

การเสริมฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยกับน้ำผึ้งในการยับยั้ง
Escherichia coli O157:H7
Synergistic Antibacterial Activity of Essential Oils and Honeys
against *Escherichia coli* O157:H7

ตระหนัก สมเนตร*

Tranuk Somnate*

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

Department of Microbiology, Faculty of Science, Ubon Ratchathani Rajabhat University

*E-mail: tranuk.s@ubru.ac.th

Received: May 30, 2023

Revised: Jun 28, 2023

Accepted: Jul 03, 2023

บทคัดย่อ

Escherichia coli O157:H7 เป็นแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ก่อให้เกิดอาการฮีโมไลติกยูเรมิก สามารถติดต่อสู่คนโดยการกินอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อน ปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารมีความพยายามค้นหาสารกันเสียทางชีวภาพที่ปลอดภัย เช่น น้ำมันหอมระเหย และน้ำผึ้งเพื่อทดแทนสารกันเสียที่เป็นสารเคมีชนิดสังเคราะห์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยและน้ำผึ้งร่วมกันในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (MICs) ของน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิด ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ โป๊ยกั๊ก ใบโหระพา พลู และใบมะกรูด อยู่ระหว่าง 1.562-3.125 ไมโครลิตรต่อมิลลิเมตร ส่วนค่า MICs ของน้ำผึ้ง 5 ชนิด ได้แก่ น้ำผึ้งดอกกล้วยน้ำผึ้งดอกทานตะวัน น้ำผึ้งดอกลิ้นจี่ น้ำผึ้งดอกกาแฟ และน้ำผึ้งมานูกา อยู่ระหว่าง 6.25-25% (v/v) การประเมินการเสริมฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยกับน้ำผึ้งใช้วิธี checkerboard microbroth dilution และวิเคราะห์ผลด้วยค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม (FICI) ซึ่งพบว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยใบโหระพาพร้อมกับน้ำผึ้งดอกกาแฟ หรือน้ำผึ้งมานูกาแสดงฤทธิ์เสริมกัน โดยมีค่า FICI เท่ากับ 0.5 นอกจากนี้การใช้น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ หรือน้ำมันหอมระเหยใบมะกรูดร่วมกับน้ำผึ้งชนิดใดชนิดหนึ่งมีแนวโน้มเสริมฤทธิ์กัน โดยมีค่า FICI อยู่ระหว่าง 0.75-1.00 ดังนั้นการใช้น้ำมันหอมระเหยร่วมกับน้ำผึ้งอาจเป็นทางเลือกใหม่ในการใช้เป็นสารกันเสียทางชีวภาพเพื่อควบคุม *E. coli* O157:H7 ในอาหารได้

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย น้ำมันหอมระเหย น้ำผึ้ง การเสริมฤทธิ์

Abstract

Escherichia coli O157:H7 is an enteropathogenic bacteria causing hemolytic uremic syndrome. It is transmitted to humans through the consumption of contaminated foods. Currently, food industries try to find safe biological preservatives such as essential oils and honeys to replace synthetic chemical preservatives. The purpose of this research was to investigate the effects of combinations of essential oils and honeys on the inhibition of *E. coli* O157:H7. The results revealed that the minimum inhibitory concentrations (MICs) of five essential oils including lemongrass essential oil, anise star essential oil, sweet basil leaf essential oil, betel vine essential oil and kaffir lime leaf essential oil were between 1.562 and 3.125 $\mu\text{L/mL}$ while the MICs of 5 honeys including longan honey, sunflower honey, lychee honey, coffee honey and manuka honey ranged from 6.25 to 25% (v/v). The synergistic antibacterial activity of essential oils and honeys was evaluated by the checkerboard microbroth dilution assay and analyzed by the fractional inhibitory concentration index (FICI). It was found that the combinations of sweet basil leaf essential oil with coffee honey or manuka honey showed synergistic effect

with FICI of 0.5. Furthermore, the combinations of lemongrass essential oil or kaffir lime leaf essential oil with any kinds of the honeys showed additive effects with FICI values of 0.75-1.00. Therefore, the combination of essential oils with honeys may be a novel alternative as a biopreservative to control *E. coli* O157:H7 in food.

Keywords: Antibacterial activity, Essential oil, Honey, Synergism

1. บทนำ

ในปัจจุบันปัญหาการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษยังคงเกิดขึ้นอย่างกว้างขวางทั่วโลก ซึ่งการระบาดนั้นเกิดจากอาหารมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยส่วนใหญ่มักเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ที่สำคัญ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella* spp. (*S. boydii*, *S. flexneri*, *S. sonnei* และ *S. dysenteriae*), และแบคทีเรียกลุ่ม *Yersinia* spp. (*Y. enterocolitica* และ *Y. pseudotuberculosis*) [1] *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่ง พบได้ทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของคน และสัตว์เลื้อยคลาน แต่มีบางสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค และเป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยเมื่อมีการปนเปื้อนในอาหาร โดยเฉพาะ *E. coli* O157:H7 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) สามารถสร้างสารพิษ Shiga toxin ที่สามารถยับยั้งการสร้างโปรตีนและทำลายเซลล์เยื่อบุลำไส้ [2] มีผลทำให้ผู้ติดเชื้อเกิดโรค Hemolytic uremic syndrome มีอาการอุจจาระหรือปัสสาวะเป็นเลือด ไตวายเฉียบพลัน เม็ดเลือดแดงแตก และเสียชีวิตได้โดยเฉพาะเด็กและผู้สูงอายุ เชื้อชนิดนี้จัดเป็น *E. coli* ก่อโรคที่มีความสำคัญที่พบได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ มักปนเปื้อนในอาหารประเภท เนื้อสัตว์ นม ผัก ผลไม้สด ที่มีการปนเปื้อนของเสียจากวัว [3] ดังนั้นการป้องกันการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในอาหารจึงเป็นมาตรการสำคัญที่จะทำให้ผู้บริโภคมีความปลอดภัยจากการติดเชื้อชนิดนี้

การป้องกันการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหารนิยมใช้วัตถุกันเสีย (Preservatives) ซึ่งเป็นสารเคมีชนิดสังเคราะห์ เช่น สารเคมีในกลุ่ม ไนไตรท์ (Nitrites) ไนเตรท (Nitrates) ซัลไฟต์ (Sulfites) เบนโซเอต (Benzoates) หรือซอร์เบต (Sorbates) เป็นต้น สารเคมีเหล่านี้บางชนิดก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่รุนแรงต่อสุขภาพ เช่น การใช้ซัลไฟต์ในผลิตภัณฑ์อาหารจะกระตุ้นคนที่มีความไวต่อซัลไฟต์ (Sulfite hypersensitive) ให้มีอาการแพ้ เกิดผื่นคัน คลื่นไส้ ปวดท้อง ท้องเสีย เกิดอาการช็อกอย่างรุนแรง (Anaphylactic shock) และอาจทำให้เสียชีวิต [4] การใช้โซเดียมไนไตรท์ (Sodium nitrite) ในผลิตภัณฑ์เนื้อ เช่น แฮม ไส้กรอก เบคอน สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนระหว่างการปรุงอาหารด้วยความร้อน

เกิดเป็นสารไนโตรซามีน (Nitrosamine) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง [5] ดังนั้นจึงทำให้นักวิจัยมีความสนใจศึกษาหาสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารกันเสียทางชีวภาพ (Biopreservative) เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีชนิดสังเคราะห์ สารกันเสียทางชีวภาพชนิดหนึ่งที่น่าสนใจคือน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชสมุนไพรหรือเครื่องเทศ

น้ำมันหอมระเหย (Essential oil) เป็นสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้น มักมีกลิ่นหอมและระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิห้อง สามารถสกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ผล ดอก ใบ เปลือก และเมล็ด เป็นต้น โดยใช้วิธีการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ (Water and steam distillation) หรือการบีบอัดแบบเย็น (Cold pressing) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีสมบัติในการเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด มีงานวิจัยหลายเรื่องที่แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ [6] และยังสามารถใช้ในการถนอมอาหารได้อีกด้วย มีรายงานว่า การเติมน้ำมันหอมระเหยจากพืชลงในอาหารจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือต้านจุลินทรีย์ได้ [7] นอกจากนี้ ประเทศกลุ่มยุโรป (EU) ได้อนุญาตให้ใช้น้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนประกอบในอาหาร และเภสัชภัณฑ์ต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย [8] แต่การใช้น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นสูงจะเกินขีดระดับการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภค ดังนั้นจึงควรให้ลดความเข้มข้นลงกว่าระดับที่ออกฤทธิ์ในการต่อต้านจุลินทรีย์ได้ (Sublethal concentrations) และใช้ร่วมกับสารอื่น หรือใช้ร่วมกับวิธีอื่นแบบผสมผสาน [9]

น้ำผึ้ง (Honey) เป็นเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่ได้จากน้ำหวานที่ผึ้งเก็บมาจากดอกไม้ นิยมใช้เป็นอาหาร และอาหารเสริม รวมถึงผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง อุดมไปด้วยสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา [10] เนื่องจากคุณสมบัติทางกายภาพ และทางประสาทสัมผัสอื่น ๆ ทำให้น้ำผึ้งเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับสารเติมแต่งในอาหาร ปัจจุบันมีการใช้น้ำผึ้งในอุตสาหกรรมอาหารหลายชนิด เช่น เบเกอรี่ น้ำสลัด ซอส ผลิตภัณฑ์นม เนื้อ และขนมขบเคี้ยว (Snacks) [11] มีรายงานว่าฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำผึ้งช่วยต่อต้านการเน่าเสียของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารได้ เช่น เนื้อสัตว์ [12], [13] เนื้อปลา [14] และน้ำผลไม้ [15]

เมื่อไม่นานมานี้มีการรายงานถึงการเพิ่มประสิทธิภาพการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยโดยใช้ร่วมกับน้ำผึ้งเพื่อรักษาผลติดเชื้อ และควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น การใช้ น้ำมันหอมระเหยจากออริกาน (Oregano) ร่วมกับน้ำผึ้งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้ง *E. coli* [16] การใช้ น้ำมันหอมระเหยจากใบโหระพา ร่วมกับน้ำผึ้งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค [17] การใช้ น้ำมันหอมระเหยจากใบไทม์ (Thyme) ร่วมกับน้ำผึ้งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* [18] เป็นต้น จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำน้ำมันหอมระเหยมาใช้ร่วมกับน้ำผึ้งในประเทศไทย เพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยร่วมกับน้ำผึ้งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ซึ่งอาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้เป็นสารกันเสียทางชีวภาพทดแทนการใช้สารเคมีชนิดสังเคราะห์

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง คือ *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion (BHI) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ใน glycerol stock culture โดยใช้สัดส่วน glycerol:culture ของแบคทีเรียเท่ากับ 30:70 (v/v)

2.2. น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการศึกษา

น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นน้ำมันหอมระเหยทางการค้าที่สกัดสำเร็จรูป จากบริษัทโบทานิคเอสเซนส์ จำกัด (ประเทศไทย) จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ (Lemongrass essential oil) น้ำมันหอมระเหยใบฝรั่ง (Guava leaf essential oil) น้ำมันหอมระเหยโป๊ยกั๊ก (Anise star essential oil) น้ำมันหอมระเหยใบโหระพา (Sweet basil leaf essential oil) น้ำมันหอมระเหยพลู (Betel vine essential oil) น้ำมันหอมระเหยดอกกระดังงา (Cananga essential oil) น้ำมันหอมระเหยโกฐจุฬาลัมพา (Davana essential oil) และน้ำมันหอมระเหยใบมะกรูด (Kaffir lime leaf essential oil) บรรจุในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3. น้ำผึ้งที่ใช้ในการศึกษา

น้ำผึ้งที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นน้ำผึ้งทางการค้าที่ผ่าน

การบรรจุเป็นผลิตภัณฑ์แล้ว 5 ชนิด ได้แก่ น้ำผึ้งดอกกล้วย (Longan honey) น้ำผึ้งดอกทานตะวัน (Sunflower honey) น้ำผึ้งดอกลิ้นจี่ (Lychee honey) น้ำผึ้งดอกกาแฟ (Coffee honey) น้ำผึ้งเหล่านี้นำมาจากจังหวัดเชียงใหม่ นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังใช้น้ำผึ้งมานูก้า (Manuka honey) จากประเทศนิวซีแลนด์ เป็นชุดควบคุมผลบวก (Positive control) น้ำผึ้งทั้งหมดถูกเก็บไว้ในบรรจุภัณฑ์เดิม เก็บที่อุณหภูมิ 22 ± 1 องศาเซลเซียสตลอดระยะเวลาการศึกษา

2.4. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี Agar disc diffusion

เตรียมสารละลายแขวนลอยแบคทีเรีย โดยนำเชื้อบริสุทธิ์มาขีดแยกเชื้อลงบนอาหาร Mueller-Hinton Agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ถ่ายลงในอาหารเพาะเชื้อ Mueller-Hinton Broth (MHB) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการเจือจางเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 10^6 CFU/mL นำสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้มาเกลี่ย (Swab) ให้ทั่วผิวน้ำอาหารแข็ง MHA ด้วยไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ (Cotton swab) วางแผ่นดิสก์ (Disc) ขนาด 6 มิลลิเมตรที่ปราศจากเชื้อลงบนอาหารแข็งในตำแหน่งที่กำหนด จากนั้นหยดน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดที่ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide; DMSO) ที่ความเข้มข้น 400 ไมโครลิตรต่อมิลลิตรลงบนแผ่นดิสก์ นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด วัดและหาค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (จากการทดลอง 3 ซ้ำ) การทดลองนี้ใช้ DMSO เป็นชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

2.5. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำผึ้งด้วยวิธี Agar well diffusion

เตรียมสารละลายแขวนลอยแบคทีเรียดังข้อ 2.4. แล้วนำมาเกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำอาหารแข็ง MHA ด้วยไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นเจาะหลุม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วหยดน้ำผึ้งแต่ละชนิดที่ละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ความเข้มข้น 50% (v/v) ปริมาตรหลุมละ 60 ไมโครลิตร ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดสอบโดยวัดและหาค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (จากการทดลอง 3 ซ้ำ) การทดลองนี้ใช้ DMSO เป็นชุดควบคุมผลลบ

2.6. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยและน้ำผึ้งที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration; MIC) โดยใช้วิธี Resazurin microtiter assay

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ดัดแปลงจากวิธีของ Rahman et al. [19] โดยนำน้ำมันหอมระเหยมาเจือจางแบบเจือจางลงทีละ 2 เท่า ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton broth (MHB) ในไมโครเพลท (Micro plate) ขนาด 96 หลุม ให้มีค่าความเข้มข้นระหว่าง 0.781-400 ไมโครลิตรต่อมิลลิตร ปริมาณ 90 ไมโครลิตร เติมน้ำเชื้อแบคทีเรียจำนวน 1×10^5 CFU/mL ลงไปในหลุม ปริมาณ 10 ไมโครลิตร บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำสารละลาย Resazurin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร หลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อเพลท (Plate) โดยใช้ Positive control คือ หลุมที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อกับน้ำมันหอมระเหย ส่วน Negative control คือ หลุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับเชื้อที่ทำการทดสอบ อ่านผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยพิจารณาจากสีของ Resazurin เทียบกับชุดทดลองควบคุม ค่า MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยในหลุมสุดท้ายที่ไม่เกิดการเปลี่ยนสีม่วง น้ำเงินของ Resazurin ไปเป็นสีชมพู

สำหรับการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำผึ้งที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ทำได้โดยนำน้ำผึ้งมาเจือจางทีละ 2 เท่าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ในไมโครเพลท ขนาด 96 หลุม ให้มีค่าความเข้มข้นระหว่าง 0.78-50 % (v/v) ปริมาณ 190 ไมโครลิตร เติมน้ำเชื้อแบคทีเรียจำนวน 1×10^5 CFU/mL ลงไปในหลุม ปริมาณ 10 ไมโครลิตร บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำสารละลาย Resazurin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร หลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อเพลท โดยใช้ Positive control คือ หลุมที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อกับน้ำผึ้ง ส่วน Negative control คือ หลุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับเชื้อที่ทำการทดสอบ อ่านผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยพิจารณาจากสีของ Resazurin เทียบกับชุดทดลองควบคุม และพิจารณาค่า MIC เช่นเดียวกับการทดสอบของน้ำมันหอมระเหย

2.7. การประเมินการเสริมฤทธิ์กันของน้ำมันหอมระเหยและน้ำผึ้ง

นำน้ำมันหอมระเหยและน้ำผึ้งมาตรวจสอบการเสริมฤทธิ์กันด้วยวิธี Checkerboard microbroth dilution test [20] โดยมีวิธีการดังนี้ ผสมน้ำมันหอมระเหยและน้ำผึ้งที่กำหนดระดับความเข้มข้นตั้งแต่ MIC-MIC/8 เท่า โดยไล่ความเข้มข้นจากมากไปหาน้อยในแนวตั้งและแนวนอนของไมโครเพลท (column/row) โดยกำหนดปริมาตรของสารแต่ละชนิดที่ 45 ไมโครลิตร เติมน้ำเชื้อแบคทีเรียจำนวน 1×10^5 CFU/mL ลงไปในหลุมปริมาณ 10 ไมโครลิตร บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำสารละลาย Resazurin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร หลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกผลแล้วนำมาหาค่า MIC และการหาค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม FICI (Fractional Inhibitory Concentration Index)

2.8. การหาค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม

การหาค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม (Fractional inhibitory concentration index; FICI) มีสูตรคำนวณดังนี้

$$FICI = FIC_{EO} + FIC_H$$

โดยที่

FIC_{EO} = Fractional inhibitory concentration ของน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีสูตรคำนวณดังนี้

$$FIC_{EO} = (MIC_{EQ+H}/MIC_{EO})$$

เมื่อ

MIC_{EQ+H} = MIC ของน้ำมันหอมระเหยเมื่อใช้ร่วมกับน้ำผึ้ง

$$MIC_{EO} = \text{MIC ของน้ำมันหอมระเหยอย่างเดียว}$$

และ

FIC_H = Fractional inhibitory concentration ของน้ำผึ้ง ซึ่งมีสูตรคำนวณดังนี้

$$FIC_{EO} = (MIC_{EO+H}/MIC_{EO})$$

เมื่อ

MIC_{EO+H} = MIC ของน้ำผึ้งเมื่อใช้ร่วมกับน้ำมันหอมระเหย

$$MIC_{EO} = \text{MIC ของน้ำผึ้งอย่างเดียว}$$

การแปลผลค่า FICI ใช้เกณฑ์ดังนี้ $FICI \leq 0.5$ หมายถึง เสริมฤทธิ์กัน (Synergistic effect), $0.5 < FICI \leq 1$ หมายถึง มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์กัน (Additive effect), $1 < FICI \leq 4$ หมายถึง ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (Indifferent effect), $FICI > 4$ หมายถึง ต้านฤทธิ์กัน (Antagonistic effect)

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

3.1. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี Agar disc diffusion

จากการทดสอบความสามารถของน้ำมันหอมระเหย 8 ชนิด ต่อเชื้อ *E. coli* O157:H7 ด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่า มีน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิดได้แก่ น้ำมันหอมระเหยพลู โปหระพา ตะไคร้ โป๊ยกั๊ก และใบมะกรูด สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ ทั้งนี้ น้ำมันหอมระเหยโปหระพามีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้สูงสุดจากขนาดวงใสที่ได้คือ 23.57 ± 0.21 มิลลิเมตร ดังแสดงใน Table 1 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Amor et al. [21] ซึ่งพบว่า น้ำมันหอมระเหยโปหระพามีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* 32 ได้ อย่างไรก็ตามมีน้ำมันหอมระเหยอีก 3 ชนิดที่ไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ คือ ใบฝรั่ง ดอกกระดังงา และโกฐจุฬาลัมพา จากการศึกษาของ Thompson et al. [22] พบว่า น้ำมันหอมระเหยดอกกระดังงามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยเฉพาะ *E. coli* ในระดับต่ำมาก (8.7 ± 0.3 มิลลิเมตร) ส่วน Tan et al. [23] พบว่า น้ำมันหอมระเหยดอกกระดังงามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบได้ต่ำเช่นกันโดยเฉพาะใน *E. coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 ในขณะที่ Biswas et al. [24] พบว่า สารสกัดจากใบฝรั่งไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli* และ *Salmonella enteritidis* แต่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus*) ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างของผนังเซลล์ซับซ้อนมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยผนังเซลล์ของแกรมลบประกอบด้วยชั้นเปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) บาง ๆ ถูกล้อมรอบด้วยผนังเซลล์ชั้นนอก (Outer membrane) ซึ่งประกอบด้วยสารในกลุ่ม Lipopolysaccharide [24] ทำให้ขัดขวางการซึมผ่านของน้ำมันหอมระเหย แบคทีเรียแกรมลบจึงมีความทนทานต่อการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยได้มากกว่า [25]

3.2. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยใช้วิธี Rezasurin microtiter assay

เมื่อนำน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิดที่ให้ผลบวกจากวิธี Agar disc diffusion ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยพลู โปหระพา ตะไคร้ โป๊ยกั๊ก และ ใบมะกรูด มาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ด้วยวิธี Rezasurin microtiter assay พบว่า น้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ได้ โดยน้ำมันหอมระเหยโปหระพาแสดงฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ส่วนน้ำมันหอมระเหยพลู โป๊ยกั๊ก ตะไคร้ และใบมะกรูด มีค่า MIC เท่ากับ 3.12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ดังแสดงใน Table 1 สอดคล้องกับการศึกษาของ Amor et al. [21] ที่แสดงให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหยโปหระพามีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *E. coli* 32 ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ Moghaddam et al. [26] พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากโปหระพาด้านการเจริญของ *E. coli* ได้เช่นกัน โดยมีค่า MIC เท่ากับ 9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการศึกษาของ Semeniuc et al. [27] พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากโปหระพามีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *E. coli* ATCC 25992 ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 10.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Tangpao et al. [28] ได้วิเคราะห์สาระสำคัญในโหระพาของประเทศไทย 3 สายพันธุ์ คือ Tree basil (*Ocimum gratissimum*) Sweet basil (*O. basilicum* var. *thyrsiflorum*) และ Lemon basil (*O. citriodorum*) พบว่า มีสารสำคัญหลัก 3 ชนิดคือ Methyl eugenol, Estragole (Methyl chavicol) และ Eugenol โดยมีงานวิจัยหลายเรื่องที่แสดงให้เห็นว่า Methyl eugenol และ Eugenol มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ [29]-[32] ในขณะที่ Stefan et al. [33] ได้วิเคราะห์สารต้านจุลินทรีย์ที่สำคัญในโปหระพา 3 สายพันธุ์ในประเทศโรมาเนีย และพบว่าส่วนใหญ่ คือ Linalool (38.60-65.38%), Eugenol (3.47-10.20%) และ tau-Cadinol (3.47-10.20%) Ahmed et al. [34] พบว่า น้ำมันหอมระเหยโปหระพา (*O. basilicum* L.) จากประเทศอียิปต์มีสารสำคัญ ได้แก่ Linalool (31.65%), Estragole (17.37%), Methyl-cinnamate (15.14%), Bicyclosisquiphellandrene (6.01%) และ Eucalyptol (4.04%)

จากการศึกษาของ Van et al. [35] แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างกันของค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสกุลเดียวกันที่นำมาทดสอบอาจเกิดจาก สายพันธุ์ของแบคทีเรีย สภาวะในการบ่มเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดของอิมัลซิฟายเออร์ (Emulsifiers) และตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยยังขึ้นกับ สายพันธุ์ของพืช แหล่งพื้นที่เพาะปลูก ลักษณะภูมิประเทศ ระยะเวลาการเก็บเกี่ยวผลผลิต ส่วนของพืชที่ใช้ในการสกัด วิธีการสกัด รวมถึงสารละลายที่ใช้สกัด [36]

Table 1 Inhibition zone diameters and minimum inhibitory concentrations (MICs) of essential oils (EOs) against *Escherichia coli* O157:H7 using agar disc diffusion method and rezasurin microtiter assay

Essential oil	Inhibition zone diameter (mm)	MIC (μ L/mL)
Betel vine EO	16.13 $\pm$ 0.21	3.125
Sweet basil leaf EO	23.57 $\pm$ 0.21	1.562
Lemongrass EO	15.43 $\pm$ 0.06	3.125
Anise star EO	9.27 $\pm$ 0.20	3.125
Kaffir lime leaf EO	13.77 $\pm$ 0.25	3.125
Guava leaf EO	0 $\pm$ 0.00	-
Davana EO	0 $\pm$ 0.00	-
Cananga EO	0 $\pm$ 0.00	-

3.3. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำผึ้งด้วยวิธี Agar well diffusion

เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำผึ้ง 5 ชนิดที่ผ่านการเป็นบรรจุภัณฑ์แล้วต่อเชื้อ *E. coli* O157:H7 ด้วยวิธี Agar well diffusion ที่ความเข้มข้น 50 % (v/v) พบว่า น้ำผึ้งทั้ง 4 ชนิดจากจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ น้ำผึ้งดอกลำไย น้ำผึ้งดอกทานตะวัน น้ำผึ้งดอกลิ้นจี่ และน้ำผึ้งดอกกาแฟ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้โดยให้บริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 34.67 $\pm$ 0.25 ถึง 36.03 $\pm$ 0.15 มิลลิเมตร ดังแสดงใน Table 2 จากผลการทดลองแสดงความสอดคล้องกับการศึกษาของ Pham et al. [37] ที่แสดงให้เห็นว่าน้ำผึ้งดอกลำไย และดอกลิ้นจี่จากประเทศเวียดนามมีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ได้เช่นกัน (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 14 $\pm$ 1.00 มิลลิเมตร และ 13 $\pm$ 1.00 มิลลิเมตรตามลำดับ) และยังสามารถสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Chanchao et al. [38] ซึ่งพบว่าน้ำผึ้งดอกลำไยความเข้มข้น 50 % (v/v) สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 33.7 $\pm$ 0.21 มิลลิเมตร) ขณะที่ El-Toum and Yagoub [39] พบว่า น้ำผึ้งดอกทานตะวันจากประเทศซูดานความเข้มข้น 50 %

(v/v) สามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ได้โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 25 มิลลิเมตร เช่นเดียวกับการศึกษาของ Awan et al. [40] ซึ่งพบว่าน้ำผึ้งดอกทานตะวันจากประเทศปากีสถานความเข้มข้นตั้งแต่ 20% (v/v) สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ ทั้งนี้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวเกิดจากองค์ประกอบของน้ำผึ้งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง (High osmolality) มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; H₂O₂) สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) มีความเป็นกรด รวมถึงสารในกลุ่มไฟโตเคมีคอล (Phytochemical compounds) ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ [41] อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำผึ้งมานูก้า ซึ่งเป็นชุดควบคุมผลบวก แสดงฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 37.87 $\pm$ 0.22 มิลลิเมตร มีรายงานว่าน้ำผึ้งมานูก้าจากประเทศนิวซีแลนด์ที่ได้จากดอกมานูก้า (*Leptospermum scoparium*) มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์สูงมากเป็นพิเศษเมื่อเทียบกับน้ำผึ้งชนิดอื่น [42] เนื่องจากน้ำผึ้งมานูก้ามีองค์ประกอบของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) Protein defensin-1 และสารประกอบฟีนอลิกที่เรียกว่า Methylglyoxal (MGO) สูงกว่าน้ำผึ้งทั่วไป จาก

การศึกษากลไกการทำลายแบคทีเรียของ Kim and Kang [43] พบว่า น้ำผึ้งมานูก้า UMF 5+ สามารถลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *E. coli* O157:H7 ได้ เนื่องจากน้ำผึ้งมีผลในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ซึ่งเป็นชั้นพอลิเมอร์ (Polymer) เพื่อใช้ในการยึดเกาะและปกป้องเซลล์ของ *E. coli* O157:H7 การศึกษาของ Bouzo et al. [44] แสดงให้เห็นว่า น้ำผึ้งมานูก้าทำลายแรงขับเคลื่อนโปรตอน (Proton motive force) บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ *Pseudomonas aeruginosa* ทำให้โปรตอนเกิดการรั่วไหลและทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ในขณะที่การศึกษาของ Al-Sayaghi et al. [45] พบว่าน้ำผึ้งมานูก้ามีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน และทำลาย DNA ของ *E. coli*

3.4. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำผึ้งที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Rezasurin microtiter assay

เมื่อนำน้ำผึ้งทั้ง 5 ชนิดที่ให้ผลบวกจากการคัดกรองเบื้องต้นด้วยวิธี Agar well diffusion มาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ด้วยวิธี Rezasurin microtiter assay พบว่าน้ำผึ้งทั้ง 5 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ได้ โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 6.25-25 % (v/v) ดังแสดงใน Table 2 พบว่า น้ำผึ้งมานูก้าแสดงฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุดมีค่า MIC เท่ากับ 6.25 % (v/v) ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Lin et al. [46] ที่ใช้น้ำผึ้งมานูก้า UMF16+ ทดสอบกับ ESBL *E. coli* ให้ค่า MIC ประมาณ 6% (v/v) และการศึกษาของ Sherlock et al. [47] ที่ใช้น้ำผึ้ง

มานูก้าทดสอบกับ *E. coli* ATCC 35218 ให้ค่า MIC เท่ากับ 12.5% (v/v) ส่วน Nolan et al. [48] พบว่า เมื่อใช้น้ำผึ้งมานูก้าทางการค้า Comvita 5+ และ Comvita 10+ กับ *E. coli* ให้ค่า MIC เท่ากับ 15% (v/v) แต่หากใช้น้ำผึ้งมานูก้า Comvita 15+ กับ *E. coli* จะให้ค่า MIC สูงขึ้นเท่ากับ 21% (v/v) ความแตกต่างของค่า MIC นี้ อาจเนื่องจากปริมาณสาร MGO ในน้ำผึ้งมานูก้าที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการผลิต และระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำผึ้ง [49] Green et al. [50] ได้เปรียบเทียบปริมาณสารต้านแบคทีเรียของน้ำผึ้งมานูก้าในประเทศออสเตรเลีย พบว่า น้ำผึ้งมานูก้าที่มีปริมาณ MGO สูงจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่า โดยมีความสัมพันธ์กับการลดลงของค่า MIC สำหรับการยับยั้ง *E. coli*, *E. faecalis* และ *S. aureus* แบบมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

เมื่อเทียบประสิทธิภาพการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ของน้ำผึ้งจากเชียงใหม่ด้วยกันพบว่า น้ำผึ้งดอกกาแฟมีค่า MIC ต่ำกว่าอีก 3 ชนิด โดยน้ำผึ้งดอกกาแฟมีค่า MIC เท่ากับ 12.5% (v/v) ขณะที่น้ำผึ้งดอกกล้วย น้ำผึ้งดอกทานตะวัน และน้ำผึ้งดอกลิ้นจี่มีค่า MIC เท่ากันคือ 25% (v/v) Jantakee and Tragoolpua [41] ได้ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ในน้ำผึ้งของไทย พบว่าน้ำผึ้งดอกกาแฟมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าน้ำผึ้งดอกกล้วย น้ำผึ้งดอกทานตะวัน และน้ำผึ้งดอกลิ้นจี่ แต่อย่างไรก็ตามปัจจัยทั้งสองนี้ไม่ได้มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียเมื่อทดสอบกับ *Corynebacterium* sp., *S. aureus* และ *P. acnes*

Table 2 Inhibition zone diameters and minimum inhibitory concentrations (MICs) of honeys against *Escherichia coli* O157:H7 using agar disc diffusion method and rezasurin microtiter assay

Honey	Inhibition zone diameter (mm)	MIC (% v/v)
Longan honey	34.67 ± 0.25	25
Sunflower honey	34.90 ± 0.31	25
Lychee honey	34.87 ± 0.27	25
Coffee honey	36.03 ± 0.15	12.5
Manuka honey	37.87 ± 0.22	6.25

3.5. การประเมินการเสริมฤทธิ์กันของน้ำมันหอมระเหยและน้ำผึ้งและการหาค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม

เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ด้วยการใช้ น้ำมันหอมระเหยเพียงชนิดเดียว หรือน้ำผึ้งเพียงชนิดเดียว กับการใช้น้ำมันหอมระเหยร่วมกับน้ำผึ้ง โดยการผสมน้ำมันหอมระเหยและน้ำผึ้งที่กำหนดความเข้มข้น ตั้งแต่ระดับ MIC-MIC/8 เท่า ทำการตรวจสอบด้วยวิธี Checkerboard microbroth dilution test และหาค่า FICI พบว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยพลูร่วมกับน้ำผึ้ง หรือการใช้น้ำมันหอมระเหยเปียก็ร่วมกับน้ำผึ้งให้ผลการเสริมฤทธิ์กันไม่ต่างจากการใช้สารชนิดเดียว (Indifferent) ในขณะที่เมื่อใช้น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ร่วมกับน้ำผึ้ง และการใช้น้ำมันหอมระเหยใบมะกรูดร่วมกับน้ำผึ้งมีแนวโน้มเสริมฤทธิ์กัน (Additive) โดยให้ค่า FICI อยู่ระหว่าง 0.75-1.00

จากการศึกษาของ Ganjewala [51] แสดงให้เห็นเช่นเดียวกันว่า การใช้น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ (*Cymbopogon flexuosus*) ร่วมกับน้ำผึ้งทางการค้ามีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ได้อย่างดีดีกว่าการใช้น้ำมันหอมระเหย หรือน้ำผึ้งเพียงอย่างเดียว ผลการทดลองเป็นไปในทางเดียวกันกับการใช้น้ำมันหอมระเหยใบโหระพาพร้อมกับน้ำผึ้งดอกกล้วย น้ำผึ้งดอกทานตะวัน หรือน้ำผึ้งดอกลิ้นจี่ที่มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์กันเช่นกัน มีเพียงการใช้น้ำมันใบโหระพาพร้อมกับน้ำผึ้งดอกกาแฟ และการใช้น้ำมันใบโหระพาพร้อมกับน้ำผึ้งมานูก้าที่ให้ผลเสริมฤทธิ์กัน (Synergism) โดยให้ค่า FICI เท่ากับ 0.5 ดังแสดงใน Table 3 จากการศึกษานี้ของ Khalil et al. [52] แสดงให้เห็นเช่นกันว่าการใช้น้ำผึ้งความเข้มข้น 50%(v/v) ร่วมกับสารสกัดเมทานอลจากใบโหระพามีฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้งแกรมบวกและแกรมลบ สำหรับการทดลองนี้ยังไม่สามารถอธิบายกลไกการเสริมฤทธิ์ร่วมกันของน้ำมันหอมระเหยใบโหระพากับน้ำผึ้งดอกกาแฟ หรือน้ำผึ้งมานูก้าต่อ *E. coli* O157:H7 ได้ การจำแนกสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในน้ำมันหอมระเหยและน้ำผึ้งดังกล่าวเพิ่มเติมอาจทำให้ทราบกลไกการทำงานร่วมกันและนำมาใช้ประโยชน์เพื่อควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในอนาคตได้

4. บทสรุป

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยร่วมกับน้ำผึ้งเพื่อยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 จากการทดลองพบว่า น้ำมันหอมระเหยใบโหระพาสามารถเสริมฤทธิ์กับน้ำผึ้งดอกกาแฟ หรือน้ำผึ้งมานูก้าได้ จึงมีความน่าสนใจที่จะนำไปทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นเพิ่มเติมเพื่อใช้เป็นสารกันเสียทางชีวภาพในการควบคุมการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารในอนาคต

5. References

- [1] Smith, J.L. and Fratamico, P.M. 2016. *Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae: Food poisoning and health effects. **Encyclopedia of Food and Health**. 2016: 539-544.
- [2] Buzby, J.C. and Roberts, T. 2009. The economics of enteric infections: human foodborne disease costs. **Gastroenterology**. 136(6): 1851-1862.
- [3] Mengistu, S., Abayneh, E. and Shiferaw, D. 2017. *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* species: Public health importance and microbial safety in beef at selected slaughter houses and retail shops in eastern Ethiopia. **Journal of Veterinary Science and Technology**. 8(5): 1-8.
- [4] Hugo, C.J. and Hugo, A. 2015. Current trends in natural preservatives for fresh sausage products. **Trends in Food Science & Technology**. 45(1): 12-23.
- [5] Crowe, W., Elliott, C.T. and Green, B.D. 2019. A review of the in vivo evidence investigating the role of nitrite exposure from processed meat consumption in the development of colorectal cancer. **Nutrients**. 11(11): 1-17.

Table 3 Minimum inhibitory concentrations (MICs) and fractional inhibitory concentrations (FICs) of essential oils (EOs) and honeys when used individually and in combination

Antibacterial agent	MIC		FIC		Interpretation
	Individual	Combination	Individual	FICI	
Betel vine EO	3.125	3.125	1	2	Indifferent
Longan honey	25	25	1		
Betel vine EO	3.125	3.125	1	2	Indifferent
Sunflower honey	25	25	1		
Betel vine EO	3.125	3.125	1	2	Indifferent
Lychee honey	25	25	1		
Betel vine EO	3.125	3.125	1	2	Indifferent
Coffee honey	12.5	12.5	1		
Betel vine EO	3.125	3.125	1	2	Indifferent
Manuka honey	6.25	6.25	1		
Lemongrass EO	3.125	1.562	0.5	1	Additive
Longan honey	25	12.5	0.5		
Lemongrass EO	3.125	0.781	0.25	0.75	Additive
Sunflower honey	25	12.5	0.5		
Lemongrass EO	3.125	0.781	0.25	0.75	Additive
Lychee honey	25	12.5	0.5		
Lemongrass EO	3.125	1.562	0.5	1	Additive
Coffee honey	12.5	6.25	0.5		
Lemongrass EO	3.125	1.562	0.5	1	Additive
Manuka honey	6.25	3.125	0.5		
Sweet basil leaf EO	1.562	0.39	0.25	0.75	Additive
Longan honey	25	12.5	0.5		
Sweet basil leaf EO	1.562	0.39	0.25	0.75	Additive
Sunflower honey	25	12.5	0.5		
Sweet basil leaf EO	1.562	0.39	0.25	0.75	Additive
Lychee honey	25	12.5	0.5		
Sweet basil leaf EO	1.562	0.39	0.25	0.5	Synergism
Coffee honey	12.5	3.125	0.25		
Sweet basil leaf EO	1.562	0.39	0.25	0.5	Synergism
Manuka honey	6.25	1.562	0.25		

Table 3 Minimum inhibitory concentrations (MICs) and fractional inhibitory concentrations (FICs) of essential oils (EOs) and honeys when used individually and in combination (continued)

Antibacterial agent	MIC		FIC		Interpretation
	Individual	Combination	Individual	FICI	
Anise star EO	3.125	3.125	1	2	Indifferent
Longan honey	25	25	1		
Anise star EO	3.125	3.125	1	2	Indifferent
Sunflower honey	25	25	1		
Anise star EO	3.125	3.125	1	2	Indifferent
Lychee honey	25	25	1		
Anise star EO	3.125	3.125	1	2	Indifferent
Coffee honey	12.5	12.5	1		
Anise star EO	3.125	3.125	1	2	Indifferent
Manuka honey	6.25	6.25	1		
Kaffir lime leaf EO	3.125	1.562	0.5	1	Additive
Longan honey	25	12.5	0.5		
Kaffir lime leaf EO	3.125	1.562	0.5	1	Additive
Sunflower honey	25	12.5	0.5		
Kaffir lime leaf EO	3.125	1.562	0.5	1	Additive
Lychee honey	25	12.5	0.5		
Kaffir lime leaf EO	3.125	0.781	0.5	0.75	Additive
Coffee honey	12.5	6.25	0.25		
Kaffir lime leaf EO	3.125	0.781	0.5	0.75	Additive
Manuka honey	6.25	3.125	0.25		

FIC (Individual) = FIC of essential oil or FIC of honey

FICI = FIC of essential oil + FIC of honey

- [6] Chouhan, S., Kanika, S. and Sanjay, G. 2017. Review: Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. **Medicines**. 4(3): 1-21.
- [7] Maurya, A. and et al. 2021. Essential oils and their application in food safety. **Frontiers in Sustainable Food Systems**. 5: 1-25.
- [8] Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. **International Journal of Food Microbiology**. 94(3): 223-253.
- [9] Prakash, B. and et al. 2018. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**. 89: 1-11.
- [10] Majtan, J. and et al. 2021. Honey antibacterial activity: A neglected aspect of honey quality assurance as functional food. **Trends in Food Science & Technology**. 118: 870-886.
- [11] Bellik, Y. and Iguer-ouada, M. 2014. **Honey in the food industry**. Boca Raton: CRC press.
- [12] Yucel, B. and et al. 2005. Effect of honey treatment on some quality characteristics of broiler breast meat. **Journal of Applied Animal Research**. 28(1): 53-56.
- [13] Ayoob, M. and et al. 2023. Antimicrobial and antioxidative effects of honey marination on beef meat. **Pakistan Journal of Zoology**. 55(3): 1409-1416.
- [14] Hakim, D.A., Tjahjaningsih, W. and Sudarno. 2019. Antibacterial activity of honey in preserving high-pressure cooked milkfish stored at room temperature. In: **Proceeding of the 1st International Conference on Fisheries and Marine Science**, 6 October 2018. Surabaya, Indonesia.
- [15] Iqbal, M.N. 2015. Assessment of microbial load of un-pasteurized fruit juices and in vitro antibacterial potential of honey against bacterial isolates. **The Open Microbiology Journal**. 9: 26-32.
- [16] Imtara, H., Elamine, Y. and Lyoussi, B. 2018. Honey antibacterial effect boosting using *Origanum Vulgare* L. essential oil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2018: 7842583.
- [17] Khalil, A.T. and et al. 2013. Synergistic antibacterial effect of honey and *Herba Ocimi Basilici* against some bacterial pathogens. **Journal of Traditional Chinese Medicine**. 33(6): 810-814.
- [18] Abdellah, F. and et al. 2012. Synergistic effect of honey and *Thymus ciliatus* against pathogenic bacteria. **The Open Nutraceuticals Journal**. 5: 174-178.
- [19] Rahman, M. and et al. 2004. Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. 7(4): 2398-2403.
- [20] Collee, J.G. and et al. 1996. **Practical Medical Microbiology**. New York: Churchill Livingstone.
- [21] Amor, G. and et al. 2021. Basil essential oil: Composition, antimicrobial properties, and microencapsulation to produce active chitosan films for food packaging. **Foods**. 10(1): 1-16.
- [22] Thompson, A. and et al. 2013. Comparison of the antibacterial activity of essential oils and extracts of medicinal and culinary herbs to investigate potential new treatments for irritable bowel syndrome. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 13: 338.

- [23] Tan, L.T.H. and et al. 2015. Traditional uses, phytochemistry, and bioactivities of *Cananga odorata* (ylang-ylang). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2015: 896314.
- [24] Biswas, B. and et al. 2013. Antimicrobial activities of leaf extracts of guava (*Psidium guajava* L.) on two gram-negative and gram-positive bacteria. **International Journal of Microbiology**. 2013: 746165.
- [25] Atares, L. and Chiralt, A. 2016. Review: Essential oil as additives in biodegradable films and coating for active food packaging. **Trends in Food Science and Technology**. 48: 51-62.
- [26] Moghaddam, A.M.D. and et al. 2011. Antimicrobial activity of essential oil extract of *Ocimum basilicum* L. leaves on a variety of pathogenic bacteria. **Journal of Medicinal Plants Research**. 5(15): 3453-3456.
- [27] Semeniuc, C.A., Pop, C.R. and Rotar, A.M. 2017. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Journal of Food and Drug Analysis**. 25(2): 403-408.
- [28] Tangpao, T., Chung, H. and Sommano, S.R. 2018. Aromatic profiles of essential oils from five commonly used Thai basil. **Foods**. 7(11): 175.
- [29] Kumar, A. and et al. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Melaleuca genistifolia* leaf essential oil from the northern plains of India. **Natural Product Communications**. 3(10): 1741-1744.
- [30] Lopez, M.K.N., Hadisurya, M. and Cornwall, R.G. 2019. Antimicrobial investigation and structure activity analysis of natural eugenol derivatives against several oral bacteria. **Journal of Pharmaceutical Microbiology**. 5(1): 1-4.
- [31] Joshi, A. and et al. 2021. Methyl eugenol, 1,8-cineole and nerolidol rich essential oils with their biological activities from three *Melaleuca* species growing in Tarai region of north India. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 64: e21210186.
- [32] Bai, X. and et al. 2022. Antibacterial effect of eugenol on *Shigella flexneri* and its mechanism. **Foods**. 11: 2565.
- [33] Stefan, M. and et al. 2013. The composition and antibacterial activity of essential oils in three *Ocimum* species growing in Romania. **Central European Journal of Biology**. 8(6): 600-608.
- [34] Ahmed, A.F. and et al. 2019. Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of Sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. **Food Science and Human Wellness**. 8(3): 299-305.
- [35] Van de Vel, E., Sampers, I. and Raes, K. 2019. A review on influencing factors on the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 59(3): 357-378.
- [36] Swamy, M.K., Akhtar, M.S. and Sinniah, U.R. 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2016: 3012462.
- [37] Pham, T.N. and et al. 2022. Phenolic profiles, antioxidant, antibacterial activities and nutritional value of Vietnamese honey from different botanical and geographical sources. **AgriEngineering**. 4(4): 1116-1138.
- [38] Chanchao, C., Sintara, K. and Wongsiri, S. 2006. Comparison of antibiotic and organoleptic property of honey from various plant sources in Thailand. **Journal of Apicultural Science**. 50(2): 59-64.

- [39] El-Toum, S.K. and Yagoub, S.O. 2007. Compression study of anti-microbial activity of honey-bees. **Research Journal of Microbiology**. 2(10): 776-781.
- [40] Awan, U.A., Ali, S. and Andleeb, S. 2014. A comparative study of antibacterial and antioxidant activities of wild honey (sunflower and eucalyptus) and commercial honey. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacology**. 1(3): 211-218.
- [41] Jantakee, K. and Tragoolpua, Y. 2015. Activities of different types of Thai honey on pathogenic bacteria causing skin diseases, tyrosinase enzyme and generating free radicals. **Biological research**. 48(1): 4.
- [42] Alnaimat, S., Wainwright, M. and Al'Abri, K. 2012. Antibacterial potential of honey from different origins: a comparison with manuka honey. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**. 1(5): 1328-1338.
- [43] Kim, S.Y. and Kang, S.S. 2020. Anti-biofilm activities of manuka honey against *Escherichia coli* O157: H7. **Food Science of Animal Resources**. 40(4): 668-674.
- [44] Bouzo, D. and et al. 2020. Characterizing the mechanism of action of an ancient antimicrobial, manuka honey, against *Pseudomonas aeruginosa* using modern transcriptomics. **mSystems**. 5(3): 106-120.
- [45] Al-Sayaghi, A.M. and et al. 2022. Antibacterial mechanism of action of two types of honey against *Escherichia coli* through interfering with bacterial membrane permeability, inhibiting proteins, and inducing bacterial DNA damage. **Antibiotics**. 11(9): 1182.
- [46] Lin, S.M., Molan, P.C. and Cursons, R. 2011. The controlled in vitro susceptibility of gastrointestinal pathogens to the antibacterial effect of manuka honey. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. 30(4): 569-574.
- [47] Sherlock, O. and et al. 2010. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 10: 47.
- [48] Nolan, V.C. and et al. 2020. Clinical Significance of manuka and medical-grade honey for antibiotic-resistant infections: A systematic review. **Antibiotics**. 9(11): 766.
- [49] Girma, A., Seo, W. and She, R.C. 2019. Antibacterial activity of varying UMF-graded manuka honeys. **PLoS One**. 14(10): e0224495.
- [50] Green, K. and et al. 2022. Correlation of the antibacterial activity of commercial manuka and Leptospermum honeys from Australia and New Zealand with methylglyoxal content and other physicochemical characteristics. **PLoS One**. 17(7): e0272376.
- [51] Ganjewala, D. and et al. 2014. Antibacterial properties of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Steud) wats essential oils in single form and combination of honey against drug resistant pathogenic bacteria. **Journal of Biologically Active Products from Nature**. 4(4): 278-285.
- [52] Khalil, A.T. and et al. 2013. Synergistic antibacterial effect of honey and *Herba Ocimi Basilici* against some bacterial pathogens. **Journal of traditional Chinese medicine**. 33(6): 810-814.