

ผลของน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชัน

ต่อ *SALMONELLA* TYPHIMURIUM บนใบโหระพา

EFFICACY OF EMULSIFIED KAFFIR LIME PEEL ESSENTIAL OIL

AGAINST *SALMONELLA* TYPHIMURIUM ON BASIL LEAVES

อุมพร ทาไธสง* และ จิรายุ ตวิษานนท์

Umaporn Thathaisong*, and Jirayu Tavisanant

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Microbiology Department, Faculty of Science, Burapha University

*corresponding author e-mail: umaporn@buu.ac.th

(Received: 14 October 2024; Revised: 26 December 2024; Accepted: 21 January 2025)

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบผลของน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันต่อ *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) บนใบโหระพา โดยหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum inhibitory concentration; MIC) และทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum bactericidal concentration; MBC) ด้วยวิธี Macrobroth dilution พบว่า ค่า MIC และ MBC มีค่าเท่ากัน คือ 0.50% เมื่อทดสอบเวลาในการฆ่าเชื้อ (Time-kill assay) พบว่า น้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันความเข้มข้น 0.50% สามารถลดจำนวน *S. Typhimurium* ได้ >99.90% ภายในเวลา 5 นาที และได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการลดจำนวน *S. Typhimurium* บนใบโหระพา พบว่า น้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันความเข้มข้น 0.50% (1xMIC) และ 1% (2xMIC) สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* บนใบโหระพาได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันความเข้มข้น 1% (2xMIC) สามารถลดจำนวนเชื้อได้มากกว่าความเข้มข้น 0.50% (1xMIC) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า การล้างด้วยน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันทั้งสองความเข้มข้นไม่มีผลต่อสีของใบโหระพา ($P > 0.05$) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันมีประสิทธิภาพในการลดจำนวน *S. Typhimurium* ที่ปนเปื้อนบนใบโหระพา ซึ่งอาจสามารถนำมาใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเป็นสารทำความสะอาดผักสดได้

คำสำคัญ: น้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูด อิมัลชัน *S. Typhimurium*

Abstract

This study aimed to test the efficacy of emulsified kaffir lime peel essential oil against *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) on basil leaves. The minimum inhibitory concentration; MIC and minimum bactericidal concentration; MBC were determined by Macrobroth dilution. The MIC and MBC values were both 0.50%. The time–kill assay indicated that the emulsified kaffir lime peel essential oil concentration of 0.50 % effectively killed >99.90 % of the initial bacterial population within 5 minutes. Moreover, the antimicrobial activity of the emulsion against *S. Typhimurium* on basil leaves was tested. Compared to the control, the emulsion at concentrations of 0.50% (1xMIC) and 1% (2xMIC) showed significant reduction ($P<0.05$) in *S. Typhimurium* on the basil leaves. Wash treatment with 1% (2xMIC) exhibited greater significant effects on the pathogenic bacteria than 0.50% (1xMIC) ($P<0.05$). In addition, wash treatment with both concentrations of emulsified kaffir lime peel essential oil did not affect the color of basil leaves ($P>0.05$). The results from this study indicated that emulsified kaffir lime peel has efficacy in the decontamination of *S. Typhimurium* on basil leaves which can be applied to be as an alternative as a sanitizer for fresh vegetables.

Keywords: Kaffir lime peel essential oil, Emulsion, *S. Typhimurium*

บทนำ

ผักสด เป็นอาหารที่มีอุดมไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุที่ดีต่อสุขภาพผู้บริโภค ซึ่งผักที่ปลูกตามธรรมชาติสามารถพบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ค่อนข้างสูง โหระพาเป็นผักชนิดหนึ่งที่นิยมบริโภคสด แบคทีเรียก่อโรคที่มีรายงานการปนเปื้อนบนใบโหระพา คือ *Salmonella* (Alegbeleye, Singleton & Sant’Ana, 2018) และยังพบการปนเปื้อนในผักสดอื่นๆ เช่น ถั่วงอก (Fu et al., 2008) และผักกาดหอม (Niyomdech, Mungkornkaew & Samosornsuk, 2016) ซึ่งการปนเปื้อนเกิดได้ตั้งแต่กระบวนการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การขนส่ง และการจำหน่าย

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) เป็นเชื้อก่อโรคทางอาหารที่มีรายงานการปนเปื้อนบ่อยครั้งในผักสด และเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค Salmonellosis โดยผู้ที่ได้รับเชื้อจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อุจจาระร่วงแบบมีเลือดปนหรือไม่มีก็ได้ และสามารถติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องเสียชีวิตได้ (Goodburn & Wallace, 2013; Vugia et al., 2004) มีการรายงานการติดเชื้อ *S. Typhimurium* ในแต่ละปีประมาณ 150 ล้านคน และเสียชีวิตประมาณ 60,000 คน จากทั่วโลก (Plumb, Fields & Bruce, 2024) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อดังกล่าวในผักสด เพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

การล้างผักเป็นขั้นตอนสำคัญในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์และสารเคมี โดยวิธีการที่ใช้กันทั่วไปคือ ล้างด้วยคลอรีน เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายไม่สูงและสามารถลดเชื้อปนเปื้อนได้ แต่อาจทำให้ได้รับสารก่อมะเร็งจากการทำปฏิกิริยาของคลอรีนกับสารอินทรีย์ เช่น Trihalomethane (Chung et al., 2011) เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนคลอรีน จึงได้มีการทดลองนำสารจากธรรมชาติ โดยเฉพาะน้ำมันหอมระเหยจากพืชที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์มาใช้เป็นสารล้างทำความสะอาด ซึ่งได้รับการยอมรับโดยทั่วไปว่าปลอดภัย พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบอบเชยสามารถลด *S. Typhimurium* บนใบ Red mustard ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับน้ำกลั่น (Kang & Song, 2018) อย่างไรก็ตามน้ำมันหอมระเหยมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์เป็นสารล้างทำความสะอาดเนื่องจากมีความสามารถในการละลายน้ำและมีความคงตัวต่ำ (Moghimi et al., 2016) ดังนั้นการทำให้อยู่ในรูปอิมัลชัน จึงเป็นการแก้ไขข้อจำกัดดังกล่าวเพื่อนำไปใช้เป็นสารล้างที่มีประสิทธิภาพต้านจุลินทรีย์ทางเลือกใหม่ โดยมีการศึกษา พบว่า อิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยสามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7 และ *S. Typhimurium* บนใบโหระพาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (Park, Kang & Song, 2017) และอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบอบเชยสามารถลดจำนวน *Listeria monocytogenes* และ *E. coli* O157 : H7 บนใบผักเคล (Kale) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับการล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Kang et al., 2019)

มะกรูด (*Citrus hystrix*) เป็นพืชเมืองร้อน นำมาใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสในอาหารเอเชีย มีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูด มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (MIC=8 mg/mL) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (MIC=8 mg/mL) และ *E. coli* ATCC 2592 (MIC=13.30 mg/mL) (Sreepian et al., 2019) ปัจจุบันมีการทดลองนำน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันไปประยุกต์ใช้เป็นสารล้างผักสดไม่มาก โดยพบว่า น้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชัน (40% v/v kaffir lime peel oil+8% w/v gelatin+3% w/v lecithin) ความเข้มข้น 0.75% v/v สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์บนผัก chinese cabbage ได้ 2.68 3.30 และ 4.27 Log เมื่อแช่ด้วยอิมัลชันเป็นเวลา 5 10 และ 15 นาที ตามลำดับ (Srisukh et al., 2012a) อีกทั้งยังไม่มีผลการนำไปทดสอบการลดจำนวน *S. Typhimurium* ที่ปนเปื้อนบนใบผักสด

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการประเมินประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันในการลดจำนวน *S. Typhimurium* ที่ใส่ลงบนใบโหระพา โดยทำการล้างด้วยการแช่เป็นเวลา 5 นาที ที่ความเข้มข้น 1xMIC และ 2xMIC แล้วทำการตรวจนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตบนใบโหระพา นอกจากนี้ยังประเมินการเปลี่ยนแปลงสีของใบโหระพาหลังการล้างด้วยสารทดสอบ เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำสารจากธรรมชาติมาใช้แทนสารเคมีสำหรับยับยั้งเชื้อก่อโรค ซึ่งอาจเป็น

แนวทางในการนำมาประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ล้างทำความสะอาดผักสดในครัวเรือน รวมทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อให้ผู้บริโภคมีความปลอดภัยจากโรคติดต่อทางอาหาร

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมน้ำมันหอมระเหยในรูปอิมัลชัน (ดัดแปลงจาก Moghimi et al., 2016)

นำน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดบริสุทธิ์ (*Citrus hystrix*) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า มาเตรียมให้อยู่ในรูปอิมัลชัน โดยประกอบด้วย น้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดบริสุทธิ์ 10% w/w Tween 80 ความเข้มข้น 1% w/w และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 89% w/w ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยเครื่อง High speed homogenizer ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำไปเก็บรักษาที่ 4°C เพื่อทดลองขั้นต่อไป โดยสังเกตลักษณะทางกายภาพด้วยตาเปล่า (สี และการเป็นเนื้อเดียวกันหรือแยกชั้น) เป็นเวลา 12 สัปดาห์

2. การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (Minimum inhibitory concentration; MIC) และสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration; MBC) ของอิมัลชันต่อ *S. Typhimurium* ด้วยวิธี Macrodilution broth (ดัดแปลงจาก Clinical & Laboratory Standards Institute; CLSI, 2012)

เตรียมเซลล์แขวนลอย *S. Typhimurium* (ATCC 14028) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland standard No.0.50 ($\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/mL) โดยเชื้อโคโลนีเดี่ยวบนจานอาหาร Nutrient agar ใส่ลงในอาหาร Mueller–Hinton broth; MHB ปริมาตร 5 mL บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 4–5 ชั่วโมง นำมาปรับปริมาณเชื้อด้วย 0.85% NaCl ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland standard No.0.50 จากนั้นถ่ายเซลล์แขวนลอย ปริมาตร 0.10 mL ใส่ลงในอาหาร MHB ปริมาตร 9.90 mL จะได้ปริมาณเชื้อ $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL (ใช้ภายใน 15 นาที)

เตรียมน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันให้ได้ความเข้มข้น 4% ใน 1% Tween 80 จากนั้นเจือจางแบบสองเท่า (Two-fold dilution) ในอาหาร MHB 1 mL จำนวน 5 หลอด (2 ข้าง) ให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.00 1.00 0.50 0.25 0.125% ตามลำดับ แล้วเติมเซลล์แขวนลอย ($\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL) ของเชื้อ *S. Typhimurium* (ATCC 14028) ปริมาตร 1 mL ลงในทุกหลอด ผสมให้เข้ากัน จะได้ปริมาณเชื้อสุดท้ายในหลอดเท่ากับ 5×10^5 CFU/mL ส่วนความเข้มข้นสุดท้ายของสารทดสอบในหลอดเท่ากับ 1–0.065% จากนั้นเติม Resazurin (20 mg/mL) 5 μ L ลงในทุกหลอด นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง อ่านค่า MIC โดยสังเกตจากสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าสีเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู แสดงว่า มีการเจริญของเชื้อ ซึ่งค่า MIC คือ ความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ (อาหารเลี้ยงสีน้ำเงิน)

นำสารละลายจากหลอดทดสอบที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีน้ำเงิน มาหาค่า MBC โดยถ่ายสารละลายปริมาตร 10 uL หยดลงบนอาหาร Muller–Hinton agar หลอดละ 3 หยด นำจานไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านค่า MBC โดยสังเกตจากการเจริญบนอาหาร ซึ่งค่า MBC คือความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารที่ไม่พบการเจริญของเชื้อทดสอบ (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

3. การหาเวลาในการฆ่าเชื้อ (Time-kill) (ดัดแปลงจาก Park, Kang & Song, 2017)

เติมอีมีลชันลงไปในเซลล์แขวนลอยของ *S. Typhimurium* (1.50×10^6 CFU/ml) 10 mL ให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC (0.50%) (หลอดที่ 1) ส่วนชุดควบคุม ทำการเติม 1% Tween 80 ลงไปในเซลล์แขวนลอย นำไปบ่มที่ 37°C และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 5 10 15 และ 20 นาทีของการบ่ม โดยถ่ายสารละลายตัวอย่างของแต่ละช่วงเวลามา 0.10 mL เจือจางแบบสิบเท่า (Ten-fold dilution) ใน 0.10% Peptone water; PW ให้ได้ความเจือจางต่างๆ ทำการ Spread plate บนอาหาร Trypticase soy agar บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คำนวณจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต และรายงานผลในหน่วย Log CFU/mL (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

4. การเตรียมตัวอย่างผักสดและการใส่หัวเชื้อ

นำใบโหระพาสดประมาณ 40 กรัม มาล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทิ้งไว้ให้สะเด็ดน้ำ จากนั้นนำไปฉายภายใต้แสงยูวี (254 nm) ภายในตู้ชีวนิรภัย ด้านละ 15 นาที เพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์บนผิวใบโหระพา

ทำการใส่หัวเชื้อ *S. Typhimurium* ลงบนตัวอย่างผักสด ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Orue et al. (2013) โดยนำใบโหระพา 40 กรัม แช่ในเซลล์แขวนลอย ($\sim 1.5 \times 10^6$ CFU/mL) ปริมาตร 200 mL เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำใบโหระพาวางลงบนถาดปราศจากเชื้อ และทิ้งให้แห้งภายในตู้ชีวนิรภัย เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เชื้อเกาะบนใบผัก แล้วนำใบโหระพา จำนวน 10 กรัม ใส่ลงใน Stomacher bag จำนวน 2 ถุง (5 กรัม/ถุง) เพื่อไปตรวจนับจำนวนเชื้อที่เกาะบนใบโหระพาก่อนการล้าง ส่วนใบโหระพาที่เหลือนำไปล้างด้วยสารทดสอบ

5. การล้างผักสด (ดัดแปลงจาก Park, Kang & Song, 2018)

นำใบโหระพาที่ใส่หัวเชื้อแล้ว 10 กรัม มาแช่ในสารละลายสำหรับล้างผัก (อัตราส่วนของผักต่อสารละลายที่ใช้ล้าง 1 : 20 w/v) เป็นเวลา 5 นาที (ผลจากค่า Time-kill) ซึ่งได้แก่ น้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอีมีลชันความเข้มข้น $1 \times \text{MIC}$ ปริมาตร 200 mL และความเข้มข้น $2 \times \text{MIC}$ ปริมาตร 200 mL ส่วนชุดควบคุม คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่เติม 1% Tween 80 ปริมาตร 200 mL จากนั้นนำใบโหระพาจากแต่ละชุดทดสอบ ใส่ลงในถุง Stomacher bag จำนวน 2 ถุง (5 กรัม/ถุง) ไปตรวจนับจำนวน *S. Typhimurium* ที่รอดชีวิตบนใบผัก

6. การตรวจนับจำนวน *S. Typhimurium* บนผักสด (ดัดแปลงจาก Kang & Song, 2018)

เติม 0.10% PW ปริมาตร 45 mL ลงในถุงที่มีใบโหระพา 5 กรัม และตีผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เจือจางแบบสิบเท่าเพื่อให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม มาทำการ Spread plate บนอาหาร Brilliant Green Agar (Modified) (2 ซ้ำ) นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีเฉพาะของ *Salmonella* ซึ่งโคโลนีมีสีชมพู และสีของอาหารรอบๆ โคโลนีเปลี่ยนจากสีแดงเป็นใส คำนวณจำนวนเชื้อ และรายงานผลในหน่วย Log CFU/g

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปแบบอัลชันในการลดจำนวน *S. Typhimurium* ที่ใส่ลงบนผักสด ได้ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 2 ซ้ำ แล้ววิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab 17 Statistical Software โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design; CRD) และทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยแบบ Tukey's studentized range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

8. การวัดสีของใบโหระพา

วัดสีของใบโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปแบบอัลชัน และใบโหระพาผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เป็นเวลา 5 สารทดสอบ (ผัก 1 กรัม : 20 mL) รวมทั้งใบโหระพาที่ไม่ผ่านการล้าง ด้วยเครื่อง Colorimeter เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงสีของใบโหระพา โดยการวัดค่า L^* (ความสว่างหรือมืด) a^* (เขียวหรือแดง) และ b^* (น้ำเงินหรือเหลือง) จากนั้นคำนวณค่า ΔE จากสูตรนี้ $[(L^*_{\text{sample}} - L^*_{\text{control}})^2 + (a^*_{\text{sample}} - a^*_{\text{control}})^2 + (b^*_{\text{sample}} - b^*_{\text{control}})^2]^{1/2}$ (Park, Kang & Song, 2018) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Tukey's studentized range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรม Minitab 17 Statistical Software

ผลการวิจัย

1. ลักษณะของน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปแบบอัลชัน

น้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปแบบอัลชันที่เตรียมได้ มีลักษณะเป็นสารเหลวสีขาวขุ่นเป็นเนื้อเดียวกัน ดังภาพที่ 1 และเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ไม่เกิดการแยกชั้นของน้ำมันหอมระเหยและน้ำ และอัลชันมีสีขาวขุ่นเป็นเนื้อเดียวกัน

2. ค่า MIC และ MBC

ค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปแบบอัลชันต่อ *S. Typhimurium* เท่ากับ 0.50% และพบว่า มีค่า MBC เท่ากับ 0.50% เช่นเดียวกับค่า MIC

3. เวลาในการฆ่าเชื้อ (Time-kill)

ทดสอบเวลาในการฆ่าเชื้อเพื่อหาเวลาที่สั้นที่สุดที่น้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปแบบอิมัลชันความเข้มข้น 0.50% (ค่า MIC) สามารถทำลายเชื้อเริ่มต้นให้ลดลง $\geq 99.90\%$ (≥ 3 Log reduction) โดยจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่เวลา 0 นาที เท่ากับ 6.04 ± 0.12 log CFU/mL และตั้งแต่วเวลา 5 นาที เป็นต้นไปในสถานะที่มีอิมัลชัน พบว่า จำนวน *S. Typhimurium* ลดลงจากเชื้อเริ่มต้นจนต่ำกว่าระดับที่สามารถตรวจนับได้ (< 2 Log CFU/mL) (เชื้อเริ่มต้นลดลง > 4 Log) แสดงให้เห็นได้ว่าที่เวลา 5 นาที เป็นเวลาที่สั้นที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อเริ่มต้นให้ลดลงได้ $> 99.90\%$ ส่วนชุดควบคุมพบว่า จำนวนเชื้อที่เวลา 0 5 10 15 และ 20 นาที เกือบเคียงกัน ซึ่งมีเชื้อ ~ 6 log CFU/mL ดังตารางที่ 1



ภาพที่ 1 ลักษณะของน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปแบบอิมัลชัน

ตารางที่ 1 จำนวน *S. Typhimurium* หลังสัมผัสกับสารทดสอบที่เวลาต่างๆ

เวลาที่เชื้อสัมผัส สารทดสอบ (นาที)	จำนวนเชื้อ (Log CFU/ml $\pm$ S.D.)	
	ชุดควบคุม	น้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปแบบอิมัลชัน
0	6.10 ± 0.07	6.04 ± 0.12
5	6.07 ± 0.15	$< 2.00 \pm 0.00^*$
10	6.03 ± 0.18	$< 2.00 \pm 0.00^*$
15	5.92 ± 0.24	$< 2.00 \pm 0.00^*$
20	6.03 ± 0.21	$< 2.00 \pm 0.00^*$

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มี Tween 80 ความเข้มข้น 0.05%

* หมายถึง ทุกความเจือจางไม่พบโคโลนีเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงรายงานผลเป็น < 2 Log CFU/ml ตาม Limit detection ของวิธี Spread plate

4. ประสิทธิภาพของอิมัลชันในการลดจำนวน *S. Typhimurium* ที่ใส่ลงบนใบโหระพา

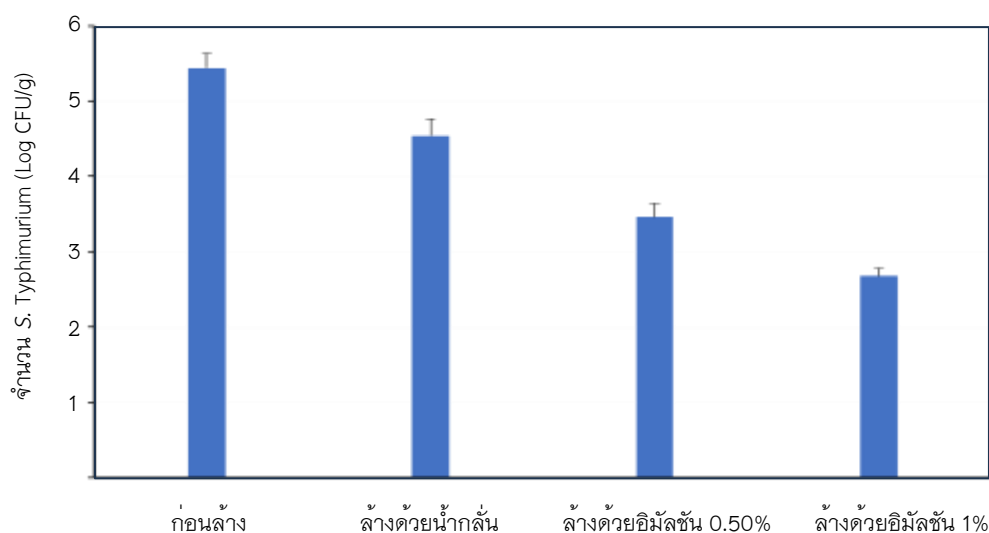
ใบโหระพามีจำนวน *S. Typhimurium* ปนเปื้อนอยู่เท่ากับ 5.44 ± 0.19 Log CFU/g ดังภาพที่ 2 เมื่อนำใบโหระพาที่ใส่เชื้อแล้วมาล้างด้วยการแช่ในสารละลายทดสอบ เป็นเวลา 5 นาที (ผลจาก Time-kill) พบว่า การล้างด้วยน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปแบบอิมัลชันที่ความเข้มข้น

0.50% และ 1% มีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตบนใบโหระพาเท่ากับ 3.46 ± 0.18 และ 2.68 ± 0.10 Log CFU/g ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุม มีจำนวนเชื้อรอดชีวิต เท่ากับ 4.54 ± 0.22 Log CFU/g

เมื่อวิเคราะห์จำนวน *S. Typhimurium* ที่ลดลงจากเชื้อเริ่มต้นบนใบโหระพาล้างล้างด้วยชุดควบคุม และอิมัลชันที่มีความเข้มข้น 0.50% และ 1% พบว่า เท่ากับ 0.90 ± 0.09 1.98 ± 0.20 และ 2.76 ± 0.29 Log CFU/g ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ พบว่า จำนวนเชื้อที่ลดลงจากเชื้อเริ่มต้นบนใบโหระพาล้างล้างด้วยน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันทั้งสองความเข้มข้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่า การล้างใบโหระพาดด้วยน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันความเข้มข้น 1% (2xMIC) สามารถลดเชื้อที่เกาะบนใบผักได้มากที่สุด และความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับความเข้มข้น 0.50% (1xMIC) ดังตารางที่ 2

5. การเปลี่ยนแปลงของสีใบโหระพา

ตารางที่ 3 แสดงผลการวัดสี (ค่า $L^* a^* b^*$) ของใบโหระพาที่ยังไม่ผ่านการล้าง (ชุดควบคุม) และผ่านการล้างด้วยน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันทั้งสองความเข้มข้น ซึ่งพบว่า สีใบโหระพาที่ไม่ผ่านและผ่านการล้างด้วยสารทดสอบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) และยังพบว่า ความแตกต่างของสีโดยรวมเทียบกับชุดควบคุม (ค่า ΔE) ของใบโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยอิมัลชันและล้างน้ำกลั่นปราศจากเชื้อไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$)



ภาพที่ 2 กราฟแท่งแสดงจำนวน *S. Typhimurium* ที่รอดชีวิตบนใบโหระพา

ตารางที่ 2 จำนวน *S. Typhimurium* ที่ลดลงจากเชื้อเริ่มต้นที่ใส่ลงบนใบโหระพา

ชุดทดสอบ	จำนวนเชื้อที่ลดลงจากเชื้อเริ่มต้น (Log CFU/g±S.D.)
ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อผสม Tween 80	
ความเข้มข้น 0.05% (ชุดควบคุม)	0.90±0.09 ^A
ล้างด้วยน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชัน	
ความเข้มข้น 0.50% (1xMIC)	1.98±0.20 ^B
ล้างด้วยน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชัน	
ความเข้มข้น 1% (2xMIC)	2.76±0.29 ^C

หมายเหตุ ^{A-C} หมายถึง ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ไม่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าข้อมูลมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 3 ค่า L^* , a^* , b^* และค่าการเปลี่ยนแปลงสี (ΔE) ของใบโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารทดสอบ

ชุดทดสอบ	ค่าสี			
	L^*	a^*	b^*	ΔE
ใบโหระพาที่นำปาล้าง	34.60±1.08 ^A	-12.34±0.79 ^A	16.34±1.14 ^A	-
ใบโหระพาที่ผ่านการล้างด้วย น้ำกลั่น (ชุดควบคุม) เป็นเวลา 5 นาที	35.12±0.87 ^A	-11.55±0.88 ^A	16.87±0.69 ^A	1.16±0.87 ^A
ใบโหระพาที่ผ่านการล้างด้วย อิมัลชัน 0.50% (1xMIC) เป็น เวลา 5 นาที	35.20±0.94 ^A	-13.02±1.33 ^A	16.99±1.03 ^A	1.24±1.02 ^A
ใบโหระพาที่ผ่านการล้างด้วย อิมัลชัน 1% (2xMIC) เป็นเวลา 5 นาที	35.31±0.73 ^A	-12.99±1.04 ^A	17.05±0.65 ^A	1.33±0.96 ^A

หมายเหตุ ^A หมายถึง ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าข้อมูลไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

อภิปรายผล

การนำน้ำมันหอมระเหยมาทำให้อยู่ในรูปอิมัลชันเป็นการแก้ปัญหาการไม่ละลายน้ำของน้ำมันหอมระเหย โดยใช้สาร Emulsifier เป็นตัวผสมให้มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน อีกทั้งยังช่วยเพิ่มความคงตัวและการกระจายตัวของน้ำมันหอมระเหย (Prakash & Kiran, 2016) จึงทำให้สามารถนำอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยไปประยุกต์ในด้านต่างๆ ได้ เช่น เป็นสารล้างทำความสะอาดผักและผลไม้สด และเป็นสารกันเสียในอาหารชนิดต่างๆ เป็นต้น งานวิจัยนี้ได้นำ

น้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดมาทำให้อยู่ในรูปอิมัลชันโดยใช้ Tween 80 เป็น Emulsifier ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ (Non-ionic) และไม่เป็นพิษ (Non-toxic) (Moradi & Barati, 2019) รวมทั้งมีราคาถูก หาซื้อได้ง่าย และได้รับการยอมรับโดยทั่วไปว่าปลอดภัยในอาหาร นอกจากนี้ Tween 80 ยังมีค่า Hydrophilic lipophilic balance; HLB เท่ากับ 15 จึงเหมาะสมในการใช้เป็นสารล้างทำความสะอาด (detergent) (Ghosh, Mukherjee & Chandrasekaran, 2013)

ผลการหาค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันต่อ *S. Typhimurium* แสดงให้เห็นว่าอิมัลชันนี้มีฤทธิ์ต้าน *S. Typhimurium* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.50% ซึ่งใกล้เคียงกับค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยมะกรูดบริสุทธิ์ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (MIC ต่อ *S. Typhimurium* = 0.60%) (Srisukh et al., 2012a) เมื่อพิจารณาค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชัน พบว่า มีค่าเท่ากัน แสดงว่าออกฤทธิ์แบบทำลาย (Bactericidal activity) ต่อ *S. Typhimurium* ซึ่งหากสารทดสอบมีค่า MBC/MIC น้อยกว่า 4 เท่า แสดงว่า ออกฤทธิ์แบบทำลายเชื้อ (Bactericidal activity) แต่หากค่า MBC/MIC มากกว่า 4 เท่า แสดงว่า ออกฤทธิ์แบบยับยั้งเชื้อ (Bacteriostatic activity) (Pankey & Sabath, 2004)

ผลการทดสอบ Time-kill ของการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันมีฤทธิ์แบบทำลาย (Bactericidal activity) ต่อ *S. Typhimurium* เนื่องจากสามารถลดจำนวนเชื้อเริ่มต้น >99.90% (>3 log reduction) (CLSI, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่า MBC/MIC

สาเหตุที่น้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันสามารถต้าน *S. Typhimurium* ได้เนื่องจากในน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดมีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ l-limonene, α -terpineol, 2- β -pinene, terpinene-4-ol, γ -terpinene, α -terpinene และ α -terpinolene (Srisukh et al., 2012a; 2012b) ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ โดยมีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ limonene, α -terpineol และ β -pinene พบว่า จะไปมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย โดยจะเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane permeability) ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารออกจากเซลล์และยับยั้งการสร้างพลังงานของเซลล์แบคทีเรีย (Han, Sun & Chen, 2020; Yang et al., 2023) ส่วน terpinene-4-ol, γ -terpinene, α -terpinene และ α -terpinolene จะไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียทำให้เซลล์ขาดพลังงานและตาย (Li et al., 2014; Oyedemi et al., 2009)

จากการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการทำลาย *S. Typhimurium* ในบัฟเฟอร์ (0.10% PW) จากผลการทดสอบ Time-kill กับ การทดสอบบนใบโหระพาในขั้นตอนการล้าง พบว่า น้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชัน (0.50%) มีประสิทธิภาพในการทำลาย *S. Typhimurium* ในบัฟเฟอร์ (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6.04 ± 0.12 log CFU/mL เหลือ $< 2.00 \pm 0.00$ log CFU/mL) ได้ดีกว่าการทดสอบ

บนใบโหระพาในขั้นตอนการล้าง (เชื้อเริ่มต้น $5.44 \pm 0.19 \log \text{CFU/g}$ เหลือ $3.44 \pm 0.18 \log \text{CFU/g}$) ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นผลมาจากพื้นผิวของใบโหระพามีผลทำให้น้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันไม่สามารถเข้าถึงพื้นที่ผิวผักที่มีเชื้อเกาะอยู่ได้ (Kang & Kang, 2017) ผลการทดลองนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการล้างใบโหระพาด้วยอิมัลชันไม่มีผลต่อสีของใบโหระพา ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยอบเชย ซึ่งสีของใบโหระพาไม่มีความแตกต่างจากใบโหระพาที่ไม่ได้ล้างด้วยสารทดสอบ (Park et al., 2017; 2018)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันในการลดจำนวน *S. Typhimurium* ที่ใส่ลงบนใบโหระพากับงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า น้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชัน ความเข้มข้น 0.50% (Tween 80 เป็น Emulsifier) มีประสิทธิภาพในการลดจำนวน *S. Typhimurium* บนใบโหระพาลงได้ $1.98 \pm 0.02 \log \text{CFU/g}$ ซึ่งต่ำกว่าน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกและใบอบเชยในรูปอิมัลชัน (Cetylpyridinium chloride เป็น Emulsifier) ความเข้มข้น 0.05% ซึ่งสามารถลดจำนวน *S. Typhimurium* บนใบโหระพาได้ 2.71 และ 2.82 Log CFU/g ตามลำดับ (Park, Kang & Song, 2017) และยังมีรายงานพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบอบเชยในรูปอิมัลชันที่ใช้ Cetylpyridinium chloride เป็น Emulsifier สามารถลดจำนวน *S. Typhimurium* บนใบโหระพาได้สูงกว่าอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดียวกันที่ใช้ Tween 80 เป็น Emulsifier (Park, Kang & Song, 2017) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าปัจจัยน่าจะมีผลทำให้น้ำมันหอมระเหยจากพืชแต่ละชนิดในรูปอิมัลชันมีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียแตกต่างกัน ได้แก่ ชนิดของน้ำมันหอมระเหย สาร Emulsifier ที่ใช้ และความเข้มข้นของสาร (Kang & Kang, 2017; Kang & Song, 2019)

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันมีประสิทธิภาพในการต้าน *S. Typhimurium* ในหลอดทดลองและสามารถลดปริมาณ *S. Typhimurium* บนใบโหระพาดังนั้นการล้างผักด้วยอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจในการนำไปล้างผักสด อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยทดสอบประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อก่อโรคอื่นๆ ที่มักพบในผักสดหรือผลไม้ รวมถึงควรมีวิเคราะห์ลักษณะทางเคมีฟิสิกส์ (Physicochemical characteristics) ของน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันที่เตรียมได้ เช่น ขนาดอนุภาคและการกระจายตัวของอนุภาค เป็นต้น

สรุปผลการวิจัย

ค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันต่อ *S. Typhimurium* มีค่าเท่ากัน คือ 0.50% เวลาที่สั้นที่สุดของอิมัลชัน 0.50% ที่สามารถทำลายเชื้อเริ่มต้นให้ลดลงได้ 99.9% (Time-kill) คือ 5 นาที เมื่อนำใบโหระพาที่ใส่เชื้อแล้วไปล้างด้วยน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปอิมัลชันความเข้มข้น 0.50% (1xMIC) 1% (2xMIC) และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ด้วย

การแช่เป็นเวลา 5 นาที พบว่า สามารถลดจำนวน *S. Typhimurium* บนใบโหระพาสดได้ 1.98 ± 0.20 2.76 ± 0.29 และ 0.90 ± 0.09 Log CFU/g ตามลำดับ โดยอิมัลชันความเข้มข้น 0.50% และ 1% มีประสิทธิภาพในการลดจำนวน *S. Typhimurium* ที่ใส่ลงบนใบโหระพาได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และอิมัลชันความเข้มข้น 1% มีประสิทธิภาพสูงกว่า 0.50% ($1 \times \text{MIC}$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังไม่มีผลต่อสีของใบโหระพา ($P > 0.05$) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยผิวมะกรูดในรูปแบบอิมัลชันซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติที่ไม่มีผลเสียกับสิ่งแวดล้อมและเตรียมได้จากวัสดุเหลือใช้จากพืชผลทางการเกษตร อาจสามารถใช้เป็นผลิตภัณฑ์สำหรับลดจำนวนเชื้อที่ปนเปื้อนในผักสดที่จะช่วยสร้างความปลอดภัยให้ผู้บริโภค รวมถึงยืดอายุการเก็บรักษาและคุณภาพทางโภชนาการของผักสดได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ทุนสนับสนุน

เอกสารอ้างอิง

- Alegbeleye, O.O., Singleton, I., & Sant'Ana, A.S. (2018). Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. **Food Microbiology**, **73**, 177–208.
- Chung, C.C., Huang, T.C., Yu, C.H., Shen, F.Y., & Chen, H.H. (2011). Bactericidal effects of fresh-cut vegetables and fruits after subsequent washing with chlorine dioxide. **International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering**, **9**, 107–112.
- Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). (1999). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents, **Approved Guideline (M26–A)**, **19**(18), 1–14.
- Clinical & Laboratory Standards Institute; CLSI. (2012). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. **Approved Standard–Ninth Edition (M07–A9)**, **32**(2), 1–88.
- Fu, T.J., Reineke, K.F., Chirtel, S., & Vanpelt, O.M. (2008). Factors influencing the growth of *Salmonella* during sprouting of naturally contaminated alfalfa seeds. **Journal of food protection**, **71**(5), 888–896.
- Ghosh, V., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2013). Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, **20**, 338–344.
- Goodburn, C., & Wallace, C.A. (2013) The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: a review. **Food Control**, **32**, 418–427.
- Han, Y., Sun, Z., & Chen, W. (2020). Antimicrobial susceptibility and antibacterial mechanism of Limonene against *Listeria monocytogenes*. **Molecules**, **25**(1), 33.

- Kang, J.H., & Song, K.B. (2018). Inhibitory effect of plant essential oil nanoemulsions against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* Typhimurium on red mustard leaves. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, **45**, 447–454.
- Kang, J.H., Park, S.J., Park, J.B., & Song, K.B. (2019). Surfactant type affects the washing effect of cinnamon leaf essential oil emulsion on kale leaves. **Food Chemistry**, **271**, 122–128.
- Kang, J.W., & Kang, D.H. (2017). Antimicrobial efficacy of vacuum impregnation washing with malic acid applied to whole paprika, carrots, king oyster mushrooms and muskmelons. **Food Control**, **82**, 126–135.
- Li, L., Shi, C., Yin, Z. Jia, R. Peng, L., Kang, S., & Li, Z. (2014). Antibacterial activity of α -terpineol may induce morpho structural alterations in *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, **45**(4), 1409–1413.
- Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A., & McClements, D.J. (2016). Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. **Food Chemistry**, **194**, 410–415.
- Moradi, S., & Barati, A. (2019). Essential oils nanoemulsions: Preparation characterization and study of antibacterial activity against *Escherichia coli*. **International Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, **15**(3), 199–210.
- Niyomdech, N., Mungkornkaew, N., & Samosornsuk, W. (2016). Serotypes and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* isolated from pork, chicken meat and lettuce, Bangkok and Central Thailand. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, **47**(1), 31–39.
- Orue, N., García, S., Feng, P., & Heredia, N. (2013). Decontamination of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* O157:H7 from leafy green vegetables using edible plant extracts. **Journal of Food Science**, **78**(2), M290–M296.
- Oyedemi, S.O., Okoh, A.I., Mabinya, L.V., Pirochenva, G., & Afolayan, A.J. (2009). The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and g-terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. **African Journal of Biotechnology**, **8**(7), 1280–1286.
- Pankey, A.G., & Sabath, L.D. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanism of action in the treatment of gram-positive bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, **38**(6), 864–870.
- Park, J.B., Kang, J.H., & Song, K.B. (2017). Antibacterial activities of a cinnamon essential oil with cetylpyridinium chloride emulsion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in basil leaves. **Food Science Biotechnology**, **27**(1), 47–55.
- Park, J.B., Kang, J.H., & Song, K.B. (2018). Geranium essential oil emulsion containing benzalkonium chloride as a wash solution on fresh-cut vegetables. **Food and Bioprocess Technology**, **11**(12), 2164–2171.

- Plumb, I., Fields, P., & Bruce, B. (2024). **Salmonellosis, Nontyphoidal**. **CDC Yellow Book 2024**. Retrieved October, 12, 2024, from <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/infections-diseases/salmonellosis-nontyphoidal>
- Prakash, B., & Kiran, S. (2016). Essential oils: a traditionally realized natural resource for food preservation. **Current Science**, **110**, 1890–1892.
- Sreepian, A., Sreepian, P.M., Chanthong, C., Mingkhwancheep, T., & Prathit, P. (2019). Antibacterial activity of essential oil extracted from *Citrus hystrix* (Kaffir Lime) peels: An in vitro study. **Tropical Biomedicine**, **36**(2), 531–541.
- Srisukh, V., Bunyaphrathatsara, N., Pongpan, A., Tungrugsasut, W., Puttipipatkachorn, S., Oniam, W., Karawamitr, T., Bunsiriluk, S., & Thongbainoi, W. (2012a). Fresh produce antibacterial rinse from kaffir lime oil. **Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences**, **39**(2), 15–27.
- Srisukh, V., Tribuddharat, C., Nukoolkarn, V., Bunyaphrathatsara, N., Chokephaibulkit, K., Phoomniyom, S., Chuanphung, S., & Srifuengfong, S. (2012b). Antibacterial activity of essential oils from *Citrus hystrix* (makrut lime) against respiratory tract pathogens. **ScienceAsia**, **38**, 212–217.
- Yang, X., Zhao, S., Deng, Y., Xu, W., Wang, Z. Wang, W., Lu, R., & Liu, D. (2023). Antibacterial activity and mechanisms of α -terpineol against foodborne pathogenic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **107**, 6641–6653.
- Vugia, D.J., Samuel, M., Farley, M.M., Marcus, R., Shiferaw, B., Shallow, K., & Angulo, F.J. (2004). Invasive *Salmonella* infections in United States, Food Net, 1996–1999: incidence, serotype distribution, and outcome. **Clinical Infectious Diseases**, **38**, S149–S156.