

การยับยั้ง *Salmonella* Typhimurium ในหลอดทดลองและบนใบสะระแหน่ด้วยน้ำมันหอมระเหยไธม์

Inhibition of *Salmonella* Typhimurium *in Vitro* and on Kitchen Mint Leaves by Thyme (*Thymus vulgaris*) Essential Oil

อุมาพร ทาไรสง*, รุ่งนภา มั่นคง และ นภัสร เทียนมณี

Umaporn Thathaisong*, Rungnapha Mankhong and Napatsorn Tianmanee

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University

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

Received: 15 October 2025 /Revised: 17 November 2025 /Accepted: 22 December 2025

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการยับยั้ง *Salmonella* Typhimurium ของน้ำมันหอมระเหยไธม์ (*Thymus vulgaris*) ในหลอดทดลองและบนใบสะระแหน่ โดยทำการคัดกรองฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นด้วยวิธี disc diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยไธม์บริสุทธิ์ (20 μ l/disc) สามารถยับยั้ง *S. Typhimurium* มีขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 22.17 มิลลิเมตร และหาความเข้มข้นขั้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นขั้นต่ำที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อ (MBC) ด้วยวิธี broth macrodilution พบว่าค่า MIC และ MBC มีค่าเท่ากัน คือ 0.2% เมื่อนำไปทดสอบหาระยะเวลาในการทำลายเชื้อ (Time kill assay) พบว่าน้ำมันหอมระเหยไธม์ ความเข้มข้น 0.2% (1xMIC) สามารถทำลายเชื้อเริ่มต้น (5.36 log CFU/ml) ลงได้ > 3 log ภายในระยะเวลา 5 นาที นอกจากนี้ยังได้ทดสอบประสิทธิภาพในการลดจำนวน *S. Typhimurium* ที่ใส่ลงบนใบสะระแหน่ ด้วยสารละลายน้ำมันหอมระเหยไธม์ความเข้มข้น 1xMIC (0.2%), 2xMIC (0.4%) โดยมีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นชุดควบคุม พบว่า น้ำมันหอมระเหยไธม์ที่ความเข้มข้น 0.4% (2xMIC) มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ที่ใส่ลงบนใบสะระแหน่ได้แตกต่างจากน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (ชุดควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยไธม์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. Typhimurium* ทั้งในหลอดทดลองและบนใบสะระแหน่ ซึ่งอาจสามารถนำมาใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้เป็นสารล้างทำความสะอาดผักสดได้

คำสำคัญ: น้ำมันหอมระเหยไธม์ ใบสะระแหน่ *S. Typhimurium* การยับยั้ง



Abstract

This study aimed to examine the inhibition of *Salmonella* Typhimurium by thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil *in vitro* and on kitchen mint leaves. The screening antibacterial activity was performed using disc diffusion method. The result showed that the pure essential oil (20 μ l/disc) was able to inhibit the growth of *S. Typhimurium* with the inhibition zone of 22.17 mm. By the broth macrodilution method, the Minimal inhibitory concentration (MIC) and Minimal bactericidal concentration (MBC) values were both 0.2% . A time kill assay was performed to evaluate the bactericidal activity and found that the essential oil at concentration of 0.2% (1xMIC) effectively decreased >3 log of the initial bacterial population (5.36 log CFU/ml) within 5 min. In addition, kitchen mint leaves were artificially inoculated with *S. Typhimurium*, the inoculated kitchen mint leaves were then washed in the essential oil solution at 1xMIC (0.2%) and 2xMIC (0.4%) concentrations for 5 min. Sterile distilled water was used as the control. The essential oil at 2xMIC concentration significantly reduced ($p < 0.05$) the population of *S. Typhimurium* on kitchen mint leaves when compared with that of washing with sterile distilled water. These data indicated that *T. vulgaris* essential oil has the efficiency to inhibit *S. Typhimurium* both *in vitro* and on kitchen mint leaves which can be applied as an alternative sanitizer for fresh vegetable.

Keywords: Thyme Essential Oil, Kitchen Mint Leaves, *S. Typhimurium*, Inhibition

บทนำ

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา ผักสดได้รับความนิยมมากขึ้นจากผู้คนที่ให้ความสนใจดูแลสุขภาพ เนื่องจากผักสดมีคุณค่าทางโภชนาการสูง สำหรับในประเทศไทยผักสดเป็นหนึ่งในเครื่องเคียงยอดนิยมของเมนูอาหารไทย เพราะหาซื้อได้ง่าย จัดเตรียมสะดวกและช่วยเสริมกลิ่นรสของอาหาร โดยผักสดที่นิยมนำมารับประทานเป็นเครื่องเคียงมักเป็นผักท้องถิ่น เช่น โหระพา สะระแหน่ กะหล่ำปลี มะเขือ ถั่วฝักยาว เป็นต้น อย่างไรก็ตามผักสด

อาจมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้ ตั้งแต่กระบวนการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การขนส่ง และกระบวนการเตรียมอาหาร เช่น การล้าง การตัด และการหั่น¹ ด้วยเหตุนี้การบริโภคผักสดอาจก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์ได้ ซึ่งเมื่อไม่นานมานี้มีรายงานการระบาดของโรคที่เกิดจากอาหารหลายครั้งมีความเกี่ยวข้องกับการบริโภคผักสด โดยแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นสาเหตุหลักของโรคระบาด ได้แก่ *Listeria monocytogenes*,



Escherichia coli, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp.²⁻⁵ นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผักสดในประเทศไทยพบว่าผักสดร้อยละ 7.1 (29/405 ตัวอย่าง) มี *Salmonella* spp. ปนเปื้อน⁶ อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีรายงานความชุกของ *Salmonella* spp. บนใบสาระแน แต่มีการตรวจวิเคราะห์ในผักจากประเทศอินเดีย สาธารณรัฐเซเนกัล และปากีสถานพบว่าใบสาระแนมีการปนเปื้อน *Salmonella* spp. ร้อยละ 2.3⁷, 34.2⁸ และ 70⁹ ตามลำดับ

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) เป็นแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร หรือโรคอาหารเป็นพิษ ที่เรียกว่า Salmonellosis ซึ่งเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนเข้าไป ผู้ติดเชื้อจะมีอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน และอุจจาระร่วง ซึ่งมักจะหายเองได้ แต่ในกลุ่มผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เด็กเล็ก และผู้สูงอายุ อาจทำให้เสียชีวิตได้ ซึ่งมีรายงานว่ามีคนติดเชื้อ *S. Typhimurium* ในแต่ละปีประมาณ 150 ล้านคน และเสียชีวิตประมาณ 60,000 คนจากทั่วโลก¹⁰ อีกทั้งเมื่อเร็ว ๆ นี้พบการระบาดของ การติดเชื้อ *Salmonella* spp. ในสหรัฐอเมริกา ซึ่งเกี่ยวข้องกับการบริโภคผักสด ทำให้มีคนเป็นโรคอาหารเป็นพิษจำนวน 511 คน¹¹ ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาและพัฒนาวิธีการล้างเพื่อลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในผักสด

การล้างผักเป็นวิธีทั่วไปที่นิยมใช้เพื่อลดสิ่งตกค้างบนผัก เช่น สารเคมีตกค้างจากปุ๋ยหรือยาฆ่าแมลง, ไซยาไนด์, รวมไปถึงจุลินทรีย์ต่างๆ โดยการล้างผักในระดับอุตสาหกรรมอาหารมักใช้

น้ำยาล้างผักที่มีส่วนประกอบของ Sodium lauryl หรือ Sodium bicarbonate และ Chlorine compound ส่วนในระดับครัวเรือนมักใช้สิ่งที่หาได้ทั่วไปในการล้าง เช่น ผงฟู, น้ำเกลือ, น้ำส้มสายชูและต่างทับทิม เป็นต้น¹² อย่างไรก็ตามการล้างผักด้วยสารเคมีอาจมีสารตกค้างซึ่งเป็นสารก่อโรคมะเร็ง ทำให้เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค¹³ จึงมีนักวิจัยบางกลุ่มได้ทำการค้นหาทางเลือกใหม่ ๆ ในการล้างผักโดยเฉพาะน้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติ นำมาใช้เป็นสารสำหรับล้างทำความสะอาดเพื่อลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผักสด โดยมีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าน้ำมันหอมระเหยอบเชยสามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7 และ *S. Typhimurium* บนใบผักโขมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ¹⁴ ส่วนการล้างด้วยสารผสมของสารสกัดจากลูกยอและน้ำมันหอมระเหยออริกาโน พบว่า มีประสิทธิภาพมากกว่าการล้างด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (Sodium hypochlorite) โดยสามารถลดจำนวน *Listeria monocytogenes* บนผักกาดโรเมนได้ 1.44 log CFU/กรัม¹⁵

ไธม์ (Thyme หรือ *Thymus vulgaris*) เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในยุโรปตอนใต้ ตั้งแต่สเปนไปจนถึงอิตาลี โดยสารพฤกษเคมี (Phytochemicals) ที่เป็นองค์ประกอบหลักของไธม์จะแตกต่างกันไปตามสภาพอากาศและพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ มีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยไธม์มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* และ *Enterococcus faecalis*¹⁶ แต่ยังไม่มียานการนำน้ำมันหอมระเหยไธม์



ไปประยุกต์ใช้เป็นสารล้างทำความสะอาดในการลดจำนวน *S. Typhimurium* บนใบสาระแน งานวิจัยนี้สนใจศึกษาใบสาระแน เนื่องจากใบสดนิยมนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารประเภทยาและลาบ เพื่อเพิ่มรสชาติอาหาร ซึ่งอาหารประเภทนี้คนไทยนิยมรับประทานมาก อีกทั้งสาระแนเป็นพืชล้มลุกทำให้ใบและลำต้นมีโอกาสนำไปเป็นจุลินทรีย์จากดินที่ใช้เพาะปลูกสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยโรสแมรี่ในการยับยั้ง *S. Typhimurium* ในหลอดทดลอง (*in vitro*) และลดจำนวน *S. Typhimurium* บนใบสาระแน เพื่อเป็นแนวทางในการนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารล้างทำความสะอาดผักสดในอนาคต

วิธีการวิจัย

1. ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของน้ำมันหอมระเหยโรสแมรี่ต่อ *S. Typhimurium* ด้วยวิธี Disc diffusion¹⁷

ถ่ายเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ลงในอาหาร Muller-Hinton broth (MHB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง แล้วปรับปริมาณเชื้อด้วย 0.85% NaCl ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No.0.5 ซึ่งมีจำนวนเชื้อ $\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/มิลลิลิตร จากนั้นนำไม้ปั่นสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเซลล์แขวนลอยและป้ายลงบนผิวหน้าอาหาร Muller-Hinton agar (MHA) ให้ทั่ว

น้ำมันหอมระเหยโรสแมรี่ (*Thymus vulgaris*) ที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า ชื้อมาจากร้านน้ำมันหอมระเหย BOTANICESSENCE กรุงเทพมหานคร บรรจุอยู่ใน

ขวดสีชา สกัดด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) มีลักษณะเป็นของเหลวใส และมีกลิ่นหอม ทำการหยดน้ำมันหอมระเหยโรสแมรี่บริสุทธิ์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนดิสก์ปราศจากเชื้อ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที ใช้ปากคีบปราศจากเชื้อหยิบแผ่นดิสก์ที่บรรจุน้ำมันหอมระเหยโรสแมรี่ และดิสก์ยาเจนตามัยซิน (Gentamicin) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ดิสก์ (Positive control) วางลงบนผิวหน้าอาหาร MHA นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการอ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (Inhibition zone) และบันทึกผลในหน่วยมิลลิเมตร (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

2. หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลาย (MBC) ของน้ำมันหอมระเหยโรสแมรี่ต่อ *S. Typhimurium* ด้วยวิธี Broth macrodilution¹⁸

ถ่ายเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ลงในอาหาร MHB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ทำการปรับปริมาณเชื้อด้วย 0.85% NaCl ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No.0.5 (1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร) จากนั้นถ่ายเซลล์แขวนลอย ปริมาตร 33.3 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร MHB ปริมาตร 9.97 มิลลิลิตร จะได้ปริมาณเชื้อ $\sim 5 \times 10^5$ CFU/มิลลิลิตร (ใช้ภายใน 15 นาที)

เจือจางน้ำมันหอมระเหยโรสแมรี่บริสุทธิ์ (100%) ในอาหาร MHB ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 80%, 60%, 40%, 20%, 10% และ 5% จากนั้นเติมน้ำมันหอมระเหยโรสแมรี่ และน้ำมัน



หอมระเหยที่เจือจางไว้ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 1-7 ตามลำดับ (2 ข้าง) แล้วเติมเซลล์แขวนลอย ปริมาตร 995 ไมโครลิตร ลงในหลอด ทดลองทุกหลอด จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารทดสอบเท่ากับ 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.05% และ 0.025% ตามลำดับ [ชุดควบคุม ประกอบด้วยชุดควบคุมผลบวก (Positive control) คืออาหาร MHB และเซลล์แขวนลอยของ *S. Typhimurium* และชุดควบคุมผลลบ (Negative control) คืออาหาร MHB เพียงอย่างเดียว] และนำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสี Resazurin¹⁹ (20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในทุกหลอด (ความเข้มข้นสุดท้ายของ Resazurin เท่ากับ 0.04 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง อ่านค่า MIC โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของ resazurin ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยตาเปล่า ถ้าสีเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูแสดงว่ามีการเจริญของเชื้อ ซึ่งค่า MIC คือ ความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ (อาหารเลี้ยงเชื้อสีน้ำเงิน) (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

ถ่ายสารละลายจากหลอดทดสอบที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีน้ำเงิน จากการหาค่า MIC ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร Plate count agar (PCA) หลอดละ 3 หยด นำจานไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านค่า MBC โดยสังเกตจากการเจริญบนอาหาร ซึ่งค่า MBC คือ ความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารที่ไม่พบการเจริญของเชื้อทดสอบ (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

3. หาเวลาในการทำลายเชื้อ (Time kill assay) ของน้ำมันหอมระเหยโธม²⁰

เตรียมเซลล์แขวนลอยของ *S. Typhimurium* โดยถ่ายโคโลนีลงใน 0.1% peptone water และทำการปรับปริมาณเชื้อให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No.0.5 (1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร) แล้วถ่ายเซลล์แขวนลอย ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน 0.1% peptone water ปริมาตร 9.9 มิลลิลิตร จะได้เซลล์แขวนลอยความเข้มข้น $\sim 1.5 \times 10^6$ CFU/มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำมันหอมระเหยโธมบริสุทธิ์ลงไปให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับค่า 1xMIC ส่วนชุดควบคุม ทำการเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นำหลอดทดลองไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 5, 10, 15, และ 20 นาที ของการบ่ม โดยถ่ายสารละลายตัวอย่างของแต่ละช่วงเวลามา 0.1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางแบบสิบเท่า (10-fold dilution) ใน 0.1% peptone water ให้ได้ความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-3} แล้วทำการ spread plate บนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) (2 ข้าง) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี และคำนวณหาปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต โดยรายงานผลในหน่วย log CFU/มิลลิลิตร (ทำการทดลอง 2 ครั้ง)

4. เตรียมใบสาระแนและการใส่เชื้อลงบนใบสาระแน²⁰

นำใบสาระแนสด ซึ่งซื้อมาจากตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี ประมาณ 40 กรัม มาล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำใบสาระแนวางในภาชนะปราศจากเชื้อที่รองด้วยผ้าขาวบางปราศจากเชื้อ



เพื่อทำการสะเด็ดน้ำ นำไปฉายรังสียูวี (ความยาวคลื่นประมาณ 254 นาโนเมตร) ทั้งด้านหน้าและด้านหลังใบ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเป็นการลดจำนวนจุลินทรีย์ประจำถิ่นของใบสะระแหน่

เตรียมเซลล์แขวนลอยของ *S. Typhimurium* โดยถ่ายโคโลนีลงใน 0.1% peptone water แล้วทำการปรับปริมาณเชื้อให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No.0.5 (1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร) จากนั้นถ่ายเซลล์แขวนลอยที่เตรียมไว้ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมนลงใน 0.1% peptone water ปริมาตร 198 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้จำนวนเชื้อ $\sim 1.5 \times 10^6$ CFU/มิลลิลิตร จากนั้นแช่ใบสะระแหน่ในเซลล์แขวนลอยของ *S. Typhimurium* ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำใบสะระแหน่ขึ้นมาวางบนถาดปราศจากเชื้อ และรอให้แห้งภายในตู้ชีวนิรภัย เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเกาะบนใบสะระแหน่ จากนั้นใส่ใบสะระแหน่ จำนวน 5 กรัม ลงในถุงปราศจากเชื้อ (2 ชั้น) เพื่อนำไปนับจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ที่เกาะบนใบสะระแหน่ก่อนการล้าง ส่วนใบสะระแหน่ที่เหลือนำไปล้างด้วยสารละลายทดสอบ

5. ล้างใบสะระแหน่ด้วยสารทดสอบ²¹

เตรียมสารละลายทดสอบ ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยโธม์ความเข้มข้นเท่ากับ $1 \times \text{MIC}$ (0.2% v/v) และความเข้มข้นเท่ากับ $2 \times \text{MIC}$ (0.4% v/v) ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Hot plate stirrer ส่วนชุดควบคุม (Control) คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 200 มิลลิลิตร

นำใบสะระแหน่ที่ใส่หัวเชื้อแล้วปริมาณ 10 กรัม มาล้างด้วยการแช่ลงในสารละลายสำหรับล้างผัก

(ใช้อัตราส่วนของผักต่อสารละลายที่ใช้ล้าง 1:20 w/v) เป็นเวลา 5 นาที (จากการหาค่า Time kill assay) แล้วทดสอบทั้ง จากนั้นนำไปสะระแหน่ จำนวน 5 กรัม จากแต่ละชุดการทดลอง ใส่ลงในถุงปราศจากเชื้อ (2 ชั้น) เพื่อไปนับจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ที่รอดชีวิตบนใบสะระแหน่หลังการล้าง

6. ตรวจนับจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ที่รอดชีวิตบนใบสะระแหน่²⁰

เติม 0.1% peptone water ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ลงในถุงปราศจากเชื้อที่มีผักอยู่ 5 กรัม จากนั้นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Stomacher จะได้ความเจือจาง 10^{-1} และทำการเจือจางโดยใช้วิธี 10-fold dilution ด้วย 0.1% peptone water ให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม แล้วถ่ายสารละลายแต่ละความเจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มา spread plate ลงบนอาหาร Brilliant Green Agar (BGA) (2 ชั้น) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีเฉพาะของเชื้อ *Salmonella* spp. ซึ่งโคโลนีสีชมพู และสีของอาหารรอบโคโลนีเป็นสีแดงหรือสีชมพู และคำนวณหาปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต โดยรายงานผลในหน่วย log CFU/กรัม และมีการสุ่มโคโลนีเฉพาะบนอาหาร BGA ไปทดสอบยืนยันว่าเป็น *Salmonella* spp. ด้วยการทดสอบชีวเคมี ดังนี้ TSI agar, LIA, Urease test และ Motility (*Salmonella* spp. ให้ผลการทดสอบดังนี้ TSI agar ให้ผล K/A, H_2S^+ , Gas+, Lysine decarboxylase ให้ผลลบ, Lysine deaminase ให้ผลลบ, Urease test ให้ผลลบ, Motility test ให้ผลลบ)



7. วิเคราะห์ทางสถิติ

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยไธม์ในการลดจำนวน *S. Typhimurium* ที่ใส่ลงบนใบสะระแหน่ ได้ทำการทดลอง 2 ครั้ง ครั้งละ 2 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab 17 Statistical Software ซึ่งใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Tukey's studentized range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัย

1. ประสิทธิภาพยับยั้ง *S. Typhimurium* ในหลอดทดลอง (*in vitro*)

น้ำมันหอมระเหยไธม์บริสุทธิ์ (100%) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร/ดิสก์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *S. Typhimurium* โดยมีขนาดโซนยับยั้ง เท่ากับ 22.17 ± 0.76 มิลลิเมตร ส่วนดิสก์ยาเจนตามัยซิน (10 ไมโครกรัม/ดิสก์) ซึ่งเป็นชุดควบคุมผลบวก (Positive control) มีขนาดโซนยับยั้ง เท่ากับ 19.17 ± 0.29 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังพบว่า ค่า MIC และค่า MBC ของน้ำมันหอมระเหยไธม์

ต่อ *S. Typhimurium* มีค่าเท่ากัน คือ 0.2% ดังแสดงใน Table 1. และ Figure 1.-3.

เมื่อทำการหาเวลาที่สั้นที่สุดของน้ำมันหอมระเหยไธม์ที่ความเข้มข้น 1xMIC ในการทำลายเชื้อ (Time kill assay) *S. Typhimurium* พบว่าจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่เวลา 0 นาที ในสภาวะที่มีน้ำมันหอมระเหยไธม์ ความเข้มข้น 0.2% (1xMIC) และในชุดควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) เท่ากับ 5.36 ± 0.19 และ 5.37 ± 0.37 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนที่เวลา 5 นาทีเป็นต้นไป ในสภาวะที่มีน้ำมันหอมระเหยไธม์ พบว่าจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ลดลงต่ำกว่าระดับที่สามารถตรวจนับได้ของวิธีการ spread plate หรือ limit detection of spread plate method (< 2.00 log CFU/มิลลิลิตร) ดังนั้น จะเห็นได้ว่าเวลา 5 นาที เป็นเวลาที่สั้นที่สุดของน้ำมันหอมระเหยไธม์ที่ความเข้มข้น 0.2% ที่สามารถทำลายเชื้อเริ่มต้นให้ลดลงได้ >3 log reduction ($>99.99\%$) ส่วนจำนวนเชื้อในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อซึ่งเป็นชุดควบคุมที่เวลา 0, 5, 10, 15 และ 20 นาที พบว่ามีจำนวนใกล้เคียงกันทุกช่วงเวลา ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) โดยมีจำนวนของเชื้ออยู่ในช่วง 5.21 - 5.37 log CFU/มิลลิลิตร ดังแสดงใน Table 2. และ Figure 4.

Table 1 Diameter of Inhibition zone, MIC and MBC values of Thyme essential oil against *S. Typhimurium*

Test bacterium	Inhibition zone		MIC value	MBC value
	Thyme EO (20 μ l/disc)	Gentamicin (10 μ g/disc)		
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	22.17 ± 0.76 mm	19.17 ± 0.29	0.2%	0.2%

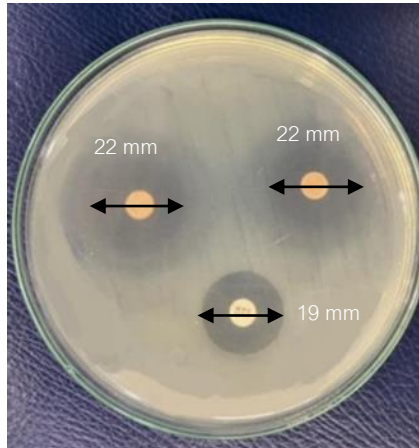


Figure 1 Inhibition zone obtained by disc diffusion method for Thyme essential oil and gentamicin against *S. Typhimurium*

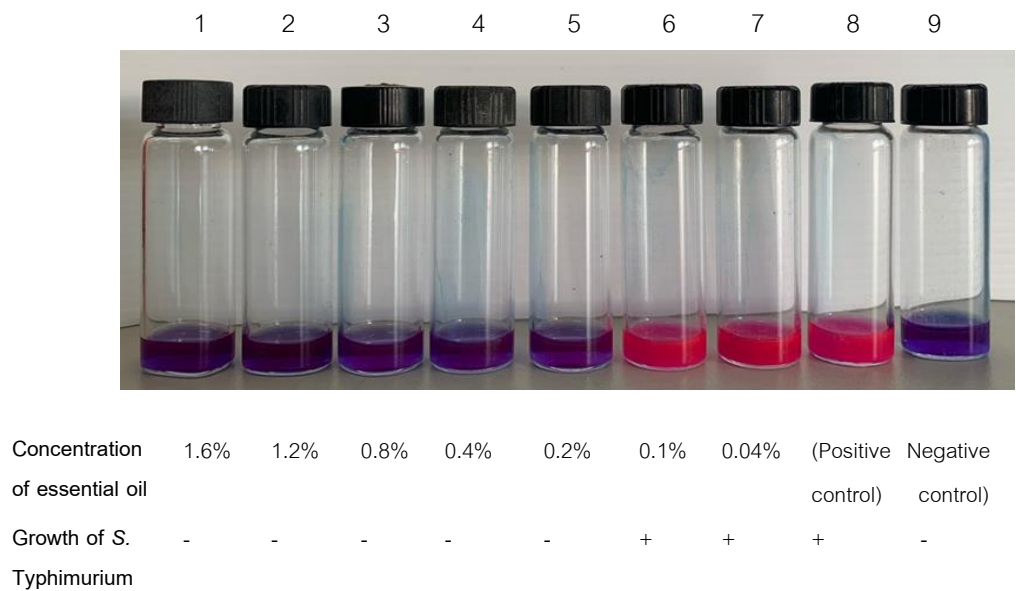


Figure 2 Broth macrodilution for determination of MIC value from Thyme essential oil (MIC = 0.2%)

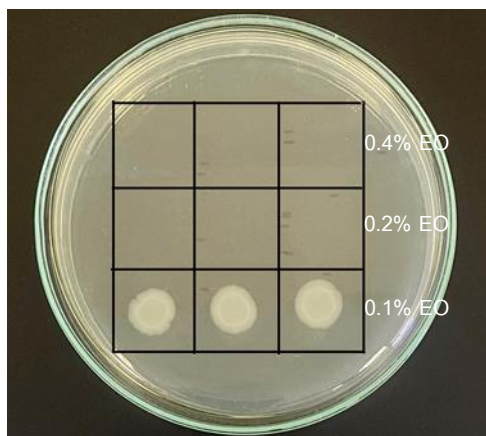


Figure 3 Growth of *S. Typhimurium* on MHA plate for MBC test of Thyme essential oil (MBC = 0.2%)

Table 2 Average of *S. Typhimurium* survival population (log CFU/ml $\pm$ SD) after treatment with Thyme essential oil at different time

Incubation Time (min)	A number of survival population (log CFU/ml $\pm$ SD)	
	Thyme essential oil (0.2%)	Distilled water (Control)
0	5.36 ± 0.19^A	5.37 ± 0.37^A
5	$< 2.00 \pm 0.00^{*B}$	5.21 ± 0.33^A
10	$< 2.00 \pm 0.00^{*B}$	5.27 ± 0.37^A
15	$< 2.00 \pm 0.00^{*B}$	5.37 ± 0.22^A
20	$< 2.00 \pm 0.00^{*B}$	5.34 ± 0.32^A

* $< 2.00 \pm 0.00$ CFU/ml is limit detection of spread plate method

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

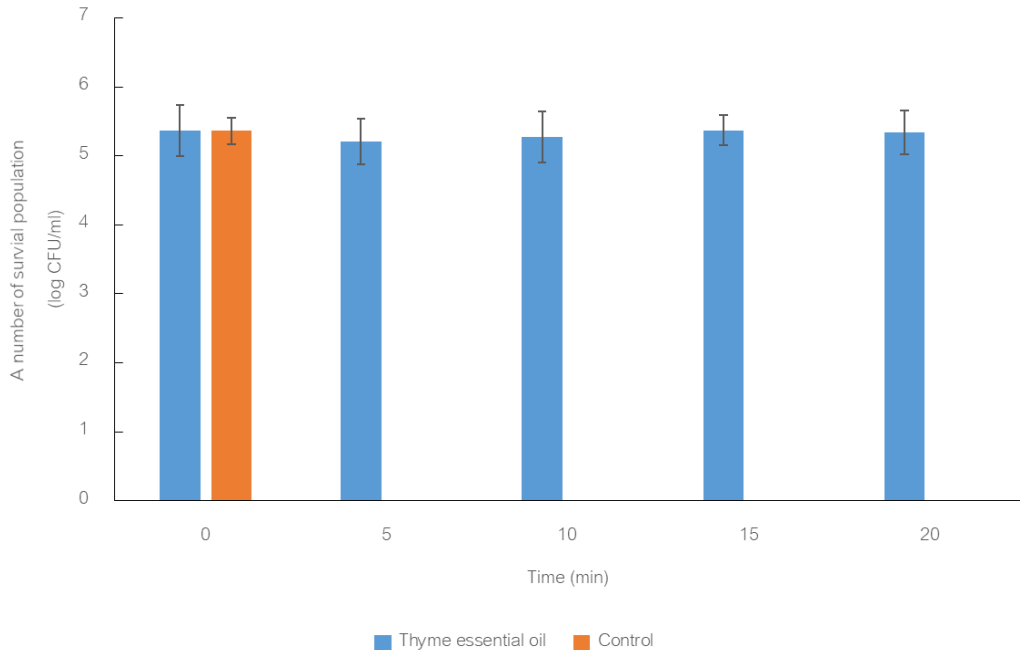


Figure 4. Time-kill curve analysis for evaluation of antibacterial activities of Thyme essential oil against *S. Typhimurium*

2. ประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ที่ใส่ลงบนใบสาระแน

ก่อนการทดสอบได้นำใบสาระแนมาล้างทำความสะอาด เชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นด้วยการฉายรังสียูวี จากนั้น นำใบสาระแนไปแช่ในเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *S. Typhimurium* เพื่อให้เชื้อปนเปื้อนบนใบสาระแน แล้วนำไปตรวจนับจำนวนเชื้อที่เกาะบนใบสาระแน พบว่ามีจำนวนเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 4.17 ± 0.98 log CFU/กรัม (Table 3.) จากนั้นนำใบสาระแน ที่ใส่หัวเชื้อไปล้างด้วยการแช่ในสารละลายทดสอบ เป็นเวลาจากการหาค่า Time kill assay ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยโรสแมรี่ที่ความเข้มข้น 1xMIC (0.2%), 2xMIC (0.4%) และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (ชุดควบคุม) โดยแช่เป็นเวลา 5 นาที พบว่าจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตบนใบสาระแน เท่ากับ 3.48 ± 0.10 , 2.69 ± 0.13

และ 4.79 ± 0.10 log CFU/กรัม ตามลำดับ ซึ่งลักษณะ โคโลนีเฉพาะของ *S. Typhimurium* ที่ตรวจพบ บนอาหาร BGA แสดงดัง Figure 4.

เมื่อวิเคราะห์อัตราการลดลงของเชื้อ *S. Typhimurium* บนใบสาระแนก่อนล้างและหลังล้าง ด้วยสารทดสอบ พบว่าการล้างด้วยน้ำมันหอมระเหยโรสแมรี่ความเข้มข้น 1xMIC (0.2%) และ 2xMIC (0.4%) สามารถลดจำนวนเชื้อบนใบสาระแน ได้ 16.5% และ 35.5% ตามลำดับเมื่อเทียบกับจำนวนเชื้อบนใบสาระแนก่อนการล้าง จะเห็นได้ว่าการล้างด้วยน้ำมันหอมระเหยโรสแมรี่ความเข้มข้น 2xMIC (0.4%) มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* บนใบสาระแนสูงกว่า 1xMIC (0.2%)

ข้อมูลใน Table 3. ยังพบว่าจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตบนใบสะระแหน่หลังล้างด้วยน้ำมันหอมระเหยไธม์ความเข้มข้น 2xMIC (0.4%) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับการล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (ชุดควบคุม) ในขณะที่

จำนวนเชื้อที่รอดชีวิตบนใบสะระแหน่หลังล้างด้วยน้ำมันหอมระเหยไธม์ความเข้มข้น 1xMIC (0.2%) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับการล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (ชุดควบคุม)

Table 3 Average of *S. Typhimurium* survival population on kitchen mint leaves (log CFU/g $\pm$ SD)

Treatments	Average of survival population (log CFU/g $\pm$ SD)
Before washing	4.17 $\pm$ 0.98 ^{AB}
Washing with distilled water for 5 min	4.79 $\pm$ 0.10 ^A
Washing with Thyme essential oil at 1xMIC (0.2%) for 5 min	3.48 $\pm$ 0.10 ^{AB}
Washing with Thyme essential oil at 2xMIC (0.4%) for 5 min	2.69 $\pm$ 0.13 ^B

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

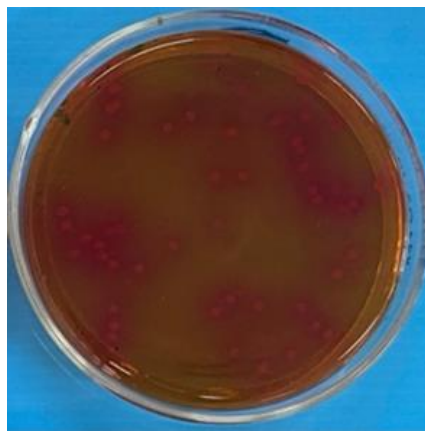


Figure 4 Colony morphology of surviving *S. Typhimurium* on kitchen mint leaves after washing with treatment solution on BGA. (pink, or opaque-white colonies, often surrounded by a pink or red zone)



อภิปรายผล

ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่า น้ำมันหอมระเหยโธม์สามารถยับยั้ง *S. Typhimurium* จากการทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*) ได้¹⁶ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยโธม์สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอีกหลายชนิด รวมทั้งยีสต์และราได้ เช่น *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Candida albicans* และ *Aspergillus flavus*^{16,22} จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยโธม์มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด

ผลการศึกษานี้พบว่าค่า MIC และค่า MBC ของน้ำมันหอมระเหยโธม์ต่อ *S. Typhimurium* มีค่าเท่ากันคือ 0.2% แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยโธม์มีกลไกการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. Typhimurium* แบบทำลาย (bactericidal activity) เนื่องจากมีอัตราส่วนของค่า MBC/MIC (0.2% / 0.2%) เท่ากับ 1 ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ได้อธิบายไว้ว่าหากสารทดสอบมีอัตราส่วนของค่า MBC/MIC ต่อเชื้อทดสอบ ≤ 4 แสดงว่าสารทดสอบออกฤทธิ์แบบทำลายเชื้อ (bactericidal activity) และหาก > 4 แสดงว่าสารทดสอบออกฤทธิ์แบบยับยั้ง (bacteriostatic activity)²³

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยโธม์ต่อ *S. Typhimurium* ของการศึกษานี้กับงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยโธม์ของการศึกษานี้ (ค่า MIC เท่ากับ 0.2%) ต่ำกว่าค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยโธม์ในรายงานของ Penalver et al.²⁴ (ค่า MIC เท่ากับ 2%) และ Ed-Dra et al.²⁵ (ค่า MIC เท่ากับ 0.5%) แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยโธม์ของการศึกษานี้มีประสิทธิภาพ

ยับยั้ง *S. Typhimurium* สูงกว่า ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากแหล่งที่มาของพืชที่ใช้เตรียมน้ำมันหอมระเหยต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อชนิดและปริมาณของสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมี ทำให้ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยโธม์แตกต่างกันออกไป²⁶

จากการพิจารณาเปรียบเทียบค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยโธม์ในการยับยั้ง *S. Typhimurium* ของการศึกษานี้กับค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชชนิดอื่น ๆ พบว่าน้ำมันหอมระเหยโธม์ในการศึกษานี้ (ค่า MIC เท่ากับ 0.2%) มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. Typhimurium* สูงกว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*) (ค่า MIC เท่ากับ 10%) แต่อย่างไรก็ตามน้ำมันหอมระเหยโธม์มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. Typhimurium* ต่ำกว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลู (ค่า MIC เท่ากับ 0.15%)²⁷ แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่างชนิดกันมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ต่างกัน เนื่องมาจากพืชแต่ละชนิดมีชนิดและปริมาณของสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน

สาเหตุที่น้ำมันหอมระเหยโธม์สามารถยับยั้ง *S. Typhimurium* ได้ เนื่องมาจากน้ำมันหอมระเหยโธม์มีสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าว ซึ่งในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโธม์ แต่อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาก่อนหน้านี้ได้รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยโธม์มีองค์ประกอบทางพฤกษเคมีที่สำคัญ ได้แก่ thymol, carvacrol, p-cymene, β -pinene, γ -terpinene, linalool, terpinen-4 -ol และ γ -terpinene^{16,28} โดย thymol, carvacrol และ γ -terpinene เป็นสารที่พบปริมาณมากในน้ำมัน



หอมระเหยโธม์ ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์คือ จะทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ จึงส่งผลให้เกิดการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมากเกินไป ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียศักยภาพของ proton pumps และการสร้าง ATP ลดลง จึงทำให้เซลล์ถูกทำลายในที่สุด²⁹⁻³² นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสาร Terpinen-4-ol ซึ่งพบในน้ำมันหอมระเหยจากพืชหลายชนิด มีกลไกการออกฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรียโดยจะไปทำลายโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย ส่งผลให้สารภายในเซลล์รั่วไหลและนำไปสู่การตายของเซลล์แบคทีเรีย³³

จากการพิจารณาประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *S. Typhimurium* ในขั้นตอนการทดสอบหาระยะเวลาในการทำลายเชื้อ (Time kill assay) ในหลอดทดลองที่มี 0.1% peptone เป็นบัฟเฟอร์ พบว่าน้ำมันหอมระเหยโธม์ที่ความเข้มข้น 0.2% สามารถทำลายเชื้อ *S. Typhimurium* เริ่มต้น (5.35 ± 0.19 log CFU/มิลลิลิตร) ได้ >3 log ภายในระยะเวลา 5 นาที ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าการทดสอบบนใบสาระแนในขั้นตอนการล้าง ซึ่งสามารถลดจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* เริ่มต้น 4.17 ± 0.98 log CFU/กรัม ลงได้เพียง 0.73 ± 0.14 log CFU/กรัม เมื่อใช้ระดับความเข้มข้นของสารละลายทดสอบ และเวลาเท่ากัน ที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุมาจากพื้นผิวของใบสาระแนซึ่งมีความขรุขระ ไม่เรียบ มีผลทำให้น้ำมันหอมระเหยโธม์ไม่สามารถเข้าถึงพื้นผิวผักที่มีเชื้อเกาะอยู่ได้ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ซึ่งพบว่ากรดมาลิกสามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* และ *L. monocytogenes* ที่ใส่ลงบน

เห็ดนางรมหลวงและผลเมลอนซึ่งมีผิวสัมผัสหยาบและขรุขระ ได้ต่ำกว่าปาปริก้าหรือแครอทที่มีพื้นผิวเรียบ³⁴ แสดงให้เห็นว่าพื้นผิวของผัก มีผลต่อประสิทธิภาพของสารทดสอบในการลดจำนวนเชื้อที่ใส่ลงบนผัก ผลการศึกษานี้ยังได้สังเกตสีของใบสาระแนด้วยตาเปล่า (ไม่ได้แสดงข้อมูล) พบว่าการล้างใบสาระแนด้วยน้ำมันหอมระเหยโธม์ไม่มีผลต่อสีและลักษณะภายนอกของใบสาระแน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Gutierrez et al.³⁵ ซึ่งพบว่าผักกาดหอมและแครอทที่ผ่านการล้างด้วยน้ำมันหอมระเหยโธม์ และน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่นได้แก่ โหระพา, สะระแน, มาร์จอรัม และออริกาโน ไม่ส่งผลต่อสี ลักษณะภายนอกและคุณภาพของผัก

การศึกษานี้ในขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ที่ใส่ลงบนใบสาระแนด้วยน้ำมันหอมระเหยโธม์ ผู้วิจัยได้นำสารละลายที่ใช้ล้างจากการล้างใบสาระแนที่ใส่เชื้อแล้วมาทำการตรวจหาเชื้อที่มีชีวิตเพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยโธม์ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) พบว่าสารละลายทดสอบที่มีน้ำมันหอมระเหยโธม์ความเข้มข้น 1xMIC (0.2%) และ 2xMIC (0.4%) ตรวจไม่พบเชื้อ *S. Typhimurium* ที่รอดชีวิตในสารละลาย ส่วนสารละลายที่เป็นชุดควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) ตรวจพบเชื้อ *S. Typhimurium* รอดชีวิต แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยโธม์มีฤทธิ์ในการทำลาย *S. Typhimurium* ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่า MIC และ MBC ส่วนการล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจะทำให้เชื้อบางส่วนหลุดออกจากใบผักมาอยู่ในสารละลายโดยที่เชื้อยังมีชีวิตอยู่



แม้ว่าการศึกษานี้จะไม่ได้ทำการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation) ของใบสาระแนที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายน้ำมันหอมระเหยโรคม์ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าสารทดสอบนี้มีกลิ่นแรง ซึ่งเป็นกลิ่นที่ทำให้รู้สึกสดชื่น จึงควรล้างใบสาระแนด้วยน้ำสะอาดก่อนนำไปบริโภค เพื่อไม่ให้มีผลต่อรสชาติและกลิ่นของใบสาระแน นอกจากนี้หากพิจารณาความคุ้มค่าของผลิตภัณฑ์ในแง่ของความคุ้มค่า จะพบว่า น้ำมันหอมระเหยมีต้นทุนสูงกว่าสารเคมีที่ใช้ล้างผักในครัวเรือน ผลิตภัณฑ์นี้อาจจะเหมาะสมกับกลุ่มผู้บริโภคที่ใส่ใจกับสุขภาพและสามารถจ่ายเงินสูงขึ้นเพื่อผลิตภัณฑ์ที่ดีต่อสุขภาพ อีกทั้งในการเลือกซื้อต้องพิจารณาคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพด้านจุลินทรีย์ โดยควรซื้อจากแหล่งจำหน่ายที่มีความน่าเชื่อถือ

ผลการศึกษารังนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยโรคม์มีประสิทธิภาพในการต้าน *S. Typhimurium* จากการทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*) และบนใบสาระแน นอกจากนี้ควรมีศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตเกี่ยวกับการใช้น้ำมันหอมระเหยโรคม์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่น ๆ เช่น *E. coli* และ *Listeria monocytogenes* ที่มักปนเปื้อนในผักและผลไม้สด ศึกษาระยะเวลาในการยืดอายุการเก็บรักษาและคุณภาพทางโภชนาการของผักหลังการล้างด้วยน้ำมันหอมระเหย รวมทั้งประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation) เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ล้างผักต่อไป

สรุปผลการวิจัย

น้ำมันหอมระเหยโรคม์บริสุทธิ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. Typhimurium* ในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยมีขนาดไซนยับยั้ง เท่ากับ 22.17 ± 0.76 มิลลิเมตร มีค่า MIC และค่า MBC เท่ากันคือ 0.2% และเวลาที่สั้นที่สุดของน้ำมันหอมระเหยโรคม์ (0.2%) ที่สามารถทำลายเชื้อเริ่มต้นให้ลดจำนวนลงได้ $>3 \log$ ($>99.99\%$) คือ 5 นาที การล้างใบสาระแนที่ใส่เชื้อ *S. Typhimurium* ($4.17 \pm 0.98 \log \text{CFU/กรัม}$) ด้วยการแช่น้ำมันหอมระเหยโรคม์ที่ความเข้มข้น 0.2% และ 0.4% และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (ชุดควบคุม) เป็นเวลา 5 นาที สามารถลดจำนวน *S. Typhimurium* บนใบสาระแนลงเหลือ เท่ากับ 3.48 ± 0.10 , 2.69 ± 0.13 และ $4.79 \pm 0.10 \log \text{CFU/กรัม}$ ตามลำดับ ซึ่งน้ำมันหอมระเหยโรคม์ที่ความเข้มข้น 0.4% มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ที่ใส่ลงบนใบสาระแนได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (ชุดควบคุม) จะเห็นได้ว่าน้ำมันหอมระเหยโรคม์มีประสิทธิภาพในการต้าน *S. Typhimurium* ทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และบนใบสาระแน ซึ่งอาจสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติ เพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ปนเปื้อนในผักและผลไม้สด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ทุนสนับสนุน



เอกสารอ้างอิง

1. Yemmireddy V, Adhikari A, Moreira J. Effect of ultraviolet light treatment on microbiological safety and quality of fresh produce: an overview. *Front Nutr* 2022;9:871243.
2. Bai Y, Li J, Huang M, Yan S, Li S, Xu J, et al. Prevalence and characterization of foodborne pathogens isolated from fresh-cut fruits and vegetables in Beijing, China. *Int J Food Microbiol* 2024;421:110804.
3. Kowalska B. Fresh vegetables and fruit as a source of *Salmonella* bacteria. *Ann Agr Env Med* 2023;30:9-14.
4. Zhang G, Chen Y, Hu L, Melka D, Wang H, Laasri A, et al. Survey of foodborne pathogens, aerobic plate counts, total coliform counts, and *Escherichia coli* counts in leafy greens, sprouts, and melons marketed in the United States. *J Food Prot* 2018;81:400-11.
5. Zhang H, Yamamoto E, Murphy J, Locas A. Microbiological safety of ready-to eat fresh-cut fruits and vegetables sold on the Canadian retail market. *Int J Food Microbiol* 2020;335:108855.
6. Srisamran J. Detection of indicator and pathogenic bacteria in raw vegetables and fruits sold in fresh markets and supermarkets, Bangkok, Thailand [Theses]. Bangkok: Chulalongkorn University; 2020.
7. Singh BR, Singh P, Agrawal S, Teotia U, Verma A, Sharma S, et al. Prevalence of multidrug resistant *Salmonella* in coriander, mint, carrot, and radish in Bareilly and Kanpur, Northern India. *Foodborne Pathogen Dis* 2007;4:233-40.
8. Sarré FB, Dièye Y, Seck AM, Fall C, Dieng M. High level of *Salmonella* contamination of leafy vegetables sold around the niayes zone of Senegal. *Horticulturae* 2023;9:97.
9. Saleem M, Huda N, Urooj S, Siddiqui M, Khan FZ, Raza Y, Mirani ZA. Transmission of multi-drug-resistant *Salmonella* from fresh vegetables: Implications for shop-to-kitchen contamination. *Microbiol Immunol Commun* 2024;3:1-20.
10. Plumb I, Fields P, Bruce B. Salmonellosis, Nontyphoidal. *CDC Yellow Book [Internet]. Health Information for International Travel: Oxford University Press; 2024 [cited 2023 October 10]. Available from: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/infections-diseases/salmonellosis-nontyphoidal>*
11. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Salmonella* outbreak



- linked to cucumbers - June 2024
[Internet]. 2024 [cited 2025 August 2].
Available from: <https://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks/africana-06-24/index.html>.
12. รัชดา อุษยีนยงค์, สุนิดา เมืองโคตร. การยับยั้งแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคที่ปนเปื้อนในผักกาดหอมด้วยสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย. วารสารการเกษตรราชภัฏ 2563;2:67-76.
 13. El-Tawil AM. Colorectal cancers and chlorinated water. World J Gastrointest Oncol 2016;8:402-9.
 14. Kang JH, Park JB, Song KB. Inhibitory activities of quaternary ammonium surfactants against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* inoculated on spinach leaves. LWT-Food Sci Technol 2019;102:284-90.
 15. Kang JH, Song KB. Combined washing effect of noni extract and oregano essential oil on the decontamination of *Listeria monocytogenes* on romaine lettuce. Int J Food Sci 2020;55:3515-23.
 16. Hammoudi Halat D, Krayem M, Khaled S, Younes S. A focused insight into thyme: Biological, chemical, and therapeutic properties of an indigenous mediterranean herb. Nutrients 2022;14:2104.
 17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Vol 43. 33th ed. CLSI supplement M100: Wayne, PA; USA. 2023. Available from: <https://clsi.org/shop/standards/m100/>
 18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Vol 32. 9th ed. CLSI document M07-A9: Wayne, PA; USA. 2012. Available from: <https://clsi.org/qse>
 19. Yuan W, Teo CHM, Yuk HG. Combined antibacterial activities of essential oil compounds against *Escherichia coli* O157:H7 and their application potential on fresh-cut lettuce. Food Control 2019; 96:112-8.
 20. Kang JH, Song KB. Inhibitory effect of plant essential oil nanoemulsions against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* Typhimurium on red mustard leaves. Innov Food Sci Emerg Technol 2018;45:447-54.
 21. Paudel SK, Bhargava K, Kotturi H. Antimicrobial activity of cinnamon oil nanoemulsion against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on melons. LWT-Food Sci Technol 2019;111:682-7.
 22. Schubert M, Spiegel H, Schillberg S, Nölke G. *Aspergillus*-specific antibodies-targets



- and applications. *Biotechnol Adv* 2018;36:1167-84.
23. Ishak A, Mazonakis N, Spernovasilis N, Akinosoglou K, Akinosoglou C. Bactericidal versus bacteriostatic antibacterials: clinical significance, differences and synergistic potential in clinical practice. *J Antimicrob Chemother* 2024;80:1-17.
24. Penalver P, Huerta B, Borge C, Astorga R, Romero R, Perea A. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *Apmis* 2005;113:1-6.
25. Ed-Dra A, Nalbone L, Filali FR, Trabelsi N, El Majdoub YO, Bouchrif B, et al. Comprehensive evaluation on the use of *Thymus vulgaris* essential oil as natural additive against different serotypes of *Salmonella enterica*. *Sustain* 2021;13:4594.
26. Rocha JBT, de Andrade JP, dos Santos L. Optimization of extraction parameters for phenolic compounds from *Commiphora gileadensis* leaves using ethanol-water mixtures. *Process* 2023;12:1567.
27. Ebani VV, Nardoni S, Bertelloni F, Tosi G, Massi P, Pistelli L, et al. *In vitro* antimicrobial activity of essential oils against *Salmonella enterica* serotypes Enteritidis and Typhimurium strains isolated from poultry. *Molecules* 2019;24:900.
28. Thosar N, Basak S, Bahadure RN, Rajurkar M. Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An *in vitro* study. *Eur J Dent* 2013;7:S071-7.
29. Sateriale D, Forgione G, De Cristofaro GA, Pagliuca C, Colicchio R, Salvatore P, et al. Antibacterial and antibiofilm efficacy of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil against foodborne illness pathogens, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium and *Bacillus cereus*. *Antibiotics* 2023;12:485.
30. Khwaza V, Aderibigbe BA. Antibacterial activity of selected essential oil components and their derivatives: A Review. *Antibiotics* 2025;14:68.
31. Liu T, Kang J, Liu L. Thymol as a critical component of *Thymus vulgaris* L. essential oil combats *Pseudomonas aeruginosa* by intercalating DNA and inactivating biofilm. *LWT-Food Sci Technol* 2021;136:110354.
32. Kachur K, Suntres Z. The Antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2020;60:3042-53.
33. Cuaron JA, Dulal S, Song Y, Singh AK, Montelongo CE, Yu W, et al. Tea tree oil-induced transcriptional alterations in



- Staphylococcus aureus*. *Phytother Res* 2013;27:390-6.
34. Kang JW, Kang DH. Antimicrobial efficacy of vacuum impregnation washing with malic acid applied to whole paprika, carrots, king oyster mushrooms and muskmelons. *Food Control* 2017;82:126-35.
35. Gutierrez J, Rodriguez G, Barry-Ryan C, Bourke P. Efficacy of plant essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat vegetables: antimicrobial and sensory screening. *J Food Prot* 2008;71:1846-54.