใบโหระพามาทำจุลินทรีย์ประจำถิ่น ก่อนที่จะใส่ *S. Typhimurium* ลงบนใบโหระพา ซึ่งหลังจากใส่เชื้อทดสอบลงบนใบผักแล้ว ได้ทำการตรวจนับจำนวน *S. Typhimurium* ที่เกาะบนใบโหระพา พบว่ามีจำนวน $\sim 5 \log \text{CFU/กรัม}$ (Table 2, 3) จากนั้นนำใบโหระพาที่ผ่านการใส่เชื้อแล้วมาล้างด้วยการแช่ในสารละลายทดสอบได้แก่ อิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากพลูที่ความเข้มข้น $1 \times \text{MIC}$ (0.125%) เป็นเวลา 5 นาที อิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยสะระแห่นที่ความเข้มข้น $1 \times \text{MIC}$ (0.25%) เป็นเวลา 10 นาที และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มี Tween 80 (ชุดควบคุม) เป็นเวลา 5 และ 10 นาที พบว่า การล้างด้วยอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากพลูที่ความเข้มข้น $1 \times \text{MIC}$ (0.125%) และล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มี Tween 80 (0.0125%) เป็นเวลา 5 นาที มีจำนวน *S. Typhimurium* ลดลงเฉลี่ยจากเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ $2.88 \pm 0.08 \log \text{CFU/กรัม}$ และ $0.70 \pm 0.33 \log \text{CFU/กรัม}$ โดยจำนวน *S. Typhimurium* ที่ลดลงจากจำนวนเชื้อเริ่มต้นบนใบโหระพาล้างด้วยการล้างด้วยอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากพลูที่ความเข้มข้น $1 \times \text{MIC}$ (0.125%) เป็นเวลา 5 นาที มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับการล้างด้วยชุดควบคุม ดังแสดงใน Table 2 นอกจากนี้ยังพบว่าการล้างด้วยอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยสะระแห่นความเข้มข้น $1 \times \text{MIC}$ (0.25%) เป็นเวลา 10 นาที สามารถลดจำนวนเชื้อเริ่มต้นลงได้ $1.70 \pm 0.25 \log \text{CFU/กรัม}$ ส่วนชุดควบคุมซึ่งล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มี Tween 80 (ความเข้มข้น 0.125%) สามารถลดจำนวนเชื้อได้ $0.74 \pm 0.28 \log \text{CFU/กรัม}$ ซึ่งการล้างด้วยอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยสะระแห่น ความเข้มข้น 0.25% (ค่า MIC) สามารถลดจำนวนเชื้อได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับการล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มี Tween 80 ความเข้มข้น 0.125% (ชุดควบคุม) ดังแสดงใน Table 3

Table 2 Survival populations of *S. Typhimurium* on basil leaves after washing with clove essential oil emulsion and reduction populations from the initial bacterial populations

Treatments	Survival populations on basil leaves (log CFU/g $\pm$ SD)	Reduction populations (log CFU/g $\pm$ SD)
Before washing	5.16 ± 0.03	-
Washing with sterile distilled water containing Tween 80 (0.0125%) (control) for 5 min	4.36 ± 0.41	0.70 ± 0.33^A
Washing with clove essential oil emulsion at $1 \times \text{MIC}$ (0.125%) for 5 min	2.27 ± 0.07	2.88 ± 0.08^B

^{A-B} Any means in the same column followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 3 Survival populations of *S. Typhimurium* on basil leaves after washing with peppermint essential oil emulsion and reduction populations from the initial bacterial populations

Treatments	Survival populations on basil leaves (log CFU/g $\pm$ SD)	Reduction populations (log CFU/g $\pm$ SD)
Before washing	5.24 $\pm$ 0.06	-
Washing with sterile distilled water containing Tween 80 (0.125%) (control) for 10 min	4.50 $\pm$ 0.30	0.74 $\pm$ 0.28 ^A
Washing with peppermint essential oil emulsion at 1xMIC (0.25%) for 10 min	3.54 $\pm$ 0.23	1.70 $\pm$ 0.25 ^B

^{A-B} Any means in the same column followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

วัดสีของใบโหระพา

จากการวัดสี (ค่า $L^* a^* b^*$) ของใบโหระพาที่ยังไม่ผ่านการล้าง (ชุดควบคุม) และผ่านการล้างด้วยสารทดสอบ ให้ผลดัง Table 4 ซึ่งพบว่าสีใบโหระพาที่ไม่ผ่านและผ่านการล้างด้วยสารทดสอบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) นอกจากนี้ ยังพบว่าความแตกต่างของสีโดยรวมเทียบกับชุดควบคุม (ค่า ΔE) ของใบโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยอิมัลชันและน้ำกลั่นปราศจากเชื้อไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$)

วิจารณ์ผลการวิจัย

เป็นที่ทราบกันดีว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชชนิดต่างๆ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด รวมทั้งน้ำมันหอมระเหยจากพลูและสะระแหน่ แต่อย่างไรก็ตามด้วยความสามารถในการละลายน้ำต่ำของน้ำมันหอมระเหยทำให้การนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันเชื้อก่อโรคผ่านทางอาหารจึงมีข้อจำกัด (Donsi & Ferrari, 2016) การศึกษานี้จึงแก้ปัญหาดังกล่าวด้วยการนำน้ำมันหอมระเหยมาจัดทำในรูปแบบของอิมัลชัน โดยใช้ Tween 80 เป็น emulsifier ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่สามารถใช้ในอาหารได้ (food-grade emulsifier) รวมทั้งได้รับการยอมรับโดยทั่วไปว่าปลอดภัยในอาหาร โดยจะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำ เพิ่มพื้นที่ผิวของน้ำมันหอมระเหย และอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพด้านการเจริญของจุลินทรีย์ (Bhargava *et al.*, 2015) นอกจากนี้ Tween 80 ยังเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพสูงในการใช้เป็นสารล้างทำความสะอาด (detergent) ซึ่งมีค่า hydrophilic lipophilic balance (HLB) เท่ากับ 15 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมในการเป็นสารล้างทำความสะอาด (Ghosh *et al.*, 2013)

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า อิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากพลู (MIC เท่ากับ 0.125%) มีประสิทธิภาพต้าน *S. Typhimurium* สูงกว่าอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ (MIC เท่ากับ 0.25%) และยังพบว่าอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพต้าน *S. Typhimurium* สูงกว่าน้ำมันหอมระเหยบริสุทธิ์ชนิดดังกล่าว (MIC เท่ากับ 0.25% และ

0.5% ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าการนำน้ำมันหอมระเหยมาทำให้อยู่ในรูปอิมัลชันจะเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งพบว่าอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยโรสไมล์ (MIC เท่ากับ 0.4 mg/mL) มีประสิทธิภาพในการต้าน *E. coli* สูงกว่าน้ำมันหอมระเหยโรสไมล์บริสุทธิ์ (MIC เท่ากับ 4 mg/mL) (Moghimi *et al.*, 2016) อย่างไรก็ตามมีบางงานวิจัยพบว่า การนำน้ำมันหอมระเหยมาทำให้อยู่ในรูปอิมัลชันจะทำให้ประสิทธิภาพต้านจุลินทรีย์ลดลง โดยพบว่าอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยออริกาโน (MIC เท่ากับ 12.5 μ L/mL) มีประสิทธิภาพในการต้าน *E. coli* ต่ำกว่าน้ำมันหอมระเหยออริกาโนบริสุทธิ์ (MIC เท่ากับ 0.152 μ L/mL) (Zhou *et al.*, 2018) และบางการศึกษาวิจัยว่าการเปลี่ยนน้ำมันหอมระเหยให้ไปอยู่ในรูปอิมัลชันจะไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการในการยับยั้งจุลินทรีย์ (Niu *et al.*, 2016 ; Shahabi *et al.*, 2017) ดังนั้นความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ของอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยอาจจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ แหล่งที่มาของพืชที่ใช้ในการเตรียมน้ำมันหอมระเหย สูตรและวิธีในการเตรียมอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหย ขนาดอนุภาคของหยดน้ำมัน ความหนืด องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย และสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่นำมาทำการทดสอบ (Dosing & Ferrari, 2016)

เมื่อพิจารณาค่า MIC และ MBC ของอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดและน้ำมันหอมระเหยบริสุทธิ์ต่อ *S. Typhimurium* พบว่ามีค่าเท่ากันแสดงว่ามีฤทธิ์แบบทำลาย (bactericidal activity) ต่อ *S. Typhimurium* ซึ่งถ้าสารทดสอบมีค่า MBC/MIC ต่อแบคทีเรียทดสอบน้อยกว่า 4 เท่า แสดงว่าสารทดสอบออกฤทธิ์แบบทำลาย (bactericidal activity) แต่หากค่า MBC/MIC ต่อแบคทีเรียทดสอบมากกว่า 4 เท่า แสดงว่าสารออกฤทธิ์แบบยับยั้ง (bacteriostatic activity) (Pankey & Sabath, 2004) ซึ่งการออกฤทธิ์แบบทำลาย *S. Typhimurium* ของอิมัลชันทั้งสองชนิดนี้ได้รับการยืนยันจากผลการทดสอบ time-kill assay โดยสารที่ออกฤทธิ์แบบทำลาย (bactericidal activity) ต้องสามารถลดจำนวนเชื้อเริ่มต้น $\geq 99.9\%$ (3 log reduction) (CLSI, 1999) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากพืชชนิดอื่น เช่น อิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยออริกาโน ออกฤทธิ์แบบทำลาย (bactericidal activity) ต่อ *S. Typhimurium* อีกด้วย (Bhargava *et al.*, 2015) สาเหตุที่อิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยกานพลูและสะระแหน่สามารถต้าน *S. Typhimurium* ที่นำมาทดสอบในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องมาจากสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหยของพืชดังกล่าว ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้พบว่าน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ชนิด *M. cordifolia* Opiz. ที่สกัดด้วยน้ำและไอน้ำ (water and steam distillation) มีสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ carveol (13.76 %), benzenemethanol (8.11 %), α -bourbonene (5.74 %), phytol (4.92 %), eugenol (3.55 %) และ piperitenone (3.54 %) (Pudpila, 2011) ส่วนองค์ประกอบหลักทางพฤกษเคมีของน้ำมันหอมระเหยกานพลู (ส่วนดอก) ประกอบด้วย eugenol (89%), eugenol acetate และ β -cariofileno (5-15%), α -humulen (2.1%) (Jirovetz *et al.*, 2006) มีรายงานว่า eugenol ที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากพืชหลายชนิด รวมทั้งกานพลูและสะระแหน่ มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ด้วยการเข้าไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane permeability) ทำให้เกิดการรั่วไหลของกรดนิวคลีอิก และโปรตีนภายในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถรักษาสสมดุลออสโมซิสได้ จึงทำให้เซลล์แตก นอกจากนี้ eugenol ยังมีประสิทธิภาพในการขัดขวางการสร้างพลังงานของเซลล์แบคทีเรียอีกด้วย ทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Kong *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2017) ส่วน carveol มีกลไกการออกฤทธิ์ด้วยการไปเปลี่ยนแปลงความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) และประจุที่ผิว

เซลล์ และทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (López Romero *et al.*, 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยที่อยู่ในรูปอิมัลชันสามารถเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบโดยผ่านทาง porins ที่อยู่บริเวณ outer membrane ได้ง่ายขึ้น (Donsi & Ferrari, 2016) จากผลการศึกษานี้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด จะเห็นได้ว่าอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยกานพลูและสะระแหน่ไปทำให้เซลล์ของ *S. Typhimurium* แตกสลาย ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากกลไกการออกฤทธิ์ของ carveol และ eugenol ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ตามที่อธิบายไว้ข้างต้น รวมทั้งสารอื่นๆ ที่เป็นสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหยดังกล่าว จึงทำให้เซลล์แตกในที่สุด และพบว่าให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยอบเชย (Park *et al.*, 2018b) และไทม์ (Moghim *et al.*, 2016) ที่สามารถทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกสลายเช่นเดียวกัน

จากผลการทดสอบหาเวลาในการทำลายเชื้อ (time-kill assay) จะเห็นได้ว่าอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยกานพลู (1xMIC, 0.125%) ออกฤทธิ์ในการทำลาย *S. Typhimurium* ได้เร็วกว่าอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ (1xMIC, 0.25%) ที่เป็นเช่นนั้นอาจเนื่องมาจากความแตกต่างของสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพต้านจุลินทรีย์ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำลาย *S. Typhimurium* ในบัฟเฟอร์ (0.1% peptone water) จากขั้นตอนการหาเวลาในการทำลายเชื้อ (time-kill assay) กับการทดสอบบนใบโหระพา จะเห็นได้ว่าอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพในการทำลาย *S. Typhimurium* ในบัฟเฟอร์ (ลดเชื้อเริ่มต้นลงได้ $> 3 \log$ CFU/mL) สูงกว่าการทดสอบบนใบโหระพา (ลดเชื้อเริ่มต้นลงได้ 1.7-2.8 log CFU/กรัม) เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารทดสอบ และเวลาเท่ากันที่เป็นเช่นนั้นอาจเนื่องมาจากพื้นผิวที่ขรุขระของใบผักมีผลทำให้อิมัลชันไม่สามารถเข้าไปสัมผัสกับทุกพื้นที่ของใบผักที่เชื้อติดอยู่ (Kang & Song, 2019 ; Kang & Kang, 2017) นอกจากนี้ผลการทดลองนี้ยังพบว่าการล้างใบโหระพาด้วยอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยไม่มีผลต่อสีของใบโหระพา ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าใบโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยอบเชย ความเข้มข้น 0.25 % เป็นเวลา 3 นาที ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี และปริมาณกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) หรือวิตามินซี (เป็นวิตามินชนิดละลายน้ำได้) ในใบโหระพาเมื่อเทียบกับใบโหระพาที่ไม่ได้ล้างด้วยสารทดสอบ (Park *et al.*, 2018b) แสดงให้เห็นว่าการล้างใบผักด้วยอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยไม่มีผลต่อสีและสารอาหารในผัก

การศึกษานี้พบว่าอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยกานพลูและสะระแหน่ที่ความเข้มข้น 1xMIC สามารถลดจำนวน *S. Typhimurium* ที่ใส่ลงบนใบโหระพาได้แตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยกานพลู (1xMIC, 5 นาที) สามารถลดจำนวนเชื้อได้มากกว่าอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ (1xMIC, 10 นาที) การศึกษานี้ยังได้ทำการพิสูจน์ว่าอิมัลชันสามารถทำลายเชื้อบนใบโหระพาหรือทำให้เชื้อหลุดออกจากใบโหระพาและมีชีวิตรอดอยู่ในสารละลายที่ใช้ล้างผัก โดยนำสารละลายทดสอบไปตรวจนับจำนวนเชื้อหลังจากล้างใบโหระพาที่ใส่เชื้อแล้ว พบว่าไม่มีเชื้อรอดชีวิตในสารละลายที่ใช้ล้าง (แช่) ใบโหระพา ในขณะที่ชุดควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มี tween 80) มีเชื้อที่รอดชีวิต (ไม่ได้แสดงข้อมูล) แสดงให้เห็นว่าอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิด มีฤทธิ์ทำลาย *S. Typhimurium* ที่ใส่ลงบนใบโหระพา ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่า MBC/MIC และผลการทดสอบ time-kill assay

Table 4 Color of basil leaves after washing with tested solution

Treatments	Color parameter			
	L*	a*	b*	ΔE
Control (No treatment)	36.91 ± 0.06 ^A	-11.43 ± 0.42 ^A	12.17 ± 0.78 ^A	-
Washing with distilled water for 5 min	37.52 ± 0.27 ^A	-11.82 ± 0.04 ^A	12.84 ± 0.10 ^A	1.01 ± 0.17 ^A
Washing with clove essential oil emulsion at 1xMIC (0.125%) for 5 min	37.47 ± 0.41 ^A	-11.87 ± 0.07 ^A	12.78 ± 0.11 ^A	1.04 ± 0.25 ^A
Washing with distilled water for 10 min	37.52 ± 0.38 ^A	-11.52 ± 0.42 ^A	12.85 ± 0.09 ^A	1.20 ± 0.16 ^A
Washing with peppermint essential oil emulsion at 1xMIC (0.25%) for 10 min	37.48 ± 0.45 ^A	-11.83 ± 0.36 ^A	12.90 ± 0.10 ^A	1.14 ± 0.44 ^A

^A Any means in the same column followed by the same letters are not significantly different ($p>0.05$)

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากพริกขี้หนูของการศึกษาที่ความเข้มข้น 0.125% ซึ่งสามารถลดจำนวน *S. Typhimurium* เริ่มต้น (5.16 log CFU/กรัม) ที่ใส่ลงบนใบโหระพาได้ 2.88 log CFU/กรัม หลังจากล้างเป็นเวลา 5 นาที กับอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบที่อบเชย (ใช้สาร cetylpyridinium chloride เป็น emulsifier) ความเข้มข้น 0.25% ซึ่งสามารถลดจำนวน *S. Typhimurium* เริ่มต้น (~7 log CFU/กรัม) ที่ใส่ลงบนใบโหระพาได้ 2.82 log CFU/กรัม หลังจากล้างเป็นเวลา 3 นาที (Park *et al.*, 2018b) จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพด้านเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวบนใบโหระพาใกล้เคียงกัน มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้นำอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากพืชชนิดต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้เป็นสารล้างทำความสะอาดผักและผลไม้สดที่ใส่เชื้อก่อโรคผ่านทางอาหาร โดยพบว่าอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยเจอเรเนียม (0.1%) ที่มีสารลดแรงตึงผิวประจุบวก (benzalkonium chloride) เป็น emulsifier สามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli* O157:H7 บนผักสด (คะน้า ใบหยิกสีม่วง (Redbor kale), ผักกาดขาวจีน (Chinese cabbage), มัสตาร์ดเขียว (green mustard)) ได้ 1.45-1.56 log CFU/กรัม เมื่อล้างเป็นเวลา 3 นาที (Park *et al.*, 2018a) และนาโนอิมัลชันของน้ำมันอบเชย (0.5%) สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* และ *L. monocytogenes* ที่ใส่ลงบนผลเมล่อนได้ เท่ากับ 5.5 log CFU/กรัม และ 7.7 log CFU/กรัม ตามลำดับ เมื่อทดสอบเป็นเวลา 1 นาที (Paudel *et al.*, 2019) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าอิมัลชันจากน้ำมันหอมระเหยของพืชหลายชนิดมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันหรือแตกต่างกัน ในการลดจำนวนเชื้อก่อโรคผ่านทางอาหารบนผักและผลไม้สด ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับชนิดของสารทดสอบ สารลดแรงตึงผิว ความเข้มข้นของสารทดสอบที่ใช้ ชนิดของจุลินทรีย์ปนเปื้อน พื้นผิวทางกายภาพผักและผลไม้ที่ใช้ทดสอบ รวมถึงระยะเวลาในการล้าง (Kang & Song, 2019 ; Kang & Kang, 2017)

สรุปผลการวิจัย

ค่า MIC และ MBC ของอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากพริกและสะระแหน่ต่อ *S. Typhimurium* มีค่าเท่ากัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.125% และ 0.25% ตามลำดับ เวลาที่สั้นที่สุดที่ทำให้เชื้อเริ่มต้นลดลง $> 3 \log \text{CFU/ml}$ ของอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากพริก (0.125%) และสะระแหน่ (0.25%) ต่อ *S. Typhimurium* คือ 5 และ 10 นาที ตามลำดับ การล้างใบโหระพาที่ใส่เชื้อ *S. Typhimurium* ด้วยอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากพริก (0.125%, 5 นาที) และสะระแหน่ (0.25%, 10 นาที) สามารถลดจำนวน *S. Typhimurium* บนใบโหระพา ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มี Tween 80 (ชุดควบคุม) นอกจากนี้ยังพบว่า การล้างใบโหระพาด้วยอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากพริกและสะระแหน่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของใบโหระพาเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ($p > 0.05$) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็น อิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากพริกและสะระแหน่มีฤทธิ์ต้าน *S. Typhimurium* ทั้งในหลอดทดลองและบนใบโหระพา ดังนั้นการล้างผักด้วยอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติ จึงถือว่าเป็นทางเลือกใหม่ที่ดีแทนการใช้สารเคมี และมีประโยชน์ต่อการลดจำนวนเชื้อที่ปนเปื้อนในผักและผลไม้สด ซึ่งจะทำให้ผู้บริโภคปลอดภัยและยอมรับได้มากขึ้น อีกทั้งยังเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยทำการทดสอบกับเชื้อก่อโรคอื่น ๆ เช่น *E. coli* และ *Listeria* ที่มักปนเปื้อนบนผักและผลไม้สด ศึกษาระยะเวลาในการยืดอายุการเก็บรักษาและคุณภาพทางโภชนาการของผักและผลไม้สดหลังล้างด้วยอิมัลชัน และทดสอบความคงตัวของอิมัลชัน เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ล้างผักเชิงพาณิชย์ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้การสนับสนุนทุนการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Bhargava, K., Conti, D.S., da Rocha, S.R.P., & Zhang, Y. (2015). Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. *Food Microbiology*, 47, 69-73.
- Budri, P.E., Silva, N.C.C., Bonsaglia, E.C.R., Fernandes Júnior, A., Araújo Júnior, J.P., Doyama, J.T., Gonçalves, J.L., Santos, M.V., Fitzgerald-Hughes, D., & Rall, V.L.M. (2015). Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. *Journal of Dairy Science*, 98(9), 5899-5904.
- Chawla, S., & Thakur, M. (2013). Overview of mint (*Mentha L.*) as a promising health-promoting Herb. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 5(06), 73-80.



- Chun, H.H., Yu, D.J., & Song, K.B. (2013). Effects of combined nonthermal treatment on microbial growth and the quality of minimally processed yam (*Dioscorea japonica* Thunb) during storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 48, 334–340.
- Chungsamanukool, P., Rattanadilok, Na., Phuket, N., Kantaeng, K. (2010). Microbial contamination in raw vegetables. *Bulletin of the Department of Medical Sciences*, 52(1-2), 30-39.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (1999). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; *Approved Guideline (M26-A)*, 19(18), 1-14.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; *Approved Standard-Ninth Edition (M07-A9)*, 32(2), 1-88.
- Delbeke, S., Ceuppens, S., Jacxsens, L., & Uyttendaele, M. (2015). Microbiological analysis of pre-packed sweet basil (*Ocimum basilicum*) and coriander (*Coriandrum sativum*) leaves for the presence of *Salmonella* spp. and Shiga toxin-producing *E. coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 208, 11-18.
- Donsi, F., & Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*, 233, 106-120.
- Ebani, V.V., Nardoni, S., Bertelloni, F., Tosi, G., Massi, P., Pistelli, L., & Mancianti, F. (2019). *In vitro* antimicrobial activity of essential oils against *Salmonella enterica* serotypes Enteritidis and Typhimurium Strains isolated from poultry. *Molecules*, 24(5), 900.
- Elcocks, E. R., Spencer-Phillips, P. T. N., & Adukwu, E.C. (2019). Rapid bactericidal effect of cinnamon bark essential oil against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, 128, 1025-1037.
- Ghosh, V., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2013). Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 338-344.
- Gil, M. I., Selma, M. V., López-Gálvez, F., & Allende, A. (2009). Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 37-45.



- Islam, M., Doyle, M.P., Phatak, S. C., Millner, P., & Jiang, X. (2004). Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Journal of Food Protection*, 67(7), 1365-1370.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., & Schmidt, E. (2006). Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6303-6307.
- Kang, J.H., & Song, K.B. (2018). Inhibitory effect of plant essential oil nanoemulsions against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* Typhimurium on red mustard leaves. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 45, 447-454.
- Kang, J.H., & Song, K.B. (2019). Antibacterial activity of the noni fruit extract against *Listeria monocytogenes* and its applicability as a natural sanitizer for the washing of fresh-cut produce. *Food Microbiology*, 84, 103260.
- Kang, J.H., Park, S.J., Park, J.B., & Song, K.B. (2019). Surfactant type affects the washing effect of cinnamon leaf essential oil emulsion on kale leaves. *Food Chemistry*, 271, 122-128.
- Kang, J.W., & Kang, D.H. (2017). Antimicrobial efficacy of vacuum impregnation washing with malic acid applied to whole paprika, carrots, king oyster mushrooms and muskmelons. *Food Control*, 82, 126-135.
- Karagözlü, N., & Ergönül, B. (2011). Determination of antimicrobial effect of mint and basil essential oils on survival of *E. coli* O157:H7 and *S. typhimurium* in fresh-cut lettuce and purslane. *Food Control*, 22(12), 1851-1855.
- Kong, X., Li, J., Liu, X., & Yang, Y. (2014). Advances in pharmacological research of eugenol. *Current Research in Complementary & Alternative Medicine*, 1(1), 8-11.
- Lopez-Romero, J.C., González-Ríos, H., Borges, A. (2015). Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 9, 1-9.



- Ma, Y.N., Xu, F.R., Chen, C.J., Li, Q.Q., Wang, M.Z., Cheng, Y.X., & Dong, X. (2019). The beneficial use of essential oils from buds and fruit of *Syzygium aromaticum* to combat pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *Industrial Crops & Products*, 133, 185-192.
- Mkaddem, M., Bouajila, J., Ennajar, M., Lebrihi, A., Mathieu, F., & Romdhane, M. (2009). Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha (longifolia* L. and *viridis*) essential oils. *Journal of Food Science*, 74(7), 358-363.
- Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A., & McClements, D.J. (2016). Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food Chemistry*, 194, 410-415.
- Niu, F., Pan, W., Su, Y., & Yang, Y. (2016). Physical and antimicrobial properties of thyme oil emulsions stabilized by ovalbumin and gum arabic. *Food Chemistry*, 212, 138-145.
- Nou, X., & Luo, Y. (2010). Whole-leaf wash improves chlorine efficacy for microbial reduction and prevents pathogen cross-contamination during fresh-cut lettuce processing. *Journal of Food Science*, 75, 283-290.
- Pankey, A.G., & Sabath, L.D. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanism of action in the treatment of gram positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38(6), 864-870.
- Park, J.B., Kang, J.H., & Song, K.B. (2018a). Geranium essential oil emulsion containing benzalkonium chloride as a wash solution on fresh-cut vegetables. *Food and Bioprocess Technology*, 11, 2164-2171.
- Park, J.B., Kang, J.H., & Song, K.B. (2018b). Antibacterial activities of a cinnamon essential oil with cetylpyridinium choride emulsion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in basil leaves. *Food Science and Biotechnology*, 27(1), 47-55.
- Paudel, S.K., Bhargava, K., & Kotturi, H. (2019). Antimicrobial activity of cinnamon oil nanoemulsion against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on melons. *LWT - Food Science and Technology*, 111, 682-687.
- Prakash, B., & Kiran, S. (2016). Essential oils: a traditionally realized natural resource for food preservation. *Current Science*, 110, 1890-1892.



- Pudpila, U., Khempaka, S., Molee, W., & Hormta, C. (2011). Comparison of distillation methods of *Mentha cordifolia* Opiz. essential oil on antibacterial activity for application use in animal feeds. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 1, 1336-1340.
- Ramose, B., Miller, F.A., Brandão, T.R.S., Teixeira, P., & Silva, C.L.M. (2013). Fresh fruits and vegetables-An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, 1-15.
- Saensuk, M. (2010). *Medicinal plant: holy basil, sweet basil, hary basil and Peppermint*. Bangkok: PlanB. (in Thai)
- Shahabi, N., Tajik, H., Moradi, M., Forough, M., & Ezati, P. (2017). Physical, antimicrobial and antibiofilm properties of *Zataria multiflora* Boiss essential oil nanoemulsion. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(7), 1645-1652.
- Soonthornchareonnon, N., & Ruangwiset, N. (2008). *Analysis-research quality of Thai medicinal plant*. (1st edition). Bangkok: Concept medicus. (in Thai)
- Varona, S., Martín, A., & Cocero, M.J. (2009). Formulation of a natural biocide based on lavandin essential oil by emulsification using modified starches. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48, 1121-1128.
- Zhang, Y., Wang, Y., Zhu, X., Cao, P., Wei, S., & Lu, Y. (2017). Antibacterial and antibiofilm activities of eugenol from essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry (clove) leaf against periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Microbial Pathogenesis*, 113, 396-402.
- Zhou, Y., Sun, S., Bei, W., Zahi, M. R., Yuan, Q., & Liang, H. (2018). Preparation and antimicrobial activity of oregano essential oil pickering emulsion stabilized by cellulose nanocrystals. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 7-13.