การออกฤทธิ์ร่วมของน้ำมันหอมระเหยและการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของฟิล์มคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส

Combination Effects of Essential Oils and Enhancement of Antibacterial Properties in Carboxymethyl Cellulose Film

ณัฐณิชา ตัณไชยศรีนคร[1], ชนาภา บัวทอง[1] และ วรรณพร คลังเพชร[1*]

Natnicha Tanchaisrinakhon[1], Chanapa Buathong[1] and Wannaporn Klangpetch[1*]

[1]99 หมู่ 9 ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

[1]99 Moo 9 Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture Natural Resources and Environments, Naresuan University, Phitsanulok, 65000, Thailand

*Corresponding author: wannapornk@nu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์เชิงเดี่ยวและเชิงร่วมของน้ำมันหอมระเหยจากพืชในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร และประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการส่งเสริมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของฟิล์มย่อยสลายได้ที่ผลิตจากคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส โดยเริ่มจากการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli, Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ของน้ำมันหอมระเหย 10 ชนิด ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชย ออริกาโน ตะไคร้ ไธม์ขาว โหระพา กะเพรา เมล็ดผักชี กานพลู โรสแมรี่ และ โป๊ยกั๊ก ด้วยวิธี Agar disc diffusion test พบว่าน้ำมันหอมระเหยเปลือกอบเชย (CE) และออริกาโน (OE) มีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยมีขนาดวงใสในช่วง 9.3±2.1 ถึง 21.0±2.6 และ 11.0±1.0 ถึง 13.7±2.5 mm ตามลำดับ เมื่อนำ CE และ OE มาหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี Microbroth dilution method พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.625 mg/ml ต่อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ เมื่อทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมโดยวิธี Checker board test พบว่าน้ำมันสองชนิดมีการออกฤทธิ์เสริมกันบางส่วน โดยมีค่าดัชนีประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมต่อ *E. coli, S. typhimurium, B. cereus* และ *S. aureus* เท่ากับ 0.561 0.748 0.529 และ 0.748 ตามลำดับ ทั้งนี้ในการใช้น้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดร่วมกันสามารถลดความเข้มข้นของ CE และ OE ได้ถึง 4 ถึง 32 เท่า และ 2 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อเติมน้ำมันหอมระเหยลงในฟิล์มคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสแล้ว ยังพบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียของฟิล์มอีกด้วย ทั้งนี้สามารถนำฟิล์มชนิดนี้ไปพัฒนาเป็นวัสดุบรรจุทางเลือกใหม่เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลิตผลทางการเกษตรและผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป

คำสำคัญ: น้ำมันหอมระเหย, การออกฤทธิ์ร่วม, แบคทีเรียก่อโรคในอาหาร, การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย, ฟิล์มคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the individual and combined antibacterial activities of plant essential oils against food-borne pathogenic bacteria and the antibacterial properties enhancement of carboxymethyl cellulose film when incorporated with the oils. Antibacterial susceptibility test was performed by agar disc diffusion method for ten essential oils including Cinnamon bark, Oregano, Lemongrass, White thyme, Sweet basil, Holy basil, Coriander, Clove bud, Rosemary and Anise star against *Escherichia coli, Salmonella* Typhimurium*, Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. The results showed that both Cinnamon bark essential oil (CE) and Oregano essential oil (OE) gave the highest antibacterial activities with clear zone diameters of 9.3±2.1 to 21.0±2.6 and 11.0±1.0 to 13.7±2.5 mm, respectively, while the minimum inhibitory concentrations of CE and OE were 0.625 mg/ml against all pathogens. Checker board test was used to determine the fractional inhibitory concentration indices, showing as 0.561, 0.748, 0.529 and 0.748 against *E. coli, S. typhimurium, B. cereus* and *S. aureus* indicating that CE and OE were partial synergism. The results suggested that this combination could reduce the necessary concentration of CE and OE by 4 to 32 times and 2 times respectively. Moreover, the carboxymethyl cellulose films incorporated with the oils showed antibacterial activities. The films investigated in this study may be further developed as the alternative packaging materials to prolong shelf life of agricultural and food products.

Keywords: Essential oils, synergistic effect, food-borne pathogenic bacteria, antibacterial activity, carboxymethyl cellulose film

บทนำ

แม้ทุกวันนี้จะมีการประยุกต์ใช้ศาสตร์หลายแขนงร่วมกันในการถนอมอาหาร เช่น การใช้ความร้อน การแช่เย็น การฉายรังสี แต่ศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับบรรจุภัณฑ์ก็ยังคงเป็นที่นิยมและมีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากการถนอมอาหารโดยบรรจุภัณฑ์ดังกล่าวไม่ส่งผลให้เกิดการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร การใช้ฟิล์มที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable film) เป็นหนึ่งในวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการรักษาคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร โดยฟิล์มผลิตจากสารพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติใช้เคลือบหรือห่อหุ้มอาหารหรือเป็นบรรจุภัณฑ์ชั้นใน (Primary Packaging) ที่สัมผัสกับอาหาร ทำหน้าที่ป้องกันการสูญเสียความชื้น การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และอัตราการหายใจในผักผลไม้ สามารถผลิตได้จากทั้งโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต (Alves *et al*., 2011) ในปัจจุบันได้เกิดกระแสผลักดันการนำกลับมาใช้ใหม่ของวัสดุต่าง ๆ มากขึ้น โดยเฉพาะวัสดุพลอยได้หลังกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมเกษตรและอาหาร คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) เป็นพอลิเมอร์ประเภทไฮโดรคอลลอยด์ที่สกัดได้จากเปลือกและเนื้อของพืชรวมถึงวัสดุพลอยได้จากอุตสาหกรรมแปรรูปผักผลไม้ ถือเป็นพอลิเมอร์ที่ได้รับความสนใจสำหรับการผลิตฟิล์มที่ย่อยสลายได้ เนื่องจากฟิล์มที่ได้มีความใส แข็งแรง และละลายน้ำได้ดี และจากคุณสมบัติฟิล์มที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ จึงมีส่วนช่วยลดปริมาณขยะจากการบริโภคและไม่ก่อมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากสารพอลิเมอร์ส่วนใหญ่ที่ใช้ผลิตฟิล์มที่ย่อยสลายได้ยังขาดคุณสมบัติในการต้านทานจุลินทรีย์ จึงมีการพัฒนาคุณภาพด้านการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของฟิล์มที่ย่อยสลายได้ โดยการเติมสารต้านจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตฟิล์มเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ เช่น งานวิจัยของ Honarvar *et al*. (2017) ที่ศึกษา

การยืดอายุของเนื้อไก่โดยใช้ฟิล์มโพลีโพรพิลีนเคลือบด้วย CMC ร่วมกับน้ำมันหอมระเหยจาก *Zataria multiflora* พบว่าสามารถยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อไก่ที่อุณหภูมิแช่เย็นจาก 3 วัน เป็น 9 วันได้ โดยจุลินทรีย์มีชีวิตทั้งหมดที่นับได้ในตัวอย่างที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มชนิดนี้มีค่าลดลงและชะลอการเจริญในช่วงวันที่ 6–9 หรือในงานวิจัยของ Shahbazi (2017) ที่ศึกษาลักษณะของฟิล์มนาโนคอมโพสิตจากไคโตซานและ CMC ร่วมกับน้ำมันหอมระเหยจาก *Ziziphora clinopodioides* และสารสกัดเมทานอลของ *Ficus carica* พบว่าฟิล์มที่เติมสารผสมนี้สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium และ *Escherichia coli* โดยมีขนาดวงใสแสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้ออยู่ในช่วง 13.6–27.4 มิลลิเมตร

จากงานวิจัยข้างต้น แสดงให้เห็นว่าฟิล์มย่อยสลายได้ที่เติมน้ำมันหอมระเหยมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ทำให้สามารถลดค่าใช้จ่ายในการใช้กระบวนการถนอมอาหารอื่น ๆ ลงได้ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของน้ำมันหอมระเหยทั้งแบบเดี่ยวและการออกฤทธิ์ร่วม และศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของฟิล์ม CMC เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาฟิล์มย่อยสลายได้ที่มีประสิทธิภาพในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์และเชื้อจุลินทรีย์

น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในงานวิจัยนี้มี 10 ชนิด ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชย ออริกาโน ตะไคร้ ไธม์ขาว โหระพา กะเพรา เมล็ดผักชี กานพลู โรสแมรี่ และ โป๊ยกั๊ก ได้จากบริษัทโบตานิคเอสเซนส์ จำกัด (ประเทศไทย) CMC ที่ใช้ในการผลิตฟิล์มได้จาก บริษัท มิสไอศกรีม จำกัด (ประเทศไทย) จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli* TISTR 780, *Salmonella* Typhimurium TISTR 292, *Bacillus cereus* TISTR 687 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย

เตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ โดยนำเชื้อบริสุทธิ์มาขีดแยกเชื้อลงบนอาหารเพาะเชื้อ Mueller-Hinton Agar (MHA; Difco, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีถ่ายลงในอาหารเพาะเชื้อ Mueller-Hinton Broth (MHB; Difco, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการเจือจางเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml นำสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้มาทำการ spread ลงบนอาหารแข็ง Tryptic soy agar (TSA; Himedia, India) วางแผ่นดิสก์ขนาด 6 มิลลิเมตรที่ปราศจากเชื้อลงบนอาหารแข็งในตำแหน่งที่กำหนด แล้วหยดน้ำมันหอมระเหยทั้ง 10 ชนิด ที่ละลายในไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงบนแผ่นดิสก์ นำไปบ่มที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่ม วัดขนาดวงใสและบันทึกผล โดยใช้ DMSO เป็นชุดควบคุมผลลบ

การวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และประเมินการออกฤทธิ์ร่วมของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย 2 ชนิดที่แสดงขนาดวงใสกว้างที่สุดจากการทดลองข้างต้นมาวิเคราะห์ค่า MIC โดยวิธี Micro-broth dilution method (Tahlan., 2014) นำสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ใส่ลงใน 96-wells plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร เติมน้ำมันหอมระเหยที่เจือจางไว้ใน MHB ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.009 – 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (Drawell, China) ก่อนนำไปบ่มที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ครบเวลานำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้ง อ่านผล MIC จากหลุมที่มีความเข้มข้นของน้ำมันต่ำที่สุด ที่ค่าการดูดกลืนแสงไม่เปลี่ยนแปลง จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยมาทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมด้วยวิธี

Checkerboard test (Hauser *et al*.,2015) โดยเจือจางน้ำมันที่ความเข้มข้น 2.5–0.019 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใส่น้ำมันชนิดละ 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่มีสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียอยู่ 50 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงเช่นเดียวกับการหาค่า MIC โดยนำความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันทั้งสองชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เมื่ออยู่ร่วมกันมาคำนวณหาดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วม (FICi) จากสูตรดังนี้

$$FICi = \frac{MIC_{A/B}}{MIC_A} + \frac{MIC_{B/A}}{MIC_B}$$

จากสมการ ค่า FIC_i คือ ดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม (fractional inhibitory concentration index), MIC_A คือ MIC ของสาร A, MIC_B คือ MIC ของสาร B, $MIC_{A/B}$ คือ MIC ของสาร A เมื่อใช้ร่วมกับสาร B และ $MIC_{B/A}$ คือ MIC ของสาร B เมื่อใช้ร่วมกับสาร A สำหรับการประเมินผลการออกฤทธิ์ร่วมนั้น ประเมินจาก $FIC_i \leq 0.5$ หมายถึงเสริมฤทธิ์กัน, $0.5 < FIC_i \leq 1$ หมายถึงเสริมฤทธิ์กันบางส่วน, $1 < FIC_i \leq 4$ หมายถึงไม่เสริมฤทธิ์ และ FIC_i มากกว่า 4 หมายถึงออกฤทธิ์ต้านกัน

การผลิตฟิล์ม CMC และการทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

การเตรียมสารละลายฟิล์ม CMC อ้างอิงจากวิธีของ Alireza et al. (2015) โดยมีการปรับเปลี่ยนให้เหมาะสม ดังนี้ เตรียมสารละลายให้มีความเข้มข้นของ CMC เป็น 2% (w/v) โดยละลาย CMC ด้วยน้ำกลั่น คนขณะให้ความร้อนจนอุณหภูมิถึง 70° C เป็นเวลา 30 – 45 นาที เติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 60% (v/w) ของปริมาณ CMC ที่ใช้ แล้วคนต่อ 10 นาที จนเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงถึง 50° C โดยประมาณ จากนั้นจึงเติม CE และ OE ลงในสารละลายฟิล์มที่ความเข้มข้น 2, 4, 6 และ 8% (v/v) เติม Tween 80 ความเข้มข้น 0.1% ของน้ำมันหอมระเหย (v/v) เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ (Homogenizer, Wiggen Hauser D500**,** Germany) และไล่ฟองอากาศในเนื้อสารด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ (Sonicator, ELMA E30H, Germany) เทสารละลายฟิล์มปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงบนถาดซิลิโคนขนาด 5.5×8 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง ทำการลอกเก็บในโถดูดความชื้นที่ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ที่ 51–52% โดยเกลือแมกนีเซียมไนเตรตอิ่มตัว เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำฟิล์มที่ได้มาทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar diffusion method โดยตัดฟิล์มให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร วางบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง MHA ที่ผ่านการ spread plate ด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด (รวมถึงชุดควบคุม ได้แก่ แผ่นฟิล์มที่ไม่มีการเติมน้ำมันหอมระเหย) นำไปบ่มที่ 35° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดวงใสที่ปรากฏขึ้น วิเคราะห์และบันทึกผลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple's Range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

ผลการทดลองและวิจารณ์

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย 10 ชนิด

เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรและเครื่องเทศทั้ง 10 ชนิดมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S.* Typhimurium*, E. coli, S. aureus และ B. cereus* โดยวิธี Agar disc diffusion test พบว่าน้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่มีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดที่นำมาทดสอบ ทั้งนี้ น้ำมันหอมระเหยเปลือกอบเชย (CE) และออริกาโน (OE) มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อสูงสุดจากขนาดวงใสที่ได้ คือ ต่อเชื้อ *S.* Typhimurium ที่ 21.0±2.6 และ 13.7±2.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 1 ผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mith *et al*. (2014) ที่ศึกษาคุณสมบัติการต้านเชื้อจุลินทรีย์และองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยทางการค้าต่อเชื้อก่อโรคในอาหารและเชื้อที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย ซึ่งมีค่าวงใสที่ใกล้เคียงกันโดย CE ให้ขนาดวงใสต่อเชื้อ *S.* Typhimurium เท่ากับ 23.0±0.7 มิลลิเมตร ขณะที่ OE ให้ขนาดวงใสต่อเชื้อ *S.* Typhimurium เท่ากับ 14.1±0.8 มิลลิเมตร จากผลการทดลองข้างต้น จึงเลือก OE และ CE ไปศึกษา MIC และประเมินการออกฤทธิ์ร่วมต่อไป

ค่า MIC และการออกฤทธิ์ร่วมของ CE และ OE

เมื่อนำ CE และ OE ไปทดสอบด้วยวิธี Micro-broth dilution test พบว่าทั้ง CE และ OE มีค่า MIC เท่ากับ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ เมื่อทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมของ CE และ OE พบว่าน้ำมันสองชนิดมีการออกฤทธิ์เสริมกันบางส่วน โดย CE มีค่า MIC ที่ลดลงเมื่อใช้ร่วมกับ OE ($MIC_{CE/OE}$) ค่าดัชนีประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วม (FICi) ต่อ *E. coli*, *S.* Typhimurium, *B. cereus* และ *S. aureus* เท่ากับ 0.561 0.748 0.529 และ 0.748 ตามลำดับ ทั้งนี้ในการใช้น้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดร่วมกันสามารถลดความเข้มข้นของ CE และ OE ได้ถึง 4–32 เท่า และ 2 เท่า ตามลำดับ ดังที่แสดงใน Table 2 ผลการทดลองนี้เป็นไปในทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Clemente *et al*. (2016) ที่ทำการศึกษาคุณสมบัติและการทำงานในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยเปลือกอบเชยและมัสตาร์ด ซึ่งพบว่ามีค่า FICi อยู่ในช่วง 0.5–4 โดยได้ค่า FIC_i ต่อเชื้อ *E. coli* และ *B. cereus* เท่ากับ 0.75 และ 0.56 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับผลที่ได้ในการศึกษานี้ที่สุด และมีค่า FIC_i ต่อเชื้อ *S. aureus* ที่อยู่ในช่วง 1-4 ซึ่งมีค่ามากกว่า FIC_i จากการใช้ CE ร่วมกับ OE แสดงให้เห็นว่า CE กับ OE มีประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ที่ดีกว่า

เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดออกฤทธิ์เสริมกันเพียงบางส่วน โดยเมื่อใช้ร่วมกันจะสามารถลดความเข้มข้นของ OE ได้เพียงสองเท่า จึงได้เลือกที่จะศึกษาการผลิตฟิล์ม CMC ร่วมกับน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดแยกกัน

ความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียของฟิล์ม CMC ที่เติมน้ำมันหอมระเหย

จากการผลิตฟิล์ม CMC ที่มีการเติมน้ำมันหอมระเหยโดยการศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของ CE และ OE พบว่า ฟิล์มที่ได้มีลักษณะโปร่งแสง บาง และมีความยืดหยุ่น ซึ่งเมื่อทำการทดสอบการต้านเชื้อพบว่าฟิล์มที่เติม CE และ OE ที่ระดับความเข้มข้น 2-8% (v/v) มีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ โดยฟิล์มที่มีความสามารถโดดเด่นที่สุด ได้แก่ CE ที่ระดับความเข้มข้น 8% (8%–CE) ซึ่งมีขนาดวงใสต่อเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 34.0±1.0 มิลลิเมตร แสดงค่าสูงสุดเมื่อเทียบกับ 2%–CE, 4%–CE และ 6%–CE ($P < 0.05$) ผลของฟิล์ม CE ต่อเชื้อ *S.* Typhimurium, *B. cereus* และ *S. aureus* ก็เป็นไปในทิศทางเดียวกัน และในส่วนของฟิล์ม CMC ที่เติม OE พบว่า ผลวงใสต่อเชื้อ *E. coli* ของฟิล์มที่มีความเข้มข้น 4% (4%–OE) ไม่มีความแตกต่างกับผลวงใสของ 6%–OE และ 8%–OE อย่างมีนัยสำคัญ โดยวงใสของฟิล์มทั้งสามระดับความเข้มข้นมีขนาดอยู่ที่ 19–20 มิลลิเมตร เช่นเดียวกับผลวงใสของฟิล์มต่อเชื้อ *S.* Typhimurium, *B. cereus* และ *S. aureus* ที่ขนาดวงใสของ 6%–OE และ 8%–OE ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญดังผลที่ปรากฏใน Table 3 ผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับผลการทดลองของ Ma *et al*. (2016) ที่ศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซานร่วมกับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยอบเชยและน้ำมันถั่วเหลือง โดยพบว่าวงใสของฟิล์มต่อเชื้อ *E. coli, S. enterica* และ *L. monocytogenes* มีค่าอยู่ในช่วง 11.4–23.5 มิลลิเมตร

จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสูง เนื่องจากคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำของน้ำมันหอมระเหยทำให้สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในเซลล์แบคทีเรียได้ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์แบคทีเรีย ก่อให้เกิดผลกระทบต่อโครงสร้างและกระบวนการต่างๆ ในเซลล์แบคทีเรีย นอกจากนี้ยังทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการฉีกขาดจนสูญเสียคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่าน ทำให้ไอออนต่าง ๆ จากภายในเซลล์ไหลออกนอกเซลล์ โดย OE ซึ่งมีสารสำคัญ คือ Carvacrol เป็นองค์ประกอบหลักที่ทำให้เกิดการรั่วไหลของฟอสเฟสไอออนภายในเซลล์ ทำให้เซลล์หยุดการเจริญ ในส่วนของ CE ซึ่งมี Cinnamaldehyde เป็นองค์ประกอบหลัก พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ โดยหมู่ carbonyl ใน Cinnamaldehyde จะจับกับโปรตีน ส่งผลให้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ amino acid decarboxylase ทว่า เนื่องจากองค์ประกอบสำคัญในน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน การใช้น้ำมันร่วมกันจึงอาจเกิดการต้านฤทธิ์กันหรือไม่เสริมฤทธิ์กันได้ โดยเบื้องต้นมีการสันนิษฐานว่าอาจมีสาเหตุมาจากน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ร่วมกันมีการออกฤทธิ์ในบริเวณเดียวกัน หรือทำปฏิกิริยาต่อกัน จึงทำให้ไม่สามารถแสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อได้เต็มที่ เป็นสาเหตุให้เกิดการต้านฤทธิ์กันหรือไม่แสดงการออกฤทธิ์ร่วมกันได้อย่างสมบูรณ์ (Hyldgaard *et al*., 2012)

อย่างไรก็ตาม ในการทดลองนี้ เมื่อเติมน้ำมันหอมระเหยปริมาณ 8% ลงในสารละลายฟิล์ม พบว่าเกิดปัญหาคือฟิล์มก่อตัวค่อนข้างยาก แห้งช้า แสดงให้เห็นว่าระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่เติมลงในฟิล์มส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของฟิล์ม มีรายงานถึงผลของน้ำมันหอมระเหยที่ทำให้ความแข็งแรงของฟิล์มลดลง ทั้งนี้เป็นเพราะองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ เมื่อผสมลงในสารละลายของพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำ เช่น CMC จึงไปขัดขวางการทำพันธะยึดเหนี่ยวกันของพอลิเมอร์และกลีเซอรอล ทำให้เกิดระยะห่างระหว่างโมเลกุล ถึงแม้ว่าจะมีสารอิมัลซิไฟเออร์เป็นตัวผสานก็ตาม (Atares and Chiralt, 2016.) จากสมบัติไม่ชอบน้ำดังกล่าวทำให้เมื่อน้ำมันหอมระเหยทำปฏิกิริยากับ Hydroxyl group ส่งผลให้ฟิล์มทนต่อความชื้นได้ดีและละลายน้ำได้ยากขึ้น ซึ่งหากต้องการฟิล์มที่ละลายน้ำได้ดีอาจต้องควบคุมปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่เติมลงในฟิล์มให้เหมาะสม จึงสมควรที่จะต้องพิจารณาเป้าหมายของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการยืดอายุการเก็บรักษาโดยฟิล์มชนิดนี้ เพื่อกำหนดคุณลักษณะของฟิล์มที่ต้องการให้ชัดเจน และศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยต่อสมบัติทางกายภาพของฟิล์มต่อไป

สรุป

น้ำมันหอมระเหยเปลือกอบเชยและออริกาโนมีการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเพียงบางส่วนเมื่อผลิตฟิล์ม CMC โดยใช้น้ำมันแต่ละชนิดประกอบ พบว่าฟิล์มสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดที่นำมาทดสอบได้ อย่างไรก็ตาม ปริมาณน้ำมันหอมระเหยออริกาโนที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 4% ขึ้นไปไม่มีผลต่อขนาดวงใสต่อเชื้อ *E. coli* และที่ความเข้มข้น 6% ขึ้นไปไม่มีผลต่อ *S.* Typhimurium, *B. cereus* และ *S. aureus* ในขณะเดียวกัน ปริมาณของน้ำมันหอมระเหยเปลือกอบเชยที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อขนาดวงใสต่อเชื้อทุกสายพันธุ์ โดยขนาดวงใสจะกว้างขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Alireza D., Vadood R., Hedayat H., Saeedeh S. A. ,J. Bruce Germand, Kiandokht G., Mansour K., and Ramin K.. (2015). Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing *Zataria multiflora* essential oil. International Journal of Biological Macromolecules, 72 (2015): 606–613.

Atares L. and Chiralt A.. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. Trends in Food Science & Technology 48: 51-62.

Alves D. V., Ferreira R. A., Freitas F. C. N., Reisb A.M. M., and Coelhosob M. I.. (2011). Characterization of biodegradable films from the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. Carbohydrate Polymers, 83: 1582–1590.

Clemente I., Aznar M., Silva F., Nerín C. (2016). Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 36: 26–33.

Hauser C., Hirzberger L., Unemo M., Furrer H., and Endimiani A.. (2015). In Vitro Activity of Fosfomycin Alone and in Combination with Ceftriaxone or Azithromycin against Clinical *Neisseria gonorrhoeae* Isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, (59): 1605-1611.

Honarvar Z., Farhoodi M., Khani M. R., and Shojaee-Aliabadi S.. (2017). Extended Shelf Life of Chicken Meat Using Carboxymethyl Cellulose Coated Polypropylene Films Containing *Zataria multiflora* Essential Oil. World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Nutrition and Food Engineering, 11(8): 609-613.

Hyldgaard M., Mygind T., and Meyer L. R. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Frontiers in Microbiology | Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy, 3(12): 2.

Ma Q., Davidson M. P., and Qixin Zhong Q. (2016). Antimicrobial properties of microemulsions formulated with essential oils, soybean oil, and Tween 80. International Journal of Food Microbiology, 2(226); 20-25.

Mith H., Dure R., Delcenserie. V., Zhiri A., Daube G., and Clinquart A. (2014). Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. Food Science & Nutrition 2014; 2(4): 403–416.

Shahbazi Y. (2017). Characterization of nanocomposite films based on chitosan and carboxymethylcellulose containing *Ziziphora clinopodioides* essential oil and methanolic *Ficus carica* extract. Journal of Food Processing and Preservation; 42.

Tahlan V. (2014). "Antimicrobial Activity Of Essential Oil Emulsions And Possible Synergistic Effect On Food Borne Pathogens" Wayne State University Theses. Paper 316.

Table 1 Inhibition zone of 10 EOs against pathogenic bacteria.

EOs	Inhibition zone (mm)			
	S. Typhimurium	*E. coli*	*S. aureus*	*B. cereus*
Cinnamon bark	21.0±2.6	9.3±2.1	18.7±0.7	16.0±1.7
Oregano	13.7±2.5	13.0±2.6	11.3±1.5	11.0±1.0
Lemongrass	14.1±0.1	7. 5±0.7	10.1±1.0	10.7±0.6
Thyme white	10.5±2.1	8.3±1.5	7.7±1.2	7.7±0.6
Sweet basil	10.0±0.1	7.3±0.6	7.7±0.6	6.7±0.6
Holy basil	8.0±0.1	7.0±0.1	7.5±0.7	8.3±0.6
Coriander	6.0±0.1	7.5±0.7	6.5±0.7	7.5±0.7
Clove bud	ND	7.0±0.1	7.0±0.05	6.7±0.6
Rosemary	8.0±0.0	ND	ND	ND
Anise star	ND	7.0±0.1	ND	ND

**ND = Not detected.*

Table 2 MIC and FIC_i of CE and OE.

Pathogenic bacteria	MIC (mg/ml)				FIC_i
	OE	CE	OE/CE	CE/OE	
***S.* Typhimurium**	0.625	0.625	0.312	0.156	0.748
E. coli	0.625	0.625	0.312	0.039	0.561
S. aureus	0.625	0.625	0.312	0.156	0.748
B. cereus	0.625	0.625	0.312	0.019	0.529

Table 3 Inhibition zone (mm diameter±SD) of CMC films incorporated with CE and OE.

Essential oils	Concentration (%)	Inhibition zone (mm)			
		S. Typhimurium	*E. coli*	*S. aureus*	*B. cereus*
Cinnamon bark	2	13.33±0.58^{d}	14.33±0.57^{d}	13.67±1.52^{c}	13.00±1.00^{d}
	4	16.33±0.58^{c}	17.67±1.52^{c}	16.00±1.00^{c}	19.00±1.00^{c}
	6	24.33±1.15^{b}	25.00±0.00^{b}	20.33±1.15^{b}	24.00±1.00^{b}
	8	30.33±0.58^{a}	34.00±1.00^{a}	27.33±2.08^{a}	32.00±1.73^{a}
Oregano	2	15.00±0.00^{b}	14.33±1.15^{b}	11.33±0.57^{c}	14.33±0.57^{c}
	4	17.00±1.73^{b}	19.33±2.08^{a}	18.00±1.00^{b}	20.33±0.57^{b}
	6	23.33±1.53^{a}	19.33±2.31^{a}	20.33±0.57^{a}	27.67±2.08^{a}
	8	22.67±0.57^{a}	20.67±0.57^{a}	20.33±1.53^{a}	28.33±1.53^{a}

**Means in each column with different superscript letters are significantly different. ($P < 0.05$)*