

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง



ส่วนที่ 1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาและกระเพราในการยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ต่างๆ (In vitro)

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพาในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ (In vitro)

จากศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพา ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีแพร่ผ่านแผ่นกระดาษกรอง (Disc diffusion method) แล้วอ่านผลจากบริเวณใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นจากผลการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่า น้ำมันหอมระเหยโหระพาสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทุกกลุ่มและทุกปริมาณ ได้แก่ แบคทีเรียแลคติก เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และ แบคทีเรียแกรมลบ ที่ปริมาณ 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร โดยน้ำมันหอมระเหยโหระพาสามารถยับยั้ง *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR 942 ได้ที่สอดคล้องกับทดลองของ ดวงฤดี หวันหนู (2553) ซึ่งได้ศึกษาน้ำมันหอมระเหยโหระพาสามารถยับยั้งการเจริญโดยวิธี disc diffusion method ที่ความเข้มข้น 2,000 ppm. พบว่ายับยั้ง *Leu. mesenteroides*, *L. plantarum* และ *S. aureus* ได้ให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสของแบคทีเรีย เท่ากับ 17.5, 16.43 และ 15.10 มิลลิเมตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับการรายงานของ Lachowicz K.J.(1998) พบว่าน้ำมันหอมระเหยโหระพาสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเป็นพิษ คือ *A. hydrophilla* AFISC0110, *Enterobacter aerogenes* NCTC10006, *E. coli* NCTC8196, *L. plantarum* AFISC2102, *Leu. cremoris* AFISC2206, *L. innocua* AFISC2305, *Enterobacter faecalis* AFISC3901 และ *S. aureus* AFISC3601 นอกจากนี้ Sakovic et al. (2007) รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยโหระพายับยั้ง *S. aureus* ATCC12228, *S. Typhimurium* ATCC13311 และ *E. coli* O157: H7 ได้เช่นกัน

แต่เมื่อนำมาหาค่า MIC และ MBC กลับพบว่า *A. hydrophilla* TISTR 1321 มีประสิทธิภาพดีที่สุด เนื่องจาก *Leu. mesenteroides* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ส่วน *A. hydrophilla* เป็นแกรมลบ ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกมีความไวต่อสารต้านจุลินทรีย์จากน้ำมันหอมระเหยมากกว่า

แบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบจะมีผนังเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่ม Lipopolysaccharide จึงทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีความแข็งแรงมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (ปทุม อรุณวัชรินทร์และคณะ, 2550) นอกจากนี้การผันแปรของค่า MIC ขึ้นอยู่กับชนิดของสารอิมัลซิไฟเออร์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายอีกด้วย (Suppakul *et al.* 2003) โดยสาเหตุที่การยับยั้งแตกต่างกันกับการศึกษาที่ผ่านมา เนื่องจากประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับ สายพันธุ์จุลินทรีย์ พืชเคมีที่เป็นองค์ประกอบ ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย ฤดูกาล ช่วงระยะเวลาเก็บเกี่ยว อายุของใบโหระพา (Chang *et al.* 2009) พันธุ์ของโหระพา (Runyaroo, 2009) ส่วนของต้นที่นำมาสกัด (ลำต้น ใบ และดอก) (Rattanachaikunsopon, 2010) แหล่งเพาะปลูก (จารุภา วิโชชน์, 2549) วิธีการสกัด (Suppakul *et al.* 2003) และ ชนิดของสารสกัด (Nwinyi *et al.* 2009)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าน้ำมันหอมระเหยโหระพามีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ คือ linalool, eugenol, eucalyptol, limonene, chavicol และ methol ซึ่งจะทำให้มีผลต่อ (จันทร์เพ็ญ มะลิพันธ์, 2549) ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ โดยน้ำมันหอมระเหยจะไปยับยั้งและทำลายการสร้าง peptidoglycan ทำให้การสร้างผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์แล้วแบคทีเรียจะตายได้ , รบกวนกระบวนการ oxidative phosphorylation ของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้พลังงานในตัวเซลล์ของแบคทีเรียถูกปล่อยออกมาน้อยลง นอกจากนี้ยังทำลาย osmotic barrier ทำให้มีผลกระทบต่อการทำงานภายในเซลล์ และทำให้เซลล์ตายได้, รบกวนหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์โดยไปละลายชั้นไขมัน (phospholipid bilayer) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งประสิทธิภาพของเซลล์ในการควบคุมการซึมผ่านของสาร (osmotic barrier) ลดลง เป็นสาเหตุให้น้ำซึมผ่านเข้าเซลล์เพิ่มขึ้นและทำให้ผนังเซลล์เกิดการฉีกขาด ทำให้สูญเสียสารประกอบภายในเซลล์ เซลล์จึงตายในที่สุด, ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากโปรตีนจะเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ปกติ และมีผลต่อระบบพันธุกรรมของเชื้อ ซึ่งไปทำลายหรือทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ได้ช้าลง

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่าง ๆ (*In vitro*)

จากการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยกระเพราสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทุกชนิด ซึ่งจากผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เกิดจากองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในน้ำมันหอมระเหยกระเพราคือ

Eugenol, Methyl Eugenol และ Linalool โดยสาร 2 ตัวแรกอยู่ในกลุ่มของสารประกอบ Phenol ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ในขบวนการ Metabolism ของเชื้อแบคทีเรีย โดยทำให้เอนไซม์และโปรตีนอื่นๆ ในเซลล์เสียสภาพ เกิดการบาดเจ็บที่เยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลทำให้สารต่างๆ ภายในเซลล์ไหลออกสู่ภายนอก ส่วน Linalool นั้นเป็นสารที่มีฤทธิ์ช่วยส่งเสริมการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย จึงเป็นผลให้กระเพราที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (วิชุดาและหม่อม. 2550) นอกจากนี้ผลการศึกษาข้างสอดคล้องกับ Nanasombat and Lohasupthawee (2005) นำใบกระเพรามาสกัดน้ำมันหอมระเหยแล้วทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ ด้วยวิธี disc diffusion method พบว่า สามารถยับยั้ง *S.Typhimurium*, *E.coli* โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณวงใส เท่ากับ 9 มิลลิเมตร เช่นเดียวกับการรายงานของ Bhattacharjee et al. (2012) พบว่า สามารถยับยั้ง *S.aureus*, *B.subtilis*, *E.coli* และ *P.eruginosa* โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณวงใส เท่ากับ 14.67, 6.33, 11.00, 12.00 มิลลิเมตร

การที่นำน้ำมันหอมระเหยกระเพรามาทดสอบการยับยั้งโดยวิธี disc diffusion method จะสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ทุกชนิด แต่เมื่อนำมาศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยกระเพราที่สามารถยับยั้งการเจริญและทำลายจุลินทรีย์ พบว่า *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *E. faecalis* TISTR 888, *Streptococcus* sp. TISTR 1030 มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 625 ppm. ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดเป็นพวกแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียกลุ่มแลคติกซึ่งน้ำมันหอมระเหยกระเพรามีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดี (ปทุม อรุณวัชรินทร์และคณะ. 2550) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยกระเพราสามารถยับยั้งและทำลาย *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 625 ส่วน *L. sakei* TISTR 890 มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 1250 แต่ *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR 942 มีค่า MIC และ MBC เท่ากันคือ 2,500 ppm. จะเห็นได้ว่าสายพันธุ์จุลินทรีย์และความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ดังจะเห็นได้จากการทดลองของ Nanasombat and Lohasupthawee (2005) นำน้ำมันหอมระเหยกระเพราศึกษาการยับยั้ง *S.Typhimurium* (non-DT104 strain) ได้ MIC เท่ากับ 4.2 µl/ml. ส่วน *S.Typhimurium* DT104 ได้ MIC เท่ากับ >62.5 µl/ml.

ส่วนที่ 2 ศึกษาความสามารถของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพด้านกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด

1. คุณภาพด้านจุลินทรีย์

จากการนำเนื้อสันนอกสุกรบดบรรจุกล่องพลาสติกแล้วหดย่น้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราบนกระดาษกรองติดไว้บริเวณฝากล่องโดยใช้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ใช้กระดาษกรอง 1 แผ่น หยด 20 ไมโครลิตร และ ใช้กระดาษกรอง 2 แผ่น หยดแผ่นละ 10 ไมโครลิตร เพื่อกระจายการระเหยให้ทั่วทั้งกล่อง จากนั้นนำกล่องพลาสติกไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มตัวอย่างที่ระยะเวลา 0, 1, 3 และ 5 วัน โดยสุ่มตรวจประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และคุณภาพทางด้านกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด พบว่า จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *E.coli* มีค่าเริ่มต้น 4.66 log cfu/g. และ ไม่พบ *E.coli* ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2547ก) ที่กำหนดให้มีค่าต่ำกว่า 5 log cfu/g. และต้องไม่พบ *E.coli* จากผลดังกล่าวจะเห็นว่าเนื้อสุกรที่นำมาใช้ในการทดลองผ่านกระบวนการผลิตที่ดี ส่วนผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด จุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ และ เชื้อราและยีสต์ ของทั้งน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราให้ผลไปในทางเดียวกัน มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) คือ เมื่อหดย่น้ำมันหอมระเหย โหระพาและกระเพรา 20 ไมโครลิตร บนกระดาษกรอง 1 แผ่น และ ใช้กระดาษกรอง 2 แผ่น หยดแผ่นละ 10 ไมโครลิตร ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมด จุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำและเชื้อราและยีสต์ ได้ โดยมีการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์แต่มีแนวโน้มในการเพิ่มน้อยและไม่ต่างกับเริ่มต้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น โดยความเย็นมีส่วนสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Govaris et al. (2010) ได้ทดลองนำเนื้อแกะบดที่มีเชื้อ *S.Enteritidis* (10^4 cfu/g) ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส บ่มนาน 12 วัน พบว่า *S.Enteritidis* ที่ตรวจพบในเนื้อแกะบดที่แช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส มีจำนวนไม่แตกต่างกับวันเริ่มต้น ส่วนที่บ่ม 10 องศาเซลเซียส พบการเพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 3 log cfu/g ในส่วนของเชื้อโคลิฟอร์มและอีโคไล น้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราก็ไม่มีผลต่อจำนวนเชื้อ แต่เมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้นจำนวนของเชื้อทั้งสองลดลง เนื่องจากทั้งเชื้อโคลิฟอร์มและอีโคไลถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อนและความเย็น (ศศิธร คณะรัตน์และกาญจณี ธรรมาพิพัฒน์กุล. 2534) จึงทำให้มีจำนวนที่ลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น

จากการที่น้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราไม่สามารถลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อสันนอกบดได้นั้น ซึ่งแตกต่างจากการทดลองข้างต้นที่น้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ใน *in vitro* ได้ดี เนื่องจากว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนในเนื้อสุกมีหลายชนิด ได้แก่ *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *E. coli*, *Yersinia* sp. และ *Listeria* sp. โดยการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ นอกจากจะทำให้เนื้อสัตว์ปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษแล้วยังทำให้เนื้อสัตว์เน่าเสียเร็วกว่าปกติ (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2542) ปกติแล้วปริมาณเชื้อดั้งเดิมที่มีอยู่ในเนื้อสุกมีผลต่อการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเช่นกัน ซึ่งหากเชื้อจุลินทรีย์ที่น้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราสามารถยับยั้งได้มีน้อยกว่าทำให้ไม่พบการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์และความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโหระพาอาจไม่เพียงพอที่จะยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ สอดคล้องกับการทดลองของ Salomakos *et al.* (2008) ได้ใช้น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 0.3, 0.6 และ 0.9% ยับยั้ง *E.coli* O157:H7 ในเนื้อบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส พบว่าที่ความเข้มข้น 0.3% ไม่สามารถยับยั้งได้ ส่วนที่ 0.6 และ 0.9% สามารถยับยั้ง *E.coli* O157:H7 ได้ และ Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn (2010) พบว่า การใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาที่ความเข้มข้น 20 ppm. สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. Enteritidis* SE3 ในหลอดทดลอง แต่เมื่อนำมาใช้กับแฮมต้องใช้ความเข้มข้น 100 และ 150 ppm. ซึ่งความเข้มข้นมากกว่าถึง 5-7.5 เท่า จึงจะสามารถยับยั้งได้ โดยมีผลต่อการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคคือ ที่ความเข้มข้น 100 ppm. ผู้บริโภคให้การยอมรับ ส่วนที่ 150 ppm. ไม่ให้การยอมรับโดยรวม

นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราจะสัมผัสเฉพาะส่วนผิวหน้าเนื้อสุกบดเท่านั้น และน้ำมันหอมระเหยยังไม่ได้สัมผัสกับเนื้อสุกบดเพียงอย่างเดียวแต่ส่วนหนึ่งจะไปจับกับ organic matter โปรตีน ไขมันต่างๆ ที่อยู่ในเนื้อ และไขมันจะป้องกันตัวเซลล์ด้านนอก (Zhang *et al.* 2009) ทำให้สารที่จะจับกับเชื้อจุลินทรีย์มีจำนวนน้อยลง น้ำมันหอมระเหยจึงไม่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ เพราะเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ได้ถูกสารจับจะมีชีวิตรอดและเพิ่มปริมาณขึ้นอีกเมื่อสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ (คมแข พิลาสสมบัติ. 2553) ดังนั้นปัจจัยที่จะต้องคำนึงถึงในการนำน้ำมันหอมระเหยมาใช้กับเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ คือ องค์ประกอบของอาหาร ได้แก่ ปริมาณน้ำ โปรตีน ค่าความเป็นกรด-ด่าง กลิ่น วัตถุเจือปนอาหาร และ ปัจจัยด้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn. 2010)

2. คุณภาพด้านกายภาพ

ด้านค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของเนื้อสันนอกสุกรบดที่มีการติดกระดาษกรองที่หยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราไว้บริเวณฝากล่อง 1, 2 แผ่น และ control มีการลดลงเพียงเล็กน้อยและใกล้เคียงกันนั้น และจะลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น เช่นเดียวกับค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างตามระยะเวลาในการเก็บรักษา ทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนในเนื้อต่ำลง (Warriss, 2005)

ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราทั้งชุดควบคุม, กระดาษกรองที่หยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราไว้บริเวณฝากล่อง 1 และ 2 แผ่น ต่อค่าสี พบว่า ค่าความสว่าง (L^*) ของเนื้อสันนอกสุกรบดมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาการเก็บมีระยะเวลานานขึ้นและมีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Maneenin *et al.* (2010) ทดลองนำเนื้อสันนอกสุกรบดมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 5 วัน พบว่า ค่าความสว่าง (lightness, L^*) ของตัวอย่างลดลงอย่างช้าๆ ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ในส่วนค่าสีแดงของเนื้อสันนอกสุกรบดจะมีค่าลดลงเมื่อเก็บนานขึ้น แสดงว่าสีของเนื้อค่อยเปลี่ยนจากสีแดงสดเป็นสีน้ำตาลของเมทไมโอโกลบิน ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากความสามารถในการจับกับออกซิเจนของไมโอโกลบินสูญเสียไปและเกิดการเสื่อมสภาพของไมโอโกลบินจึงทำให้สีของเนื้อเปลี่ยนไป (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, 2539) ซึ่งสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นเป็นดัชนีที่บ่งถึงความไม่สดของเนื้อ แต่อย่างไรก็ตามการชะลอการเปลี่ยนแปลงของสีเนื่องจากการออกซิเดชันของออกซิไมโอโกลบินสามารถทำได้โดยการรักษาเนื้อสัตว์ที่อุณหภูมิต่ำ (สุรสิทธิ์ วัฒนวิกิจัยและคณะ, 2551) ซึ่งจากการทดลองนี้จะเห็นว่า การใช้กระดาษกรองที่หยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราไว้บริเวณฝากล่อง 1 และ 2 แผ่น ให้ผลไม่ต่างจาก control แสดงว่าความเย็นมีผลช่วยชะลอการเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อ ส่วนค่าสีเหลือง (yellowness, b^*) เป็นค่าที่มีความสัมพันธ์กับระดับความเข้มของสีไขมันและการมีสีเหลืองเพิ่มขึ้นเนื่องมาจากการหืนของไขมันในเนื้อทำให้ไขมันมีสีออกเหลือง (Berruga *et al.* 2005) แต่จากการทดลองจะเห็นว่าเนื้อสันนอกสุกรบดที่เป็น control เนื้อสันนอกสุกรบดที่ติดกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราไว้บริเวณฝากล่อง 1 และ 2 แผ่น ไม่แตกต่างจากวันเริ่มต้นและเพิ่มขึ้นน้อยมาก เนื่องจากว่าเนื้อสันนอกสุกรที่นำมาใช้แทบจะไม่มีส่วนของไขมันเลย