สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์โดยการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรา

Microbial Decontamination on Meat using Sweet Basil (*Ocimum basillum*) and Holy Basil (*Ocimum sanctum*)

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คมแข พิลาสมบัติ

นางอังคณา ทุมดี

ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2553

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
TX
556
.M4
ค146ก
เลขหมู่.....
131218
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี 26 พค 2557

b.12597202
i.....

รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการ

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์โดยการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรา

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) Microbial Decontamination on Meat using Sweet Basil (*Ocimum basilllum*) and Holy Basil (*Ocimum sanctum*)

ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2553 /

จำนวนเงิน 100,000 บาท

ระยะเวลาการทำวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2552 ถึง 30 กันยายน 2553

1) หัวหน้าโครงการวิจัย : สัดส่วนที่ทำวิจัย 50%

ผศ.ดร. คมแข พิลาสมบัติ

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ถ.ฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520 โทร. 02-7373000 ต่อ 3666

บทบาทในการทำวิจัย : ดูภาพรวมของการทำการวิจัยทั้งหมดและศึกษาความสามารถของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพด้านกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด

2) หัวหน้าโครงการวิจัย : สัดส่วนที่ทำวิจัย 50%

นางอังคณา ทุมดี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ถ.ฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

โทร. 02-7373000 ต่อ 3666

บทบาทในการทำวิจัย : ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาและกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ และความสามารถของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และคุณภาพด้านกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาและกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค จุลินทรีย์ทำให้เน่าเสีย จุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียแลกติก จำนวน 16 สายพันธุ์ และการยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อสันนอกสุกรบด โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ 1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาและกระเพราในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (*In vitro*) ส่วนที่ 2 ศึกษาความสามารถของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรา ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และคุณภาพด้านกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด ผลการศึกษามีดังนี้

ส่วนที่ 1 (In vitro) จากการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรา ที่แปรปริมาตรน้ำมันหอมระเหย 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 16 สายพันธุ์ โดยวิธีแพร่ผ่านกระดาษกรอง (Disc diffusion method) พบว่า ที่ปริมาตร 20 ไมโครลิตร สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทุกกลุ่มและทุกปริมาตรได้สูงที่สุด โดยน้ำมันหอมระเหยโหระพาสามารถยับยั้ง *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR 942 ได้ที่สุด และไม่พบจุลินทรีย์ทดสอบเจริญในจานเพาะเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 45 มิลลิเมตร ส่วนน้ำมันหอมระเหยกระเพรายับยั้ง *L. sakei* TISTR 890 ได้ดีที่สุด จากนั้นเมื่อศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC) และ ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราต่อการทำลายจุลินทรีย์ (MBC) พบว่าอยู่ในช่วง 625 – 2,500 ppm. และ 312.5 – 2,500 ppm. ตามลำดับ สำหรับน้ำมันหอมระเหยโหระพา ส่วนน้ำมันหอมระเหยกระเพรามีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 625 – 5,000 ppm. ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อทดสอบ

ส่วนที่ 2 แบ่งเป็น 3 ชุดการทดสอบ ได้แก่ ชุดควบคุม ชุดที่ใช้กระดาษกรองที่หยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรา ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จำนวน 1 แผ่น และ ใช้กระดาษกรอง 2 แผ่น หยดน้ำมันหอมระเหยแผ่นละ 10 ไมโครลิตร ติดไว้บริเวณฝากล่องพลาสติกบรรจุเนื้อสันนอกสุกรบดเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0, 1, 3 และ 5 วัน ทำการศึกษาคุณภาพด้านจุลินทรีย์ พบว่า น้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราไม่มีผลต่อ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ จำนวนเชื้อราและยีสต์ จำนวนโคลิฟอร์ม

(Coliform) อีโคไล (*E. coli*) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้ศึกษาคุณภาพด้านกายภาพ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำระหว่างการเก็บรักษา พบความแตกต่างระหว่างชุดควบคุม กับชุดที่ใช้กระดาษกรองที่หยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราจำนวน 1 และ 2 แผ่น ส่วนค่าสีได้แก่ ค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และ ค่าสีเหลือง (b*) ของเนื้อสันนอกสุกรบด มีค่าไม่แตกต่างจากชุดควบคุมตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 5 วัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์โดยการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรา ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2553 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งคณะวิจัยขอขอบพระคุณแหล่งทุนที่ให้โอกาสในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมงที่อนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือตลอดการดำเนินการวิจัย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จำรูญ เล้าสินวัฒนา ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สาขาวิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่อนุเคราะห์น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดลอง

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณผู้ร่วมงานทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวถึงอีกมากที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี และผู้วิจัยหวังว่างานวิจัยฉบับนี้คงเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจและนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อ		I
กิตติกรรมประกาศ		III
สารบัญ		IV
สารบัญตาราง		VIII
สารบัญภาพ		XI
บทที่ 1	บทนำ	1
	1.1 ความสำคัญและที่มา	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับของการวิจัย	2
	1.4 สถานที่ทำการทดลอง	2
	1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
บทที่ 2	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
	2.1 จุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์	3
	2.2 การเน่าเสียของเนื้อสัตว์	4
	2.3 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่มักพบปนเปื้อนในเนื้อสัตว์	6
	2.4 คุณลักษณะที่กำหนดคุณภาพเนื้อ	7
	2.5 การใช้น้ำมันหอมระเหยจากโหระพา และกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์	9
	2.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารทดสอบในการยับยั้งจุลินทรีย์	12
บทที่ 3	วิธีดำเนินงานวิจัย	14
	3.1 น้ำมันหอมระเหย	14
	3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานทดลอง	14
	3.3 ตัวอย่างเนื้อทดลอง	15
	3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ	15
	3.5 อุปกรณ์และเครื่องมือ	15

		หน้า
	3.6 สถานที่ทำการทดลอง	16
	3.7 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง	16
	3.8 วิธีการทดลอง	16
	ส่วนที่ 1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาและกระเพราในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ	16
	ส่วนที่ 2 ศึกษาความสามารถของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพด้านกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด	18
	3.9 ขั้นตอนการศึกษาและการเก็บข้อมูล	19
	3.9.1 การศึกษาทางด้านจุลินทรีย์	19
	3.9.2 การศึกษาคุณภาพทางด้านกายภาพของเนื้อสุกร	22
	3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	22
บทที่ 4	ผลการทดลอง	23
	ส่วนที่ 1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาและกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (*In vitro*)	23
	การทดลองที่ 1.1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์	23
	1.1.1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธีแพร่ผ่านแผ่นกระดาษกรอง (Disc diffusion method)	23
	1.1.2 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพาต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (minimal inhibition concentration ; MIC) ด้วยวิธี micro-dilution broth susceptibility assay	26
	1.1.3 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพาต่อการทำลายจุลินทรีย์ (minimal bactericidal concentration ; MBC) ด้วยวิธี micro-dilution broth susceptibility assay	28
	การทดลองที่ 1.2 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ (*In vitro*)	30

		หน้า
	1.2.1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยวิธีแพร่ผ่านแผ่นกระดาษกรอง.....	30
	1.2.2 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยกระเพราต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ minimal inhibition concentration (MIC) ด้วยวิธี micro-dilution broth susceptibility assay..... .	32
	1.2.3 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยกระเพราต่อการทำลายจุลินทรีย์ (minimal bactericidal concentration ; MBC) ด้วยวิธี micro-dilution broth susceptibility assay.....	24
	ส่วนที่ 2 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราที่มีต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพทางกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด.....	36
	การทดลองที่ 2.1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพา ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพทางกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด	36
	การทดลองที่ 2.2 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยกระเพราที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพทางกายภาพของเนื้อสุกรบด	43
บทที่ 5	วิจารณ์ผลการทดลอง.....	51
	ส่วนที่ 1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาและกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ (*In vitro*).....	51
	การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ (*In vitro*).....	51
	การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ (*In vitro*).....	52

หน้า

ส่วนที่ 2 ศึกษาความสามารถของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพด้านกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด..... 54

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง..... 57

บรรณานุกรม..... 59

ภาคผนวก..... 66

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สายพันธุ์จุลินทรีย์ทดสอบและสภาวะการเจริญเติบโต.....	14
2	การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli*.....	21
3	ผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพาที่ปริมาตรต่างๆ ในการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method.....	24
4	ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพาต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ.....	27
5	ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพาต่อการทำลายจุลินทรีย์...	29
6	ผลของน้ำมันหอมระเหยกระเพราที่ปริมาตรต่างๆ ในการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion Method.....	31
7	ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยกระเพราต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์.....	33
8	ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยกระเพราต่อการทำลายจุลินทรีย์.....	35
9	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของเนื้อสันนอกสุกรบด.....	37
10	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำของเนื้อสันนอกสุกรบด.....	38
11	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวนราและยีสต์ของเนื้อสันนอกสุกรบด.....	38
12	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวนโคลิฟอร์มของเนื้อสันนอกสุกรบด.....	39
13	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวน *E. coli* ของเนื้อสันนอกสุกรบด.....	39
14	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าความเป็นกรดด่างของเนื้อสันนอกสุกรบด.....	40
15	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาการเก็บรักษาต่ออัตราการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างของเนื้อสันนอกสุกรบด.....	41
16	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อค่าเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษาของเนื้อสันนอกสุกรบด	41

ตารางที่		หน้า
17	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าความสว่าง (L*) ของเนื้อสันนอกสุกรบด.....	42
18	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าสีแดง (Redness, a*) ของเนื้อสันนอกสุกรบด	43
19	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าสีเหลือง (yellowness, b*) ของเนื้อสันนอกสุกรบด.....	43
20	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยกระเพราและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของเนื้อสันนอกสุกรบด.....	44
21	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยกระเพราและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำของเนื้อสันนอกสุกรบด.....	45
22	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวนราและยีสต์ของเนื้อสันนอกสุกรบด.....	45
23	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยกระเพราและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวนโคลิฟอร์มของเนื้อสันนอกสุกรบด.....	46
24	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยกระเพราและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวน *E.coli* ของเนื้อสันนอกสุกรบด.....	46
25	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าความเป็นกรดด่างของเนื้อสันนอกสุกรบด.....	47
26	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยกระเพราและระยะเวลาการเก็บรักษาต่ออัตราการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างของเนื้อสันนอกสุกรบด	48
27	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษาของเนื้อสันนอกสุกรบด.....	48
28	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าความสว่าง (L*) ของเนื้อสันนอกสุกรบด	49

ตารางที่		หน้า
29	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าสีแดง (Redness, a*) ของเนื้อสันนอกสุกรบด	50
30	ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าสีเหลือง (yellowness, b*) ของเนื้อสันนอกสุกรบด	50

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โหระพา.....	9
2	กระเพรา.....	11
3	การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบและความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อทดสอบ.....	13
4	วิธีการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีแพร่ผ่านกระดาษกรอง.....	17
5	Most probable numbers (MPN) per 1 g. test portion, using 3 tubes.....	67

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

ปัจจุบันเนื้อสัตว์นับว่าเป็นอาหารประเภทโปรตีนที่สำคัญสำหรับมนุษย์ สำหรับประเทศไทยพบว่ามีปริมาณการบริโภคเนื้อสัตว์สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (ธำรงค์ เมฆโหรา และ พงศ์ศักดิ์ ศรีธเนศชัย. 2549) อย่างไรก็ตามปัญหาที่ผ่านมาที่มักพบอยู่เสมอคือ การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์ซึ่งนับว่าเป็นปัญหาสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศไทยที่มีสภาพอากาศร้อนชื้น เหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนเนื้อสัตว์ (Ockerman *et al.* 2001) อีกทั้งเนื้อสัตว์ยังเป็นอาหารที่เหมาะแก่การเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากมีน้ำและสารอาหารหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ (Rao *et al.* 1998) การปนเปื้อนดังกล่าวส่งผลกระทบหลายด้านดังต่อไปนี้

1. ด้านการส่งออกโดยประเทศคู่ค้าไม่ยอมรับสินค้าที่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้เกิดความเสียหายทางด้านเศรษฐกิจ (อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และคณะ. 2536)

2. ผู้บริโภคเกิดเจ็บป่วยเนื่องจากการบริโภคเนื้อสัตว์เหล่านั้น โดยโรคที่สำคัญและมักเกิดกับผู้ที่บริโภคเนื้อสัตว์คือโรคอาหารเป็นพิษ (Pearson and Dutson. 1986 ; Rao *et al.* 1998) เชื้อที่สำคัญที่ทำให้เกิดอาการดังกล่าวได้แก่ *Salmonella* sp., *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *E.coli* และ *Listeria monocytogenese*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* และ *Bacillus cereus* (Pearson and Dutson. 1986; Warriss. 2000; Borch and Arinder. 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่นับว่ามีอันตรายต่อมนุษย์ที่มักปนเปื้อนบนเนื้อสัตว์ ได้แก่ *E. coli* O157:H7 (Nissen *et al.* 2001) โดยเฉพาะเชื้อ *E. coli* O157:H7 เป็นสาเหตุทำให้ผู้บริโภคมีอาการป่วยที่รุนแรงและตายได้ในที่สุด ถ้าหากบริโภคเนื้อสัตว์ที่ปนเปื้อนเชื้อในขณะที่ยังปรุงไม่สุก บางครั้งพบว่าเชื้อสามารถสร้างสารพิษได้มากกว่าหนึ่งชนิด เช่น verotoxin หรือ shiga-like toxin และปริมาณเชื้อที่บริโภคเข้าไปต่ำกว่า 10 เซลล์ก็สามารถทำให้เกิดโรคได้

3. การเน่าเสียของเนื้อสัตว์ เนื่องจากเนื้อสัตว์เป็นอาหารที่มีองค์ประกอบที่เหมาะต่อการเจริญของอาหารและมักพบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังกระบวนการฆ่าสัตว์ ซึ่งเชื้อที่ปนเปื้อนเหล่านี้สามารถเพิ่มจำนวนในระหว่างการเก็บรักษาในห้องเย็น เป็นสาเหตุทำให้เนื้อเน่าเสีย เนื้อสัตว์ที่เน่าเสียหมายถึงเนื้อสัตว์ที่มีกลิ่น สีและรสชาติที่ผิดปกติ เนื่องจากจุลินทรีย์สร้างสารประกอบบางชนิดขึ้นมาระหว่างเจริญบนเนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์เป็นอาหารที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์สูง เนื่องจากจุลินทรีย์มีอยู่ตามธรรมชาติ ดิน น้ำ อากาศ รวมถึงจากตัวสัตว์เอง ดังนั้นการปนเปื้อนจึงเกิดได้ในทุกขั้นตอน

ตั้งแต่อยู่ในฟาร์ม ขนส่ง และกระบวนการฆ่าในโรงฆ่าสัตว์ (Smulders and VanLaack. 1992) ซึ่งในปัจจุบันผู้บริโภคสนใจในสุขภาพมากขึ้น โดยมักหลีกเลี่ยงการบริโภคอาหารที่มีสารเคมีเป็นส่วนประกอบ ซึ่งวิธีการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์โดยการใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชเป็นทางเลือกในการลดการใช้สารเคมีเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนเนื้อสัตว์เพื่อรักษาคุณภาพ ยืดอายุในการเก็บรักษา เพื่อเพิ่มมูลค่าการผลิตและเพิ่มความปลอดภัยในการบริโภค ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการนำน้ำมันหอมระเหยจากพืช ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากโหระพาและกระเพรา ซึ่งเป็นพืชที่พบทั่วไปในประเทศไทยมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และยืดอายุการเก็บรักษา ซึ่งจะทำให้ผู้บริโภคมั่นใจในการบริโภค

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาและกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค จุลินทรีย์ทำให้เน่าเสียและจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียแลกติก
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของจากน้ำมันหอมโหระพาและกระเพราในการยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อสุกร

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับของโครงการวิจัย

1. สามารถนำน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรามาใช้ยับยั้งการเจริญและทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนเนื้อสัตว์ เพื่อรักษาคุณภาพยืดอายุในการเก็บรักษาและเพิ่มควาปลอดภัยในการบริโภค
2. ลดการใช้สารเคมีชนิดอื่นที่ใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเป็นการลดการนำเข้าสารเคมีจากต่างประเทศ

1.4 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาปริมาตรที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค จุลินทรีย์ทำให้เน่าเสียและจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียแลกติก แล้วนำมาศึกษาปริมาณต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราต่อการยับยั้งและทำลายการเจริญของจุลินทรีย์ จากนั้นนำมาศึกษาความสามารถของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพทางด้านกายภาพของเนื้อสุกร

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จุลินทรีย์จัดเป็นอันตรายทางชีวภาพที่สำคัญที่มีการปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ เนื่องจากเนื้อสัตว์เป็นอาหารที่มีโปรตีนสูง และมีค่าความชื้น (water activity) เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคหลายชนิด การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์สามารถเกิดขึ้นได้ในทุกขั้นตอนของการผลิตสัตว์และการผลิตเนื้อสัตว์ โดยการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์สามารถพบได้ตั้งแต่อยู่ในฟาร์ม การขนส่ง และกระบวนการฆ่าในโรงฆ่าสัตว์ (Smulders and VanLaack. 1992) ซึ่งการปนเปื้อนในกระบวนการฆ่าอาจมาจากเครื่องมืออุปกรณ์หรือภาชนะ การสัมผัสของผู้ปฏิบัติงานและการสัมผัสระหว่างผิวซาก (Huffman. 2002; Pipek *et al.* 2005; Pipek *et al.* 2006) กระทั่งสภาพแวดล้อมภายของโรงฆ่าสัตว์ก็มีส่วนในการปนเปื้อน (Pipek *et al.* 2005; Pipek *et al.* 2006) ดังนั้นการป้องกันและควบคุมการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จึงเป็นสิ่งจำเป็น (Mies *et al.* 1999) เนื่องจากจุลินทรีย์มีอยู่ตามธรรมชาติ ทั้งในดิน น้ำ รวมถึงจากตัวสัตว์เอง

2.1 จุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์

จุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์ สามารถแบ่งได้เป็นประเภทต่างๆตามความสำคัญได้ดังนี้

2.1.1 จุลินทรีย์ก่อให้เกิดโรค (Pathogenic microorganisms) ประมาณ 1 ใน 3 ของโรคที่เกิดขึ้นมาจากการบริโภคเนื้อสัตว์ที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อยู่ ได้แก่ โรคที่เกิดจากการบริโภคเนื้อสัตว์ที่ป่วยเป็นโรคติดต่อซึ่งสามารถถ่ายทอดถึงคนได้ (zoonosis) เช่น โรค Brucellosis และ Tuberculosis เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ที่เกิดจากการบริโภคเนื้อสัตว์ที่มีเชื้อแบคทีเรียเข้าไป ซึ่งเชื้อจะไปเจริญในทางเดินอาหารและเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ ได้แก่ *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Clostridium perfingens* และ *Campylobacter* spp. และโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากการได้รับสารพิษที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ได้แก่ *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus* spp. และ *Bacillus* spp. ซึ่ง *S. aureus* เป็นแบคทีเรียสร้างสารพิษประเภทเอนเทอโรทอกซินที่มีผลต่อระบบทางเดินอาหารของผู้บริโภค *C. botulinum* เป็นแบคทีเรียสร้างสารพิษประเภทนิวโรทอกซิน (neurotoxin) ที่มีผลต่อระบบประสาท (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2542) จุลินทรีย์ในอาหารไม่เพียงทำให้อาหารเน่าเสียหรือเสื่อมคุณภาพลงเท่านั้น

จุลินทรีย์หลายชนิดทำให้เกิดโรคกับมนุษย์ โดยเฉพาะแบคทีเรีย จากบันทึกหรือรายงานการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ ปรากฏว่าแบคทีเรียเป็นตัวการสำคัญและเป็นความเสี่ยงสูงสุดที่ผู้ผลิตอาหารจะต้องกำจัดออกไปจากห่วงโซ่อาหารเป็นอันดับแรก (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545)

2.1.2 จุลินทรีย์ทำให้เกิดการเน่าเสีย (Spoilage microorganisms) เนื้อสัตว์จัดได้ว่าเป็นอาหารที่ดีที่สุดต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ทำให้เกิดการเน่าเสีย (Spoilage microorganisms) เนื้อสัตว์จัดได้ว่าเป็นอาหารที่ดีที่สุดต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนซากสัตว์ภายหลังการฆ่ามีจุดเริ่มต้นจากผิวหนังสัตว์ สำไส้ และสภาพแวดล้อมภายในโรงฆ่าสัตว์ เช่น อากาศ น้ำ อุปกรณ์ต่างๆ รวมถึงจากผู้ปฏิบัติงานเอง ดังนั้นจึงสามารถพบเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถกลายเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคหรือเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย เชื้อจุลินทรีย์ที่มักพบการปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ระหว่างการเก็บรักษา ได้แก่ *Micrococcus, Pseudomonas, Moraxella Acinetobater, Lactobacillus, Flavobacterium,* coryneforms, yeasts, Enterobacteriaceae, *Staphylococcus, Kurthia, Bacillus* และ *Brochothrix thermosphacta* (Dainty *et al.* 1983) จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนบนซากสัตว์แต่ละบริเวณจะมีจำนวนการปนเปื้อนเชื้อที่แตกต่างกันไป ตัวอย่างบริเวณที่พบว่ามีการปนเปื้อนสูง คือ หน้าอก สะโพกและคอ แต่โดยทั่วไปแล้วจะมีค่าน้อยกว่า 10^4 cfu/cm^2 (Mackey and Roberts. 1993) ซากของสัตว์ปีกมักพบการปนเปื้อนที่ค่อนข้างสูงกว่าซากโค เนื่องจากสัตว์ปีกไม่ได้เอาหนังออก (Daud *et al.* 1979)

2.2 การเน่าเสียของเนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์ที่เน่าเสีย หมายถึง เนื้อสัตว์ที่มีกลิ่น สี และรสชาติที่ผิดปกติไป เนื่องจากจุลินทรีย์สร้างสารประกอบบางชนิดขึ้นมาระหว่างเจริญบนเนื้อสัตว์ (Russo *et al.* 2006) จำนวนเชื้อที่มักพบในเนื้อสดมีค่าประมาณ 10^2 – 10^5 cfu/cm^2 แต่มีเพียงประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ที่สามารถเจริญเติบโตต่อไป โดยเชื้อเหล่านี้จะปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น การแช่เย็น (Nychas *et al.* 1998) ซึ่งเมื่อจำนวนเชื้อเพิ่มถึง 10^7 cell/cm^2 พบว่าเนื้อเริ่มมีกลิ่นเน่าเหม็น และเมื่อจำนวนเชื้อเพิ่มถึง 10^8 cell/cm^2 จะพบเมือกบริเวณผิวหน้าของเนื้อ (García-López *et al.* 1998) โดยเฉพาะที่บริเวณผิวหน้าของเนื้อสัตว์จะเน่าเสียก่อนส่วนอื่นๆ (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2542)

การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่เกิดเนื่องมาจากจุลินทรีย์เป็นสาเหตุนั้น มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง สี กลิ่น รสชาติและความนุ่มเหนียว ลักษณะการเน่าเสียของเนื้อสัตว์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท (คมแข พิลาสมบัติ. 2550ก)

1. การเน่าเสียในสภาพที่มีอากาศ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณผิวนอกของเนื้อสัตว์ในลักษณะดังนี้

1.1 การเกิดเมือกบริเวณผิวหน้า (surface slime) การเน่าเสียแบบนี้มักพบในเนื้อสัตว์แช่เย็นที่มีความชื้นสูง เกิดจากแบคทีเรียพวก *Pseudomonas, Achromobacter, Streptococcus, Leuconotoc, Bacillus, Micrococcus* และ *Lactobacillus* ส่วนการเสียของเนื้อสัตว์ที่แช่เย็นที่มีความชื้นต่ำจะพบเชื้อ *Micrococcus* และยีสต์เติบโตมาก และหากมีความชื้นต่ำมากจะพบการเสียของเนื้อสัตว์โดยเชื้อรา สำหรับเนื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจะพบเชื้อในกลุ่ม มีโซฟายล์เป็นจำนวนมาก (บุษกร อุตรถิชาติ. 2545)

1.2 การเปลี่ยนสี เกิดจากแบคทีเรียพวก *Lactobacillus* spp. และ *Leuconotoc* spp. จะสร้างสารพวกเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะทำให้ผิวของเนื้อสัตว์มีสีเขียว สีน้ำตาล หรือซีด การเกิดสีต่างๆ บนผิวหน้าของชิ้นเนื้อและผลิตภัณฑ์ เนื่องจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่สามารถสร้างรงควัตถุที่มีสีเกิดขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโต ทำให้มองเป็นจุดสีต่างๆ เช่น *Serratia marcescens* ทำให้เกิดจุดสีแดง (red spot) หรือจุดสีน้ำเงินแกมเขียว กับน้ำตาลแกมดำ เกิดจากแบคทีเรียพวก *Chromobacterium lividum*

1.3 เกิดการเรืองสี (phosphorescence) เกิดจากเชื้อ Photobacterium เจริญเติบโตบริเวณผิวเนื้อ และเกิดการเรืองสี การเสียแบบนี้จะพบได้น้อยกว่าการเสียของเนื้อแบบอื่นๆ

1.4 การมีกลิ่นรสผิดปกติ เนื้อหรือผลิตภัณฑ์จากเนื้อที่มีกลิ่นผิดปกติ เนื่องจากมีแบคทีเรียเติบโตที่ผิวหน้าและ มักเกิดขึ้นก่อนที่จะมีรสเปรี้ยวเกิดขึ้น (souring) เนื่องจากแบคทีเรียเติบโตบนเนื้อ และสร้างกรดต่างๆออกมา เช่น กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดแอซีติก (acetic acid) กรดบิวทีริก (butyric acid) และกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) เป็นต้น

1.5 การเหม็นหืน (rancidity) การเหม็นหืนเกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์จากแบคทีเรีย และปฏิกิริยาของการออกซิไดซ์ของกรดไขมันอิ่มตัว ทำให้เกิดสารที่มีกลิ่นและรสชาติที่ผิดปกติไป แบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของไขมันเป็นแบคทีเรียพวก *Pseudomonas* และ *Achromobacter*

2. การเน่าเสียในสภาพไม่มีอากาศ มักจะเป็นแบคทีเรียชนิดที่เจริญได้ทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative bacteria) หรืออาจเกิดจากแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic bacteria) ทำให้เกิดการเน่าเสียได้หลายลักษณะดังนี้

2.1 การมีรสเปรี้ยว (souring) เกิดจากการย่อยสลายสารพวกคาร์โบไฮเดรตในเนื้อของแบคทีเรียประเภทที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic bacteria) หรือแบคทีเรียชนิดที่เจริญได้ทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative bacteria) ทำให้เกิดกรดอินทรีย์ต่างๆเกิดขึ้น เช่น lactic acid, acetic acid และ propionic acid ทำให้เนื้อมี pH ลดลง และเกิดแก๊สขึ้นในเวลาเดียวกัน เนื้อสัตว์ที่บรรจุแบบสุญญากาศมักมีการเน่าเสียในลักษณะนี้มาก (บุษกร อุตรถิชาติ. 2545)

2.2 กลิ่นเหม็นเน่าของโปรตีน (putrification) เกิดขึ้นจากการย่อยสารประกอบพวกโปรตีนโดยแบคทีเรียพวก Proteus และ *C. perfrigens* ทำให้เกิดสารที่ทำให้เนื้อมีกลิ่นเหม็นเน่าขึ้นได้แก่ hydrogen sulphide, mercaptans, indole, ammonia, amine และอื่นๆ (เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์. 2536)

2.3 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่มักพบปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ (คมแข พิลาสมบัติ. 2550ก)

2.3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่มักพบปนเปื้อนในเนื้อสุกร

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มักพบปนเปื้อนในเนื้อสุกรได้แก่ *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *E. coli*, *Yersinia* sp. และ *Listeria* sp. โดยทั่วไปแล้ว *Listeria* sp. มักพบในสภาพแวดล้อมทั่วไป ซึ่งอาจปนเปื้อนมากับตัวสัตว์ที่มีชีวิต และแพร่กระจายมายังโรงฆ่าสัตว์ ทำให้เกิดการปนเปื้อนในเนื้อสุกร ส่วน *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *E. coli* และ *Yersinia* sp. พบในระบบทางเดินอาหารและอุจจาระของสัตว์ จึงสามารถแพร่กระจายมายังบริเวณผิวหนังของสุกร นอกจากนี้ยังสามารถพบ *Campylobacter* sp. บริเวณลิ้นและต่อมทอนซิลอีกด้วย โดยผลดังกล่าวทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้

2.3.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่มักพบปนเปื้อนในเนื้อโค

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มักพบปนเปื้อนในเนื้อโคได้แก่ *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *E.coli*, *Listeria* sp. และ *E. coli* O157:H7 นอกจากนี้เชื้อที่เป็นสาเหตุสำคัญทำให้เนื้อเน่าเสียที่มักพบในเนื้อโคได้แก่ แบคทีเรียกรดแลกติก, *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp. และ *Moraxella* sp. ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถปนเปื้อนในเนื้อโคได้ในระหว่างขบวนการผลิต

2.3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่มักพบปนเปื้อนในเนื้อไก่

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มักพบปนเปื้อนในเนื้อไก่ได้แก่ *Salmonella* sp. และ *Campylobacter* sp. โดยเนื้อไก่เป็นแหล่งการปนเปื้อนที่สำคัญของเชื้อ *Campylobacter* sp. และสายพันธุ์ที่พบเป็นส่วนใหญ่ในฝูงสัตว์ปีก คือ *C. jejuni* นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *Listeria monocytogenes*

สำหรับการลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์ แม้ว่าอุตสาหกรรมอาหารต่าง ๆ ได้มีความพยายามควบคุมขบวนการผลิตให้มีความปลอดภัยโดยมีการนำระบบประกันคุณภาพด้านความปลอดภัยของอาหาร เช่น GMP และ HACCP มาใช้ แต่ก็ยังพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร ดังนั้นการหาวิธีการลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์เป็นสิ่งที่จำเป็นที่ต้องนำมาปฏิบัติ

2.4 คุณลักษณะที่กำหนดคุณภาพเนื้อ (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2542)

2.4.1 คุณลักษณะทางโภชนะ (Nutritional factor)

คุณลักษณะทางโภชนะของเนื้อขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ไวตามิน และเกลือแร่ นอกจากนี้แล้วยังคำนึงถึงความเป็นประโยชน์ต่อร่างกายได้มากน้อยเพียงใด โดยจะเกี่ยวกับส่วนประกอบและสัดส่วนของกรดอะมิโนในโปรตีนของเนื้อสัตว์หรือปริมาณสัดส่วนโปรตีนต่อไขมันที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์

2.4.2 คุณลักษณะทางการบริโภค (Sensory factor)

1) สีของเนื้อ (color)

สีของเนื้อขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ เพศ อายุ ลักษณะการทำงานของกล้ามเนื้อ ปริมาณเม็ดสีในกล้ามเนื้อ (myoglobin) ปริมาณเม็ดสีในเลือด (haemolobin) หรือการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีภายในกล้ามเนื้อภายหลังจากการฆ่าสัตว์ เป็นต้น

2) กลิ่นและรสชาติ (Flavor)

เนื้อสัตว์แต่ละชนิดจะมีกลิ่นและรสชาติที่เป็นลักษณะพิเศษเฉพาะตัว ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของสารประกอบที่ทำให้เกิดกลิ่น นอกจากนี้ยังอาจมีกลิ่นผิดปกติ (off-odours) ซึ่งจะอาจเกิดขึ้นในเนื้อสัตว์ เนื่องมาจากกลิ่นเพศของสุกรเพศผู้ที่ไม่ได้ตอน กลิ่นจากอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ เป็นต้น

3) คุณลักษณะทางสุขศาสตร์ (Hygienic factors)

คุณภาพเนื้อสัตว์ที่เกี่ยวข้องในด้านนี้หมายความรวมถึงเนื้อสัตว์ที่สะอาด ไม่มีปนเปื้อนในเรื่องต่อไปนี้คือ

3.1 การปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ (*Microbial contamination*)

เชื้อจุลินทรีย์นี้อาจติดมากับสภาพแวดล้อมภายในคอกโรงเรือน และอาหารสัตว์โดยเฉพาะวัตถุดิบที่กรรมวิธีการผลิตไม่ผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อ (sterilization) และถ้าโรงฆ่าสัตว์นั้นไม่ได้มาตรฐาน ก็ยิ่งทำให้เชื้อมีโอกาสปนเปื้อนติดไปกับเนื้อสัตว์ มีผลทำให้มีเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ในเนื้อสัตว์เกินกว่าที่มาตรฐานจะยอมได้

เกณฑ์กำหนดที่จุลินทรีย์อาจปนเปื้อนเนื้อสุกรในประเทศไทยตามมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.6001). (2547ก)

1) จำนวนจุลินทรีย์รวมต้องไม่เกิน $5x10^5$ โคโลนี ต่อตัวอย่าง 1 กรัม วิธีทดสอบให้ปฏิบัติตาม Association of Analytical Communicaties (AOAC, 2000) ข้อ 966.23C หรือวิธีทดสอบที่เทียบเท่า

2) โคลิฟอร์ม (Coliform organisms) กำหนดค่า Most Probable Number (MPN) ตัวอย่าง 1 กรัมต้องไม่เกิน 5×10^3 วิธีทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 966.24 หรือวิธีทดสอบที่เทียบเท่า

3) ซาลโมเนลล่า (*Salmonella* sp.) ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม วิธีทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 966.26 หรือวิธีทดสอบที่เทียบเท่า

4) สตาฟิโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) กำหนดค่า Most Probable Number (MPN) ตัวอย่าง 1 กรัมต้องไม่เกิน $1x10^2$ วิธีทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 966.55 หรือวิธีทดสอบที่เทียบเท่า

3.2 การปนเปื้อนจากปาราสิต

3.3 การปนเปื้อนจากมลพิษสิ่งแวดล้อม เช่น สารโลหะหนัก ยาฆ่าวัชพืช ยาฆ่าแมลง และยาฆ่าเชื้อรา

3.4 สารตกค้าง เช่น ยาปฏิชีวนะและยารักษาโรค ฮอร์โมนและฮอร์โมนสังเคราะห์ สารเร่งการเจริญเติบโต

4) คุณค่าที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปเนื้อสัตว์ (Technological value)

ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่างในเนื้อ ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนในเนื้อ การสูญเสียน้ำระหว่างการเก็บรักษาและระหว่างการปรุงสุก เนื้อที่มีคุณภาพดีเหมาะที่จะนำไปแปรรูปทำผลิตภัณฑ์ คือเนื้อที่มีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำของเนื้อสูงซึ่งมีความสัมพันธ์กับความเป็นกรดด่างในเนื้อ โดยเนื้อที่มีความเป็นกรดด่างต่ำก็จะมีความสามารถในการอุ้มน้ำสูง

5) คุณภาพที่เกี่ยวข้องทางด้านมโนธรรมและจิตใจ (Ethical value)

การเลี้ยงสัตว์จะต้องไม่ทรมานและการผลิตเนื้อที่มีคุณภาพจะต้องมาจากการเลี้ยงที่ไม่ทำลายสภาพแวดล้อม มีระบบการจัดการของเสีย

2.5 การใช้น้ำมันหอมระเหยจากโหระพา และกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

2.5.1 โหระพา

ภาพที่ 1 โหระพา

ที่มา : นิรนาม (2554)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ocimum basilicum* Linn.

วงศ์ Labiatae

ชื่อภาษาอังกฤษ Sweet Basil, Thai Basil

ลักษณะของพืช เป็นไม้ล้มลุก สูง 0.3-0.9 เมตร ลำต้นและกิ่งเป็นเหลี่ยม ผิวของลำต้นมีสีเขียวอมม่วง ยอดอ่อนมีขนปกคลุม มีกลิ่นหอมเฉพาะ ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงตรงข้าม รูปรียาว กว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 4-6 เซนติเมตร โคนใบเรียวแหลม ขอบใบเรียบหรือหยักเล็กน้อย ส่วนดอกออกเป็นช่อตั้ง ออกที่ปลายยอด ดอกย่อยสีขาว กลีบดอกมี 5 กลีบ โคนติดกัน แบ่งเป็น 2 ปาก

ปากบนใหญ่กว่าปากล่าง มีแถบสีม่วงแดงตามยาว กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกันเป็นหลอด ส่วนปลายแยกเป็น 5 กลีบ ผลเป็นผลแห้งสีน้ำตาล ผลหนึ่งมี 4 เมล็ด รูปกลมรี แข็ง สีดำ (นิจศิริ เรืองรังษี. 2547)

สมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

Hussian *et al.* (2008) นำต้นโหระพา (*Ocimum basilicum* L.) มากลั่นด้วยน้ำ (hydro-distilled) และนำน้ำมันหอมระเหยมาวิเคราะห์องค์ประกอบพบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ได้ ประกอบด้วย linalool 56.7 - 60.6% epi-α-cadinol 8.6-11.4% α-bergamotene 7.4 – 9.2% และ Ý – cadinene 3.2 – 5.4% จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion method พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Pasteurella multocida* ซึ่งประสิทธิภาพของการยับยั้งที่ได้จะมีความแตกต่างกันในแต่ละฤดูกาล (ฤดูร้อน, ฤดูใบไม้ร่วง, ฤดูหนาว และฤดูใบไม้ผลิ)

Patel *et al.* (2008) เมื่อน้ำมันหอมระเหยโหระพามาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) ด้วยวิธี agar-well diffusion assay method พบว่าโหระพาที่สกัดด้วยน้ำ ปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และ เอธานอล สามารถยับยั้ง Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) ได้ถึง 200–500 x 10^5 CFU/ml., 50-200 x 10^5 CFU/ml., 50-200 x 10^5 CFU/ml. และ <50 x 10^5 CFU/ml. ตามลำดับ

Wannissorn *et al.* (2005) นำพืชสมุนไพรมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion method พบว่า น้ำมันหอมระเหยโหระพา (*Ocimum basilicum* var. *citratum*) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ รวมถึง *Salmonella* sp. , *Escherichia coli* O157 , *Campylobacter jejuni* และ *Clostridium perfringen* ซึ่งแบคทีเรียที่มักพบปนเปื้อนในไก่ส่งออก โดยเสนอว่าอาจจะเป็นทางเลือกสำหรับใช้ผสมในอาหารสัตว์

Runyaro (2009) นำโหระพา 4 ชนิด (*O.basilicum*, *O.kilimandscharicum*, *O.lamiifolium* และ *O.suave*) มาสกัด ซึ่งองค์ประกอบหลักมีทั้งอนุพันธ์ของ phenyl propane และ terpenoids รวมทั้ง methyl eugenol, 1,8-cineole, camphor, bornyl acetate, germacrene-D, E-myroxide, germacrene-B,caryophylene oxide และ *p*-cymene จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย ด้วยวิธี agar dilution พบว่า *O.basilicum* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *S.aureus*, *S.epidermis*, *P.aeroginosa*, *E.cloacae*, *K.pneumoniae* และ *E.coli* แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S.mutans*, *S.viridans*

2.5.2 กระเพรา

ภาพที่ 2 กระเพรา

ที่มา : นิรนาม (2554)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ocimum sanctum* L.

วงศ์ Labiatae

ชื่อภาษาอังกฤษ Holy Basil

ลักษณะของพืช เป็นไม้พุ่ม สูงประมาณ 30-60 เซนติเมตร ส่วนโคนเป็นไม้เนื้อแข็ง**ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงตรงข้าม** รูปรีกว้าง 1-3 เซนติเมตร ยาว 2.5 – 5 เซนติเมตร ปลายใบมนหรือแหลม โคนใบแหลม ขอบใบจักรเป็นฟันเลื่อยและเป็นคลื่น หลังใบและท้องใบมีขน ส่วนดอกออกเป็นช่อที่ปลายยอด ดอกย่อยมีจำนวนมากดอกสีขาวแกมม่วงแดงแบ่งเป็น 2 ปาก ปากบนมี 4 กลีบ ปากล่างมี 1 กลีบ ยาวกว่าปากบน มีขนประปรายกลีบเลี้ยงโคนเชื่อมติดกัน ปลายเรียวแหลม ด้านนอกมีขน เกสรตัวผู้มี 4 อัน ผลเป็นผลแห้งเมื่อแตกออกจะมีมีดสีดำรูปไข่ (**นิจศิริ เรืองรังษี**. 2547)

สมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ปทุม อรุณวัชรินทร์และคณะ (2550) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจากกระเพรา พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากกระเพรามีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมลบ ซึ่งได้แก่ *E. coli* และ *S.* Typhimurium ได้ดี ยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียคือ *Lactobacillus plantarum*, *L. cellobiosus* ได้ดี (Minimal inhibition concentrations 0.1-0.2%) และต้านทานต่อรา 4 ชนิด คือ *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. parasiticus* และ *Fusarium oxysporum* ได้ดีโดยมีค่า Minimal inhibition concentrations 0.1-0.3%

Wiart *et al.* (2004) นำกระเพรา (*Ocimum sanctum* L.) ทั้งต้นมาสกัด และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion method พบว่า สามารถยั้งยับการเจริญของ *Pseudomonas aeroginosa* และ *Staphylococcus aureus* โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณวงใสเท่ากับ 15 และ 7 มิลลิเมตร ตามลำดับ

2.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารทดสอบในการยับยั้งจุลินทรีย์

2.6.1 การแพร่ในอาหารวุ้น (Agar diffusion method)

อาศัยหลักการแพร่ (diffusion) โดยนำสารที่ต้องการทดสอบใส่ในสิ่งรองรับ จากนั้นสารที่ต้องการทดสอบจะแพร่จากจุดเริ่มต้นออกไปในอาหารวุ้น เมื่อระยะทางที่สารแพร่ออกไปเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของสารจะลดลงทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้น ในขณะเดียวกันจุลินทรีย์ที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ถูกยับยั้งโดยสารทดสอบก็จะเจริญและเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นจนเห็นได้ชัด แต่บริเวณใกล้กระดาษกรองซึ่งมีความเข้มข้นของสารทดสอบมากพอที่จะยับยั้งเชื้อได้จะไม่มีการเจริญของเชื้อทำให้เห็นเป็นบริเวณใส (inhibition zone) ภายหลังการบ่ม วิธีนี้สามารถทำได้หลายรูปแบบ (พสุดา เจี่ยปิยะสกุล. 2550) เช่น สิ่งรองรับที่ที่เป็นหลุมซึ่งได้เจาะลงในอาหารวุ้นแล้วเติมสารทดสอบ เรียกว่า agar well diffusion method ถ้าสิ่งรองรับเป็นกระดาษซับกลมซึ่งใส่สารทดสอบก่อนวางบนอาหารวุ้น เรียกว่า agar disc diffusion method สิ่งรองรับเป็นถ้วยทรงกระบอก เรียกว่า cup diffusion method

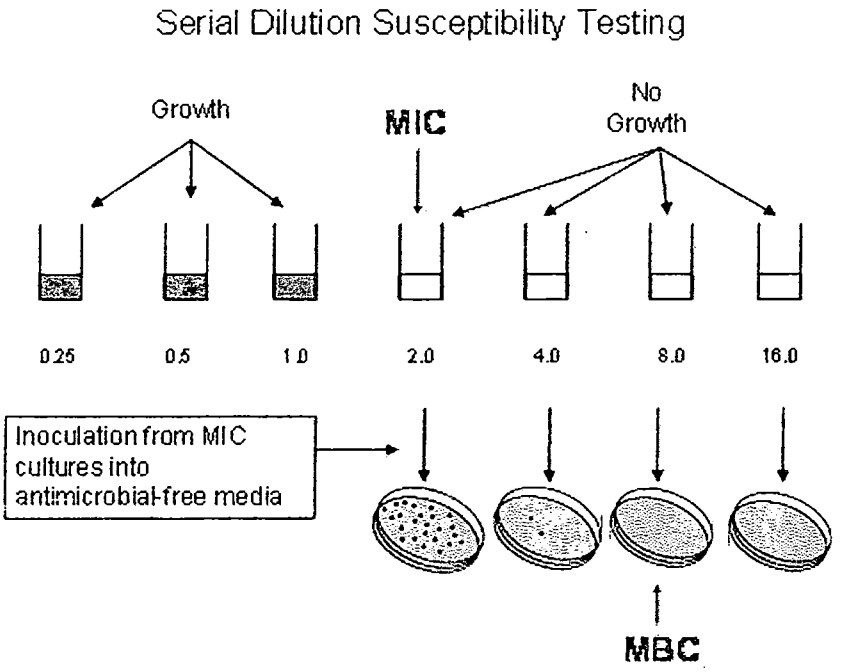
2.6.2 การเจือจางในอาหารวุ้น (Agar dilution method)

สารทดสอบจะถูกเจือจางในน้ำหรือตัวทำละลายแล้วผสมกับอาหารวุ้นตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง หลังจากนั้นทำการเพาะเชื้อทดสอบลงบนอาหารวุ้นที่เตรียมไว้ สังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหารหลังการบ่ม

2.6.3 การเจือจางในอาหารเหลว (Broth dilution method)

ทำโดยเจือจางความเข้มข้นสารทดสอบด้วยอาหารเหลวในหลอดทดลอง จากนั้นเพาะเชื้อทดสอบลงในหลอดทดลองดังกล่าว แล้วสังเกตการเจริญภายหลังการบ่ม โดยดูจากความขุ่นของอาหารที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่เจริญและแปลผลทดสอบเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (Minimum Inhibition Concentration : MIC) จากนั้นนำหลอดทดลองทุกหลอดที่เชื้อไม่เจริญไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ อาจเป็นอาหารเหลวหรือ

อาหารแข็งก็ได้ หลอดทดลองหรือจานเพาะเชื้อที่ไม่มีเชื้อทดสอบเจริญ คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อทดสอบ (Minimum Bactericidal Concentration : MBC) ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบและความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อทดสอบ

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 น้ำมันหอมระหย

น้ำมันหอมระเหยโหระพา (*Ocimum basilicum*) และกระเพรา (*Ocimum sanctum*) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.จำรูญ เล้าสินวัฒนา ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สาขาวิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานทดลอง

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สายพันธุ์จุลินทรีย์ทดสอบและสภาวะการเจริญเติบโต

เชื้อทดสอบ	อาหาร	อุณหภูมิ(°C)
เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียแลคติก		
Lactobacillus plantarum ATCC 14917^T	MRS	30
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JCM 1157^T	MRS	30
Lactobacillus sakei TISTR 890	MRS	37
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* JCM 6124^T	MRS	30
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* TISTR 942	MRS	30
Enterococcus faecalis TISTR 888	MRS	37
Streptococcus sp. TISTR 1030	MRS	30
เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค		
Salmonella Typhimurium TISTR 292	TSB-YE	37
Escherichia coli TISTR 780	TSB-YE	37
Staphylococcus aureus TISTR 118	TSB-YE	37
Enterococcus faecalis JCM 5803^T	MRS	37
Other Gram-negative bacteria		
Pseudomonas fluorescens JCM 5963^T	TSB-YE	26
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	TSB-YE	26
Aeromonas hydrophila TISTR 1321	NB	30
Listeria innocua ATCC 33090^T	TSB-YE	37
Brochotrix campestris NBRC 11547^T	TSB-YE	26

ATCC = American Type Culture Collection , Rockville, MD

JCM = Japanese Culture of Microorganism ,Wako, Japan

NBRC = National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research

3.3 ตัวอย่างเนื้อทดลอง

ใช้เนื้อสันนอกสุกร (*Longissimus dorsi*) จากบริษัทเฟรชมีท โพรเซสซิ่ง จำกัด จังหวัดนครปฐม นำมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. MRS broth (Merck, Germany)
2. Agar (Criterion, U.S.A.)
3. Tryptic soy broth (Merck, Germany)
4. Yeast extract (BIO BASIC INC, Canada)
5. Nutrient broth (Merck, Germany)
6. Peptone (Merck, Germany)
7. Plate Count Agar (Merck, Germany)
8. Malt extract (Merck, Germany)
9. Methyl Red Voges Proskawer Broth (MR-VP) (Merck, Germany)
10. Simmon's Citrate Agar (Merck, Germany)

3.5 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ตู้เขี่ยเชื้อ Laminar Flow (Dwyer model Mark II, USA)
2. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (WTB Binder model BD, Germany)
3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Auto clave, Hirayama, Japan)
4. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert model CM 500, Germany)
5. เครื่องชั่งชนิดหยาบ (Tanita model 1144, Tanita Corporation, Japan)
6. เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (Vortex Mixer KMC-1300V, Korea)
7. ไมโครปิเปต ขนาด 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Eppendrof, USA)
8. ไมโครเวฟ (Turbora model TRX 249m, Korea)

9. อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath, Memmert, Germany)
10. เครื่องมือวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในเนื้อ (Mettler Toledo model SG-2, Switzerland)
11. เครื่องมือวัดสีของเนื้อ (Hunter, Japan)
12. กระดาษกรอง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
13. ภาชนะบรรจุพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร สูง 4 เซนติเมตร
14. เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็น
15. เครื่องบดเนื้อ

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.7 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ตุลาคม 2552 – กันยายน 2553

3.8 วิธีการทดลอง

การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การทดสอบในหลอดทดลอง (*In vitro*) และ การทดสอบในเนื้อสันนอกสุกรบด (*In vivo*)

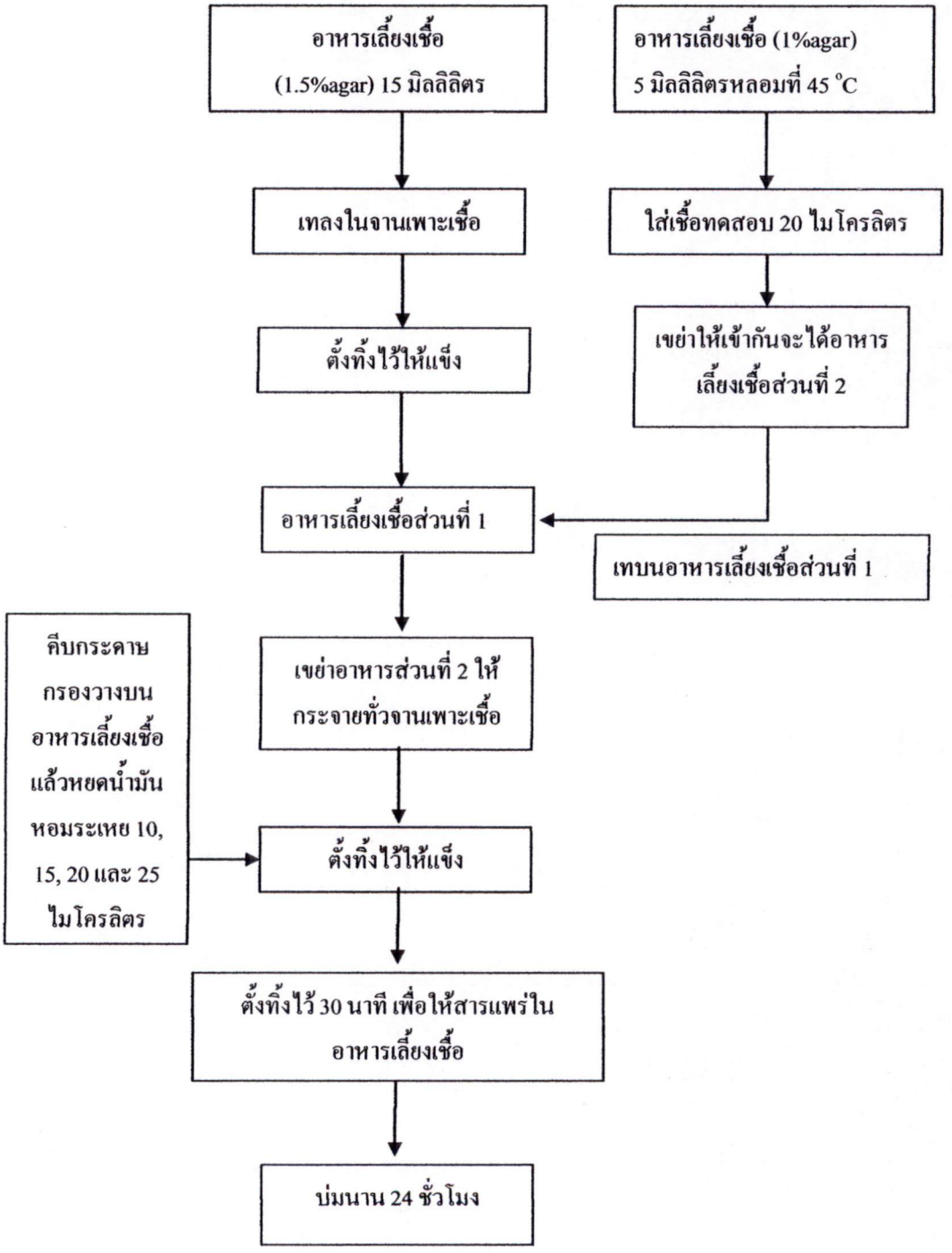
ส่วนที่ 1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาและกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ ทำการศึกษา 3 การทดลอง ได้แก่

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาและกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (*In vitro*) โดยวิธีแพร่ผ่านแผ่นกระดาษกรอง (Disc diffusion method)

เทอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS, TSB-YE หรือ NB ที่มีวุ้น (agar) 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนที่ 1 จากนั้นถ่ายเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 1) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีวุ้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด (ตารางที่ 1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่หลอมตัวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนที่ 2 แล้วเททับลงในอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนที่ 1 ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว ใช้ปากคีบแผ่นกระดาษกรอง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนที่ 2 จากนั้นหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรา ปริมาตร 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร พร้อมวางแผ่นกระดาษกรองที่หยดน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) รอจนกระทั่งน้ำมันหอมระเหยที่หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง นำจานเพาะเชื้อไปบ่ม

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ที่อุณหภูมิต่างๆ ตามความเหมาะสมของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 1) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลให้ดูจากบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นจากผลการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแปลผลโดยใช้เวอร์เนียวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณวงใส (Inhibition zone) และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยของโซนใสมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 วิธีการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีแพร่ผ่านกระดาษกรอง

131218

การทดลองที่ 2 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรา ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (minimal inhibition concentration ; MIC) ด้วยวิธี micro-dilution broth susceptibility assay (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999)

นำน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรา ปริมาตรที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาทำให้เจือจางลงครั้งละ 2 เท่า (two-fold serial dilution) อย่างต่อเนื่องกันด้วย 0.5% tween 80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ มี 8 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 5,000, 2,500, 1,250, 625, 312.5, 156.25, 78.12 และ 39.06 ppm. โดยขั้นแรกนำน้ำมันหอมระเหยที่ได้ปิเปตลงใส่ในหลอด eppendoff หลอดละ 20 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด จากตารางที่ 1 ปริมาตร 160 ไมโครลิตร และจุลินทรีย์ทดสอบ (ตารางที่ 1)ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดเดียวกันกับน้ำมันหอมระเหย โดยในแต่ละชุดความเข้มข้นจะมี growth control และ negative control กล่าวคือ growth control ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 160 ไมโครลิตร และจุลินทรีย์ทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตร ส่วน negative control ประกอบด้วย 0.5% tween 80 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 160 ไมโครลิตร และจุลินทรีย์ทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิด (ตารางที่ 1) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตหลอดที่มีตะกอน (pellet) สีขาวที่ก้นหลอด รายงานผลเป็น (+) ส่วนหลอดที่ไม่มีจุลินทรีย์ทดสอบขึ้นหรือหลอดที่ไม่มีตะกอน (pellet) รายงานผลเป็น (-) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายที่ไม่มีตะกอนหมายถึงความเข้มข้นที่ต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC)

การทดลองที่ 3 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรา ต่อการทำลายจุลินทรีย์ (minimal bactericidal concentration ; MBC) ด้วยวิธี micro-dilution broth susceptibility assay (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999)

จากการทดสอบหาค่า MIC ในการทดลองที่ 2 ให้นำหลอดที่ไม่เกิดตะกอนสีขาวทุกหลอดมา streak ในอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิเหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิด (ตารางที่ 1) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รายงานผลเป็น (+) กรณีที่เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รายงานผลเป็น (–) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายที่เชื้อจุลินทรีย์ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถทำลายจุลินทรีย์ทดสอบได้ (MBC)

ส่วนที่ 2 ศึกษาความสามารถของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพด้านกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด ทำการศึกษา 2 การทดลอง ได้แก่

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพาที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และคุณภาพทางกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยกระเพราที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และคุณภาพทางกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด

นำเนื้อสุกรสันนอกบดละเอียด น้ำหนักประมาณ 100 กรัม บรรจุกล่องพลาสติก แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่สองนำน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรา หยดลงบนกระดาษกรองที่ติดไว้บริเวณฝากล่องโดยใช้ปริมาณที่เหมาะสมในการทดลองที่ 1 โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ใช้กระดาษกรอง 1 แผ่น หยด 20 ไมโครลิตร และ ใช้กระดาษกรอง 2 แผ่น หยดแผ่นละ 10 ไมโครลิตร เพื่อกระจายการระเหยให้ทั่วทั้งกล่อง และเก็บที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มตัวอย่างที่ระยะเวลา 0, 1, 3 และ 5 วัน สุ่มตรวจจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (AOAC, 2006) จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ จำนวนเชื้อราและยีสต์ จำนวนโคลิฟอร์ม (Coliform) และ อีโคไล (*E. coli*) คุณภาพทางด้านกายภาพของเนื้อสุกรบด ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าสีของเนื้อ และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำระหว่างการเก็บรักษา

3.9 ขั้นตอนการศึกษาและการเก็บข้อมูล

3.9.1 การศึกษาทางด้านจุลินทรีย์

1. การศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count)

สุ่มตัวอย่างเนื้อสันนอกสุกรบดที่บ่มในระยะเวลาต่างๆ 25 กรัม ในสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 ทำจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมในแต่ละช่วงเวลาการบ่ม จากนั้นดูดสารละลายเจือจางที่ 3 ระดับความเจือจางสุดท้ายความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร และถ่ายลงในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร Plate Count Agar ลงจานเพาะเชื้อปริมาตรจานละ 15 – 20 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ รอจนอาหารแข็งแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g (AOAC, 2006)

2. การศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ (Psychrotrophic bacteria)

สุ่มตัวอย่างเนื้อสันนอกสุกรบดที่บ่มในระยะเวลาต่างๆ 25 กรัม ในสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 ทำจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมในแต่ละช่วงเวลาการบ่ม จากนั้นดูดสารละลายเจือจาง 1 มิลลิลิตร และถ่ายลงในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร Plate Count Agar ลงจานเพาะเชื้อปริมาตรจานละ 15 – 20 มิลลิลิตรที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ รอจนอาหารแข็งแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่

อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน นำมานับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และรายงานผลเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g (Diliello. 1982)

3. การศึกษาราและยีสต์ (Yeast & Mold)

สุ่มตัวอย่างเนื้อสันนอกสุกรบดที่บ่มในระยะเวลาต่างๆ 25 กรัม ในสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 ทำจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมในแต่ละช่วงเวลาการบ่ม จากนั้นดูดสารละลายเจือจาง 1 มิลลิลิตร และถ่ายลงในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร Malt Agar ลงจานเพาะเชื้อปริมาตรจานละ 15 – 20 มิลลิลิตรที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ รอจนอาหารแข็งแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำมานับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และรายงานผลเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g (AOAC, 2006)

4. การศึกษาโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria) และ *Escherichia coli* โดยวิธี Most Probable Number (MPN) อ้างอิงวิธี AOAC (2006)

4.1 Presumptive Test

สุ่มตัวอย่างเนื้อสันนอกสุกรบดที่บ่มในระยะเวลาต่างๆ 25 กรัม ในสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 ทำจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมในแต่ละช่วงเวลาการบ่ม จากนั้นดูดสารละลายเจือจางที่ 3 ระดับความเจือจางสุดท้ายความเจือจางละ 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ LST ที่มีหลอดดักแก๊สคว่ำอยู่ความเจือจางละ 3 หลอด รวม 9 หลอด นำไปบ่มที่ 35±1 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง

4.2 Confirmed Test

ถ่ายเชื้อจากหลอด LST ที่เกิดแก๊สลงในหลอด BGLB หลอดละ 1 loop นำไปบ่มที่ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±2 ชั่วโมง เลือกหลอดที่เกิดแก๊สไปอ่านค่าจากตาราง Most probable numbers (MPN) (ภาคผนวก) มีหน่วยเป็น MPN/g

4.3 Confirmed Test for *E.coli*

ถ่ายเชื้อจากหลอด LST ที่เกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส ลงใน EC broth ที่มีหลอดดักแก๊สคว่ำอยู่ หลอดละ 1 ลูป โดยถ่ายหลอดต่อหลอด นำไปบ่มที่ 45.5±0.2 องศาเซลเซียส 48±2 ชั่วโมง บันทึกผลหลอดที่เกิดแก๊สไปอ่านค่าจากตาราง MPN (ภาคผนวก) มีหน่วยเป็น MPN/g

4.4 Completed Test for *E.coli*

ใช้ลูปถ่ายเชื้อจาก EC broth ที่เกิดแก๊สมา streak บนผิวหน้าอาหาร EMB agar นำไปบ่มที่ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีจะมีสีม่วงหรือดำ อาจมีหรือไม่มีมันวาวคล้ายโลหะ (Metallic Sheen) หรือโคโลนีดังกล่าวมา streak บน PCA slant จำนวน 5 โคโลนี นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ต่อไป

4.5 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (IMViC test)

4.5.1 การทดสอบ Indole โดยการถ่ายเชื้อจากอาหาร Plate Count Agar slant ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptophan Broth แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย Kovac จำนวน 0.2-0.3 มิลลิลิตร ถ้าให้ผล + จะปรากฏสีแดงที่ส่วนบนของ Tryptophan Broth

4.5.2 การทดสอบ Methyl Red และ Acetoin (MR-VP) โดยการถ่ายเชื้อจากอาหารใน Plate Count Agar slant ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MR-VP บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วแบ่งเป็น 2 ส่วนดังนี้

- ทดสอบ Methyl red reaction (MR) โดยเติมสารละลาย Methyl red 5 หยด ลงในสารละลายเชื้อ โดยผลบวกจะให้สีแดง ผลลบจะให้สีเหลือง

- สำหรับ VP โดยถ่ายเชื้อจาก 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแล้วเติม 5% alcoholic - naphthol solution (w/v) ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร และ 40% KOH ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ผลบวกจะให้สีชมพูแดง

4.5.3 การทดสอบ citrate ทำการถ่ายเชื้อใส่อาหาร Simmon's Citrate Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลบวกจะให้สีน้ำเงิน

ตารางที่ 2 การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli*

จุลินทรีย์	Indole	MR	VP	Citrate
Typical *E.coli*	+	+	-	-
Atypicao *E.coli*	-	+	-	-
Typical intermediate	+	+	-	+
Atypical intermediate	-	+	-	+
Typical *Enterbacter aerogenes*	-	-	+	+
Atypical *Enterbacter aerogenes*	+	-	+	+

4.6 การรายงานผล นับจำนวนหลอดที่พบเชื้อ *E.coli* (ตารางที่ 2) ของแต่ละความเจือจาง นำไปอ่านค่าจากตาราง MPN (ภาคผนวก)

3.9.2 การศึกษาคุณภาพทางด้านกายภาพของเนื้อสุกร

1. วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

โดยใช้ probe แทงลงในเนื้อบด ด้วยเครื่องมือวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ในเนื้อ (Mettler Toledo, model SG-2)

2. วัดค่าสีของเนื้อ

ผสมเนื้อบดให้เข้ากัน จากนั้นทำการวัดสีด้วยเครื่องมือวัดสีของเนื้อ (Hunter) เก็บข้อมูล บันทึกค่า L*, a* และ b*

3. การหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษา (% drip loss)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างเนื้อบดก่อนเก็บรักษาเป็นน้ำหนักเริ่มต้น (D1) บรรจุเนื้อบดลงในภาชนะแล้วนำไปบ่มที่ 2-4 °C นาน 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนัก (D2) (Stolowski *et al.* 2006) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษาได้จากสูตรต่อไปนี้

การวัดค่าการสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษา = ((D1-D2) x100) /D1

3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการศึกษาความสามารถของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพด้านกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบดโดยปริมาณจำนวนจุลินทรีย์รวม จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ จำนวนราและยีสต์ จำนวนโคลิฟอร์ม และ *E. coli* นำมาแปลงในค่าลอการิธึม (y = log X) ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าสีของเนื้อ และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษา นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ตามแบบแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Completely Block Design) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) วิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป กำหนดให้

ปัจจัย A คือ กลุ่มการทดสอบ ได้แก่ 1. กลุ่มควบคุม 2. กลุ่มที่บรรจุเนื้อสันนอกสุกรบดในกล่องพลาสติกแล้วหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราบนกระดาษกรอง 1 แผ่น หยด 20 ไมโครลิตร ติดไว้บริเวณฝากล่อง 3. กลุ่มที่บรรจุเนื้อสันนอกสุกรบดในกล่องพลาสติกแล้วหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราบนใช้กระดาษกรอง 2 แผ่น หยดแผ่นละ 10 ไมโครลิตร ติดไว้บริเวณฝากล่อง

ปัจจัย B คือ ระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา Before , After , 1, 3 และ 5 วัน โดย Before หมายถึง ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก After หมายถึง หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ส่วนที่ 1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาและกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (*In vitro*)

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (*In vitro*) แบ่งการทดลองย่อย 3 การทดลอง ได้แก่

1.1.1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธีแพร่ผ่านแผ่นกระดาษกรอง (Disc diffusion method)

จากการนำน้ำมันหอมระเหยโหระพา ปริมาตร 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรอง นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อทดสอบ แล้วบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลจากบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นจากผลการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดังตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหยโหระพาสามารถยับยั้ง *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR 942 ได้ที่สุดโดยไม่พบเชื้อเจริญในจานเพาะเชื้อ (จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 45 มิลลิเมตร) ทั้งที่มีน้ำมันหอมระเหย 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร

เมื่อหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาที่ปริมาตร 25 ไมโครลิตร พบว่าสามารถยับยั้ง *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321, *Lactobacillus sakei* TISTR 890, *Enterobacter faecalis* TISTR 888, *Enterobacter faecalis* JCM 5803 และ *Streptococcus sp.* TISTR 1030 ได้ดีมาก โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสประมาณ 20 – 27 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยโหระพาสามารถยับยั้ง *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, *Lactobacillus sakei* JCM 1157, *Salmonella* Typhimurium TISTR 292, *Escherichia coli* TISTR 780, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358, *Pseudomonas fluorescens* JCM 5963, *Listeria innocua* ATTC 33090 และ *Brochotrix campestris* NBRC 11547 ได้โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสประมาณ 14 – 19 มิลลิเมตร และยับยั้ง *A. hydrophila* TISTR 1321 ได้ดี แต่พบว่ามีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *B. campestris* NBRC 11547, *L. innocua* ATCC 33090, *E. coli* TISTR 780 และ *P. fluorescens* TISTR 358 ได้เพียงเล็กน้อย

ตารางที่ 3 ผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพาที่ปริมาตรต่างๆ ในการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method

เชื้อทดสอบ	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใส (มิลลิเมตร)				
	ชุดควบคุม	10ไมโครลิตร	15 ไมโครลิตร	20 ไมโครลิตร	25 ไมโครลิตร
Lactobacillus plantarum ATCC 14917	0	12.33 ± 1.15	15.00 ± 2.94	16.33 ± 4.16	18.00 ± 4.36
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JCM 1157	0	12.00 ± 1.00	14.67 ± 2.08	15.67 ± 1.15	16.00 ± 1.00
Lactobacillus sakei TISTR 890	0	14.33 ± 0.58	15.67 ± 2.08	19.00 ± 1.73	20.33 ± 2.89
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* JCM 6124	0	*	*	*	*
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* TISTR 942	0	*	*	*	*
Enterococcus faecalis TISTR 888	0	16.67 ± 7.64	20.67 ± 7.02	23.33 ± 5.77	24.33 ± 6.66
Streptococcus sp. TISTR 1030	0	16.00 ± 1.00	17.67 ± 0.58	20.33 ± 0.58	20.33 ± 0.58
Salmonella Typhimurium TISTR 292	0	11.67 ± 1.53	14.00 ± 3.00	14.67 ± 2.52	15.33 ± 1.53
Escherichia coli TISTR 780	0	10.83 ± 1.04	12.33 ± 0.58	13.00 ± 1.73	19.00 ± 2.18
Staphylococcus aureus TISTR 118	0	13.17 ± 4.19	13.00 ± 1.73	15.00 ± 2.00	16.67 ± 2.08
Enterococcus faecalis JCM 5803	0	18.33 ± 4.16	19.33 ± 4.16	20.00 ± 5.29	22.00 ± 6.24
Pseudomonas fluorescens JCM 5963	0	11.50 ± 0.50	14.33 ± 2.31	15.50 ± 1.32	16.17 ± 0.76
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	0	11.00 ± 1.00	11.83 ± 1.26	13.17 ± 2.02	14.33 ± 0.58
Aeromonas hydrophila TISTR 1321	0	19.83 ± 3.62	21.67 ± 3.06	26.00 ± 5.29	27.17 ± 5.30
Listeria innocua ATCC 33090	0	11.33 ± 1.15	11.67 ± 1.53	14.67 ± 0.58	18.00 ± 3.00
Brochotrix campestris NBRC 11547	0	10.33 ± 1.04	13.50 ± 0.87	15.67 ± 2.52	17.50 ± 2.60

* หมายถึง ยับยั้งทั้งเพลท (เส้นผ่านศูนย์กลาง 45 มิลลิเมตร) ชุดควบคุม หมายถึง ใช้น้ำกลั่นหยดแทนน้ำมันหอมระเหย

ขณะที่หยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาที่ปริมาตร 20 ไมโครลิตร พบว่า สามารถยับยั้ง *E. faecalis* TISTR 888, *Streptococcus sp.* TISTR 1030, *E. faecalis* JCM 5803, *A. hydrophila* TISTR 1321 มีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสประมาณ 20 – 27 มิลลิเมตร ส่วน *L. plantarum* ATCC 14917, *L. sakei* JCM 1157, *L. sakei* TISTR 890, *B. campestris* NBRC 11547 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสประมาณ 16 – 20 มิลลิเมตร นอกจากนี้ *S.* Typhimurium TISTR 292, *E.coli* TISTR 780, *S. aureus* TISTR 118, *P. fluorescens* TISTR 358, *P. fluorescens* JCM 5963 และ *L. innocua* ATTC 33090 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสประมาณ 13 – 16 มิลลิเมตร

เมื่อหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาที่ปริมาตร 15 ไมโครลิตร พบว่า สามารถยับยั้ง *E. faecalis* TISTR 888 และ *A. hydrophila* TISTR 1321 มีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสประมาณ 20 – 22 มิลลิเมตร ส่วน *L. plantarum* ATCC 14917, *L. sakei* TISTR 890, *Streptococcus sp.* TISTR 1030, *E. faecalis* JCM 5803 มีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสประมาณ 15 – 20 มิลลิเมตร ส่วนที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่ำกว่า 15 มิลลิเมตร คือ *L. sakei* JCM 1157, *S.* Typhimurium TISTR 292, *E. coli* TISTR 780, *S. aureus* TISTR 118, *P. fluorescens* TISTR 358, *P. fluorescens* JCM 5963, *B. campestris* NBRC 11547 และ *L. innocua* ATTC 33090

เมื่อหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาที่ปริมาตร 15 และ 10 ไมโครลิตร พบว่ายับยั้งค่อนข้างน้อยโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่ำกว่า 20 มิลลิเมตร ในเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิดที่ทำการทดสอบ

ดังนั้นเมื่อพิจารณาน้ำมันหอมระเหยโหระพาปริมาตร 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร ที่หยดลงบนกระดาษกรอง แล้วนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อทดสอบพบว่าที่ปริมาตร 20 ไมโครลิตร สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้มีประสิทธิภาพสูงแต่ใช้น้ำมันหอมระเหยเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับที่ปริมาตร 25 ไมโครลิตร กล่าวคือ เมื่อหยดน้ำมันหอมระเหยที่ปริมาตร 25 ไมโครลิตร *A. hydrophila* TISTR 1321, *E. faecalis* TISTR 888, *L. sakei* TISTR 890 , *E. faecalis* JCM 5803 และ *Streptococcus sp.* TISTR 1030 ได้ดีมาก โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสประมาณ 27.17, 24.33, 22.00, 20.33 และ 20.33 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อหยดน้ำมันหอมระเหยที่ปริมาตร 20 ไมโครลิตร สามารถยับยั้ง *A. hydrophila* TISTR 1321, *E. faecalis* TISTR 888, *L. sakei* TISTR 890, *E. faecalis* JCM 5803 และ *Streptococcus sp.* TISTR 1030

ได้ดีใกล้เคียงกัน โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสประมาณ 26.00, 23.33, 20.00, 20.33 และ 19.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังนั้นในศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพาที่มีต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพทางกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด จึงใช้ที่ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

1.1.2 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพาต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (minimal inhibition concentration ; MIC) ด้วยวิธี micro-dilution broth susceptibility assay (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999)

จากการนำน้ำมันหอมระเหยโหระพาปริมาตรที่เหมาะสมที่ได้ มาศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพาต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ minimal inhibition concentration (MIC) แล้วสังเกตหลอดที่มีตะกอน (pellet) สีขาวที่ก้นหลอด รายงานผลเป็น (+) ส่วนหลอดที่ไม่มีจุลินทรีย์ทดสอบขึ้นหรือหลอดที่ไม่มีตะกอน (pellet) รายงานผล (-) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายที่ไม่มีตะกอนหมายถึงความเข้มข้นที่ต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC) ดังตารางที่ 4 กล่าวคือ เมื่อศึกษาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) พบว่าน้ำมันหอมระเหยโหระพาสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* TISTR 1321 ได้เท่ากับ 156.25 ppm. ส่วน *L. sakei* TISTR 890, *Leu. mesenteroides* subsp.*mesenteroides* TISTR 942, *E. faecalis* TISTR 888, *Streptococcus* sp. TISTR 1030, *S. aureus* TISTR 118 มีค่า MIC เท่ากับ 625 ppm. และ *L.sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^{T} ,*Leu. mesenteroides* subsp.*mesenteroides* JCM 6124^{T}, *S.*Typhimurium TISTR 292 , *E. coli* TISTR 780, *E. faecalis* JCM 5803^{T}, *P. fluorescens* JCM 5963^{T} ,*P. fluorescens* TISTR 358 ,*L. innocua* ATCC 33090^{T} มีค่า MIC เท่ากับ 1250 ppm. *L. plantarum* ATCC 14917, *B. campestris* NBRC 11547^{T} มีค่า MIC เท่ากับ 2,500 ppm.

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพาต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

เชื้อทดสอบ	การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว										MIC
	ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโหระพา (ppm.)										
	Growth control	Negative control	5,000	2,500	1,250	625	312.5	156.25	78.12	39.06	
Lactobacillus plantarum ATCC 14917	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	2,500
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JCM 1157	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Lactobacillus sakei TISTR 890	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	625
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* JCM 6124	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* TISTR 942	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	625
Enterococcus faecalis TISTR 888	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	625
Streptococcus sp. TISTR 1030	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	625
Salmonella Typhimurium TISTR 292	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Escherichia coli TISTR 780	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Staphylococcus aureus TISTR 118	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	625
Enterococcus faecalis JCM 5803	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Pseudomonas fluorescens JCM 5963	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Aeromonas hydrophila TISTR 1321	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	156.25
Listeria innocua ATCC 33090	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Brochotrix campestris NBRC 11547	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	2,500

(+) หมายถึง เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (พบตะกอน) (-) หมายถึง ไม่พบการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ไม่พบตะกอน)

Growth control หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อ + เชื้อทดสอบ Negative control หมายถึง 0.5% tween80 + อาหารเลี้ยงเชื้อ + เชื้อทดสอบ

1.1.3 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพาต่อการทำลายจุลินทรีย์ (minimal bactericidal concentration ; MBC) ด้วยวิธี micro-dilution broth susceptibility assay (National Committee for Clinical Laboraory Standards, 1999)

จากการทดสอบหาค่า MIC ในการทดลองที่ 1.1.2 ให้นำทุกหลอดมา streak ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (ตารางที่ 1) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง รายงานผลเป็น (+) กรณีที่เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รายงานผลเป็น (–) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายที่เชื้อจุลินทรีย์ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อหมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถทำลายจุลินทรีย์ทดสอบได้ (MBC) ดังตาราง 5

พบว่าความเข้มข้นต่ำสุด (MBC) ของน้ำมันหอมระเหยโหระพาที่สามารถทำลายจุลินทรีย์ *A. hydrophila* TISTR 1321 ได้เท่ากับ 312.25 ppm. ส่วน *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T , *L. sakei* TISTR 890, *E. faecalis* TISTR 888, *Streptococcus* sp. TISTR 1030, *S. aureus* TISTR 118, *E. faecalis* JCM 5803^{T}มีค่า MBC เท่ากับ 625 ppm.

Leu. mesenteroides subsp.*mesenteroides* JCM 6124^T, *S.* Typhimurium TISTR 292, *E. coli* TISTR 780, *P. fluorescens* TISTR 358, *L. innocua* ATCC 33090^T , *B. campeatris* NBRC 11547^T มีค่า MBC เท่ากับ 1,250 ppm.

L. plantarum ATCC14917, *L. mesenteroides* subsp.*mesenteroides* TISTR 942 , *P. fluorescens* JCM 5963^T มีค่า MBC เท่ากับ 2,500 ppm.

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพาต่อการทำลายจุลินทรีย์

เชื้อทดสอบ	การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง								MBC
	ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโหระพา (ppm.)								
	5,000	2,500	1,250	625	312.5	156.25	78.12	39.06	
Lactobacillus plantarum ATCC 14917	-	-	+	+	+	+	+	+	2,500
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JCM 1157	-	-	-	-	+	+	+	+	625
Lactobacillus sakei TISTR 890	-	-	-	-	+	+	+	+	625
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* JCM 6124	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* TISTR 942	-	-	+	+	+	+	+	+	2,500
Enterococcus faecalis TISTR 888	-	-	-	-	+	+	+	+	625
Streptococcus sp. TISTR 1030	-	-	-	-	+	+	+	+	625
Salmonella Typhimurium TISTR 292	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Escherichia coli TISTR 780	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Staphylococcus aureus TISTR 118	-	-	-	-	+	+	+	+	625
Enterococcus faecalis JCM 5803	-	-	-	-	+	+	+	+	625
Pseudomonas fluorescens JCM 5963	-	-	+	+	+	+	+	+	2,500
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Aeromonas hydrophila TISTR 1321	-	-	-	-	-	+	+	+	312.5
Listeria innocua ATCC 33090	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Brochotrix campestris NBRC 11547	-	-	+	+	+	+	+	+	1,250

(+) เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (-) ไม่พบการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ (*In vitro*) แบ่งการทดลองย่อย 3 การทดลอง ได้แก่

1.2.1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยวิธีแพร่ผ่านแผ่นกระดาษกรอง (Disc diffusion method)

จากการนำน้ำมันหอมระเหยกระเพรา ปริมาตร 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรอง นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อทดสอบ แล้วบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลจากบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นจากผลการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดังตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหยกระเพราสามารถยับยั้ง *L. sakei* TISTR 890 ได้ที่สุด ทั้งที่ปริมาตร 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 14.67, 18.67, 19.33 และ 23.67 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อหยดน้ำมันหอมระเหยที่ปริมาตร 25 ไมโครลิตร พบว่าสามารถยับยั้ง *A. hydrophila* TISTR 1321, *B. campestris* NBRC 11547 ได้รองลงมามีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 19.33 และ 19.67 มิลลิเมตร ส่วน *L. plantarum* ATCC 14917, *L. sakei* JCM1157, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM6124, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR942, *E. faecalis* TISTR888, *E. faecalis* TISTR 5803, *Streptococcus sp.* TISTR 1030, *S.* Typhimurium TISTR 292, *E. coli* TISTR 780, *S. aureus* TISTR 118, *P. fluorescens* TISTR 358, *P. fluorescens* JCM 5963, *L. innocua* ATTC 33090 ให้ผลการยับยั้งค่อนข้างน้อย โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสประมาณ 8.83 - 16.00 มิลลิเมตร ทั้งที่ปริมาตร 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร

ตารางที่ 6 ผลของน้ำมันหอมระเหยกระเพราที่ปริมาตรต่างๆ ในการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion Method

เชื้อทดสอบ	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใส (มิลลิเมตร)				
	ชุดควบคุม	10 ไมโครลิตร	15 ไมโครลิตร	20 ไมโครลิตร	25 ไมโครลิตร
Lactobacillus plantarum ATCC 14917	0	9.50 ± 0.50	10.17 ± 1.26	11.00 ± 1.73	11.83 ± 0.29
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JCM 1157	0	10.00 ± 1.00	9.67 ± 1.53	11.17 ± 1.04	13.00 ± 1.00
Lactobacillus sakei TISTR 890	0	14.67 ± 5.03	18.67 ± 10.02	19.33 ± 9.45	23.67 ± 4.15
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* JCM 6124	0	11.00 ± 1.00	12.00 ± 0.00	12.83 ± 1.04	13.33 ± 1.53
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* TISTR 942	0	10.00 ± 2.00	10.50 ± 1.80	14.00 ± 2.00	14.67 ± 1.53
Enterococcus faecalis TISTR 888	0	11.17 ± 0.76	12.33 ± 1.53	15.50 ± 1.50	16.67 ± 1.15
Streptococcus sp. TISTR 1030	0	10.33 ± 4.04	14.17 ± 4.07	16.00 ± 4.36	17.00 ± 5.20
Salmonella Typhimurium TISTR 292	0	9.67 ± 1.53	12.83 ± 2.75	15.33 ± 3.51	16.00 ± 3.61
Escherichia coli TISTR 780	0	10.50 ± 0.87	11.50 ± 1.50	13.00 ± 2.78	13.50 ± 3.28
Staphylococcus aureus TISTR 118	0	10.33 ± 0.58	11.00 ± 1.00	14.33 ± 4.04	14.67 ± 3.06
Enterococcus faecalis JCM 5803	0	10.67 ± 0.58	11.70 ± 0.52	14.00 ± 2.65	14.67 ± 2.52
Pseudomonas fluorescens JCM 5963	0	9.17 ± 0.76	10.00 ± 0.00	12.00 ± 0.00	13.33 ± 0.58
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	0	8.83 ± 1.26	12.17 ± 2.57	13.50 ± 1.50	14.67 ± 1.53
Aeromonas hydrophila TISTR 1321	0	10.33 ± 0.58	11.00 ± 1.00	13.33 ± 2.08	19.33 ± 6.51
Listeria innocua ATCC 33090	0	10.67 ± 1.15	12.33 ± 1.15	12.67 ± 0.58	15.00 ± 1.00
Brochotrix campestris NBRC 11547	0	13.00 ± 3.61	14.80 ± 2.88	16.00 ± 2.00	19.67 ± 3.79

ชุดควบคุม หมายถึง ใช้น้ำกลั่นหยดแทนน้ำมันหอมระเหย

1.2.2 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยกระเพราต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ minimal inhibition concentration (MIC) ด้วยวิธี micro-dilution broth susceptibility assay (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999)

จากการนำน้ำมันหอมระเหยโหระพาปริมาตรที่เหมาะสมที่ได้ มาศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยกระเพราต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แล้วสังเกตหลอดที่มีตะกอน (pellet) สีขาวที่ก้นหลอด รายงานผลเป็น (+) ส่วนหลอดที่ไม่มีจุลินทรีย์ทดสอบขึ้นหรือหลอดที่ไม่มีตะกอน (pellet) รายงานผล (-) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายที่ไม่มีตะกอนหมายถึงความเข้มข้นที่ต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC) ดังตาราง 7

พบว่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยกระเพราที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *L.sakei* TISTR 890, *E. faecalis* TISTR 888, *Streptococcus* sp. TISTR 1030 มีค่า MIC เท่ากับ 625 ppm.

L. sakei subsp. *sakei* JCM 1157^{T}, *S. aureus* TISTR 118, *P. fluorescens* TISTR 358, *A. hydrophila* TISTR 1321, *B. campeatris* NBRC 11547^{T} มีค่า MIC เท่ากับ 1,250 ppm.

L. plantarum ATCC 14917, *L. mesenteroides* subsp.*mesenteroides* JCM 6124^{T}, *L. mesenteroides* subsp.*mesenteroides* TISTR 942, *E. faecalis* JCM 5803^{T}, *P. fluorescens* JCM 5963^{T}, *L. innocua* ATCC 33090^{T} มีค่า MIC เท่ากับ 2,500 ppm.

S. Typhimurium TISTR 292, *E. coli* TISTR 780 มีค่า MIC เท่ากับ 5,000 ppm

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยกระเพราต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

เชื้อทดสอบ	การเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว										MIC
	ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยกระเพรา (ppm.)										
	Growth control	Negative control	5,000	2,500	1,250	625	312.5	156.25	78.12	39.06	
Lactobacillus plantarum ATCC 14917	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	2,500
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JCM 1157	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Lactobacillus sakei TISTR 890	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	625
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* JCM 6124	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	2,500
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* TISTR 942	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	2,500
Enterococcus faecalis TISTR 888	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	625
Streptococcus sp. TISTR 1030	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	625
Salmonella Typhimurium TISTR 292	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	5,000
Escherichia coli TISTR 780	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	5,000
Staphylococcus aureus TISTR 118	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Enterococcus faecalis JCM 5803	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	2,500
Pseudomonas fluorescens JCM 5963	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	2,500
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Aeromonas hydrophila TISTR 1321	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Listeria innocua ATCC 33090	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	2,500
Brochotrix campestris NBRC 11547	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250

(+) เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (พบตะกอน)

(-) ไม่พบการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ไม่พบตะกอน)

Growth control หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อ + เชื้อทดสอบ

Negative control หมายถึง 0.5% tween80 + อาหารเลี้ยงเชื้อ + เชื้อทดสอบ

1.2.3 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยกระเพราต่อการทำลายจุลินทรีย์ (minimal bactericidal concentration ; MBC) ด้วยวิธี micro-dilution broth susceptibility assay (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999)

จากการทดสอบหาค่า MIC ในการทดลองที่ 1.2.2 ให้นำหลอดทุกหลอดมา streak ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม จากนั้นนำไปบ่ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รายงานผลเป็น (+) กรณีที่เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รายงานผลเป็น (–) ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายที่เชื้อจุลินทรีย์ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถทำลายจุลินทรีย์ทดสอบได้ (MBC)

พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยกระเพราที่สามารถทำลายจุลินทรีย์ *L. sakei* TISTR 890, *E. faecalis* TISTR 888 , *Streptococcus* sp. TISTR 1030 มีค่า MBC ได้เท่ากับ 625 ppm.

L. sakei subsp. *sakei* JCM 1157^{T} , *S. aureus* TISTR 118, *P. fluorescens* TISTR 358, *A. hydrophila* TISTR 1321, *B. campeatris* NBRC 11547^{T} ส่วน มีค่า MBC เท่ากับ 1,250 ppm.

L. plantarum ATCC 14917, *Leu. mesenteroides* subsp.*mesenteroides* JCM 6124^{T}, *Leu. mesenteroides* subsp.*mesenteroides* TISTR 942, *E. faecalis* JCM 5803^{T}, *P. fluorescens* JCM 5963, *L. innocua* ATCC 33090^{T} มีค่า MBC เท่ากับ 2,500 ppm.

S. Typhimurium TISTR 292, *E. coli* TISTR 780 มีค่า MBC เท่ากับ 5,000 ppm.

ตารางที่ 8 ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยกระเพราต่อการทำลายจุลินทรีย์

เชื้อทดสอบ	การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง								MBC
	ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโหระพา (ppm.)								
	5,000	2,500	1,250	625	312.5	156.25	78.12	39.06	
Lactobacillus plantarum ATCC 14917	-	-	+	+	+	+	+	+	2,500
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JCM 1157	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Lactobacillus sakei TISTR 890	-	-	-	-	+	+	+	+	625
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* JCM 6124	-	-	+	+	+	+	+	+	2,500
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* TISTR 942	-	-	+	+	+	+	+	+	2,500
Enterococcus faecalis TISTR 888	-	-	-	-	+	+	+	+	625
Streptococcus sp. TISTR 1030	-	-	-	-	+	+	+	+	625
Salmonella Typhimurium TISTR 292	-	+	+	+	+	+	+	+	5,000
Escherichia coli TISTR 780	-	+	+	+	+	+	+	+	5,000
Staphylococcus aureus TISTR 118	-	-	-	+	+	+	+	+	1250
Enterococcus faecalis JCM 5803	-	-	+	+	+	+	+	+	2500
Pseudomonas fluorescens JCM 5963	-	-	+	+	+	+	+	+	2,500
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Aeromonas hydrophila TISTR 1321	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250
Listeria innocua ATCC 33090	-	+	+	+	+	+	+	+	5,000
Brochotrix campestris NBRC 11547	-	-	-	+	+	+	+	+	1,250

(+) เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

(-) ไม่พบการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

ส่วนที่ 2 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราที่มีต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพทางกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด

ทำการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราที่มีต่อที่มีต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพทางกายภาพของเนื้อสุกรบด โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลองย่อย คือ

การทดลองที่ 2.1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพา ที่มีต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพทางกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด

การทดลองที่ 2.2 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยกระเพราที่มีต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพทางกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด

โดยนำเอาเนื้อสันนอกสุกรบดบรรจุกล่องพลาสติก แล้วหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราบนกระดาษกรองติดไว้บริเวณฝากล่องใช้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยแบ่งเป็น 2 ชุดการทดสอบ คือ ใช้กระดาษกรอง 1 แผ่น หยด 20 ไมโครลิตร และ ใช้กระดาษกรอง 2 แผ่น หยดแผ่นละ 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำกล่องพลาสติกไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มตัวอย่างที่ระยะเวลา 0, 1, 3 และ 5 วัน โดยสุ่มตรวจคุณภาพด้านจุลินทรีย์ ได้แก่ จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ จำนวนเชื้อราและยีสต์ จำนวนโคลิฟอร์ม (Coliform) อีโคไล (*E. coli*) และ คุณภาพด้านกายภาพ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าสีของเนื้อ และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำระหว่างการเก็บรักษา ผลการทดลองมีดังนี้

การทดลองที่ 2.1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพา ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพทางกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด

1. คุณภาพด้านจุลินทรีย์

จากการสุ่มตัวอย่างเนื้อสันนอกสุกรบดก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก พบว่าในแต่ละระยะเวลาในการเก็บรักษาและชุดทดสอบทั้ง 3 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กล่าวคือ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด มีค่าเริ่มต้น 4.66 log cfu/g. ทั้งที่ใช้กระดาษกรอง 1 แผ่น หยด 20 ไมโครลิตร และ ใช้กระดาษกรอง 2 แผ่น หยดแผ่นละ 10 ไมโครลิตร ซึ่งไม่มีค่าต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ภายหลังนำกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาติดบนฝากล่องพลาสติก พบจุลินทรีย์ทั้งหมดทั้ง 3 กลุ่ม ไม่แตกต่างกัน($P>0.05$)

เท่ากับ 4.65, 4.62 และ 4.61 ตามลำดับ หลังจากนั้นจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ โดยเมื่อครบวันที่ 5 ค่าจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ได้ ของ ชุดควบคุม , 1 แผ่น และ 2 แผ่น เท่ากับ 4.75, 4.80 และ 4.95 log cfu/g. ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ตั้งแต่วันแรกที่ทำการทดลอง ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดการทดสอบ	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g)				
	Before	After	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	4.66	4.65	4.75	4.70	4.75
1 แผ่น	4.66	4.62	4.55	4.89	4.80
2 แผ่น	4.66	4.61	4.67	4.75	4.95

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

จากการทดลองตารางที่ 10 พบว่า จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำก่อนและหลังติดแผ่นกระดาษกรอง ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ในชุดควบคุม และกลุ่มที่ใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพา 1 แผ่น และ 2 แผ่น โดยภายหลัง วันที่ 1 วันที่ 3 และวันที่ 5 ของการติดกระดาษกรองที่มีน้ำมันหอมระเหยโหระพาทั้ง 1 แผ่น และ 2 แผ่น จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำมีค่าสูงขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยชุดควบคุม 1 แผ่น และ 2 แผ่น ในวันที่ 5 ของการทดสอบ มีค่าเท่ากับ 4.75, 4.80 และ 4.95 log cfu/g ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) และเมื่อเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นานขึ้น พบการเพิ่มขึ้นในวันที่ 5 ของการเก็บโดยในกลุ่มควบคุม 1 แผ่น และ 2 แผ่น จำนวนจุลินทรีย์มีค่า 5.51, 5.32 และ 5.40 log cfu/g ตามลำดับ

ตารางที่ 10 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดการทดสอบ	จำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ (log CFU/g)				
	Before	After	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	4.72	4.75	4.84	3.87	5.51
1 แผ่น	4.72	4.81	5.19	4.91	5.32
2 แผ่น	4.72	4.69	5.00	4.79	5.40

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

จำนวนราและยีสต์บนเนื้อสุกรบดทั้ง 3 กลุ่ม ไม่มีค่าต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีค่าใกล้เคียงกับเริ่มต้น และในแต่ละวันจำนวนเชื้อราและยีสต์มีค่าใกล้เคียงกันทั้ง 3 ชุดการทดสอบ ซึ่งในวันเริ่มต้น มีค่าเท่ากับ 3.30 log cfu/g. ซึ่งพบว่าไม่มีค่าต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อผ่านไป 5 วัน เชื้อราและยีสต์ของ control , 1 แผ่น และ 2 แผ่น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.29, 3.38 และ 3.19 log cfu/g. ตามลำดับ ($P>0.05$) ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวนราและยีสต์ของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดการทดสอบ	ราและยีสต์ (log CFU/g)				
	Before	After	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	3.30	2.85	2.82	3.32	3.29
1 แผ่น	3.30	2.97	2.89	3.09	3.38
2 แผ่น	3.30	2.99	2.74	3.14	3.19

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

โคลิฟอร์มบนเนื้อสุกรบดทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าไม่มีค่าต่างกันทางสถิติ (P>0.05) โดยในวันเริ่มต้นมีจำนวนเท่ากัน คือ 3.39 log MPN/g ซึ่งลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานาน 5 วัน ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) กล่าวคือ ชุดควบคุม ชุดที่ใช้กระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาติดไว้บริเวณฝากล่อง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จำนวน 1 แผ่น และ ใช้กระดาษกรอง 2 แผ่น หยดน้ำมันหอมระเหยแผ่นละ 10 ไมโครลิตร มีจำนวนโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ในวันที่ 5 เท่ากับ และ 2.71, 2.77 และ 2.72 log MPN/g ตามลำดับ ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวนโคลิฟอร์มของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดการทดสอบ	โคลิฟอร์ม (log MPN/g)				
	Before	After	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	3.39	3.39	3.15	2.77	2.71
1 แผ่น	3.39	3.33	3.05	2.91	2.77
2 แผ่น	3.39	3.39	3.14	2.97	2.72

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

การศึกษาครั้งนี้ตรวจไม่พบ *E. coli* ในเนื้อสันนอกสุกรบดทั้ง 3 ชุดการทดสอบ ได้แก่ ชุดควบคุม ชุดที่ติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาทั้ง 1 และ 2 แผ่น ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 5 วัน ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวน *E. coli* ของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดการทดสอบ	จำนวน *E.coli* (log MPN/g)				
	Before	After	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
1 แผ่น	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
2 แผ่น	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

2. คุณภาพด้านกายภาพ

จากการสุ่มตัวอย่างเนื้อสุกรบดก่อนติดแผ่นกระดาษกรองชุดควบคุม ชุดที่หยดน้ำมันหอมระเหยโหระพา 1 แผ่น และ 2 แผ่น พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างของเนื้อสันนอกสุกรบดเริ่มต้นเท่ากับ 5.79, 5.76 และ 5.68 ซึ่งไม่มีค่าต่างกันทางสถิติ (P>0.05) และภายหลังการติดกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพา และในวันที่ 1 ก็พบว่าค่าความเป็นกรดด่างไม่มีค่าต่างกันทางสถิติ (P>0.05) เมื่อเก็บจนถึงวันที่ 3 และ 5 กลับพบความแตกต่างของค่าความเป็นกรดด่าง กล่าวคือ ระยะเวลา 3 วัน ค่าความเป็นกรดด่างของชุดควบคุมกับติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพา 1 แผ่น และ 2 แผ่น ไม่มีค่าต่างกันทางสถิติ (P>0.05) แต่มีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05) ระหว่างชุดที่ติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพา 1 แผ่น และ 2 แผ่น เท่ากับ 5.67, 5.72 และ 5.65 ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับระยะเวลา 5 วัน ค่าความเป็นกรดด่างของชุดควบคุมกับติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพา 1 แผ่น และ 2 แผ่น ไม่มีค่าต่างกันทางสถิติ (P>0.05) แต่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างชุดที่ติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพา 1 และ 2 แผ่น เท่ากับ 5.69, 5.75 และ 5.67 ตามลำดับ ดังตารางที่ 14 แต่เนื่องจากความแตกต่างเริ่มต้นของค่าความเป็นกรดด่างในแต่ละชุดทดสอบไม่เท่ากัน จึงต้องพิจารณาอัตราการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างในวันที่ 1, 3 และ 5 เทียบกับก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก (Before) พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 14 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าความเป็นกรดด่างของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดการทดสอบ	ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)				
	Before	After	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	5.79	5.75	5.70	5.67^{ab}	5.69^{ab}
1 แผ่น	5.76	5.71	5.71	5.72^{a}	5.75^{a}
2 แผ่น	5.68	5.67	5.64	5.65^{b}	5.67^{b}

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

^{a,b} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 15 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่ออัตราการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดการทดสอบ	อัตราการลดลงของค่าความเป็นกรดด่าง *			
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	0.04	0.09	0.12	0.10
1 แผ่น	0.05	0.05	0.04	0.01
2 แผ่น	0.01	0.04	0.03	0.01

*อัตราการลดลงของค่าความเป็นกรดด่าง หมายถึง ค่าความเป็นกรดด่างของ Before - ค่าความเป็นกรดด่างของ After, วันที่ 1, 3 และ 5

ค่าเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษาของเนื้อสันนอกสุกรบดของชุดควบคุม ชุดติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพา 1 และ 2 แผ่น พบว่าในทุกชุดการทดสอบและระยะเวลาการเก็บรักษาตั้งแต่ 1 ถึง 5 วัน เนื้อสุกรบดมีเปอร์เซนต์เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และเพียงเล็กน้อยซึ่งไม่มีค่าแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อค่าเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษาของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดการทดสอบ	การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษา (%)		
	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	0.32	0.57	0.47
1 แผ่น	0.72	0.82	0.85
2 แผ่น	0.78	1.32	1.36

ค่าสีของเนื้อสันนอกสุกรบด พบว่า แต่ละระยะเวลาในการเก็บรักษาและชุดทดสอบทั้ง 3 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กล่าวคือ ค่าความสว่าง (Lightness, L*) พบว่า ชุดควบคุม ก่อนติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพา 1 และ 2 แผ่น มีค่าความสว่างเท่ากับ 53.96, 53.70 และ 53.86 ตามลำดับ จากนั้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา พบว่า ค่าความ

สว่างลดลงและไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) จนกระทั่งวันที่ 5 มีค่าความสว่างเท่ากับ 52.24, 52.34 และ 52.07 ตามลำดับ (ตารางที่ 17)

ส่วนค่าสีแดง (Redness, a*) เป็นค่าที่บ่งบอกถึงระดับการมีสีแดงของเนื้อ โดยจากการทดลองตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานาน 5 วัน พบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาและชุดทดสอบทั้ง 3 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) โดยค่าสีแดงของเนื้อทั้งชุดควบคุม ซึ่งเพิ่มขึ้นจาก 14.26 เป็น 15.77 ส่วนชุดที่ติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพา 1 แผ่น เพิ่มจาก 14.26 เป็น 15.77 และ 2 แผ่น เพิ่มจาก 14.20 เป็น 15.76 ตามลำดับ (ตารางที่ 18)

สำหรับค่าสีเหลือง (yellowness, b*) คือค่าที่บ่งบอกถึงระดับการมีสีเหลืองของเนื้อ จากการทดลองพบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาและชุดทดสอบทั้ง 3 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) เช่นเดียวกันกับค่าความสว่างและค่าสีแดง โดยชุดควบคุม เนื้อสันนอกสุกรบดติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพา 1 และ 2 แผ่น พบว่า ค่าสีเหลือง เท่ากับ 6.47, 6.40 และ 6.49 จากนั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 6.86, 6.82 และ 6.77 ซึ่งไม่แตกต่างจากชุดควบคุมตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานาน 5 วัน (P>0.05) ดังตารางที่ 19

ตารางที่ 17 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าความสว่าง (L*) ของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดทดสอบ	ค่าความสว่าง (L*)				
	Before	After	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	53.96	54.95	53.04	52.63	52.24
1 แผ่น	53.70	54.05	52.79	52.74	52.34
2 แผ่น	53.86	54.64	53.20	52.69	52.07

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

ตารางที่ 18 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าสีแดง (Redness, a*) ของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดทดสอบ	ค่าสีแดง (Redness, a*)				
	Before	After	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	14.26	14.69	15.08	15.68	15.77
1 แผ่น	14.26	14.81	15.17	15.28	15.77
2 แผ่น	14.20	14.89	15.05	15.31	15.76

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

ตารางที่ 19 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าสีเหลือง (yellowness, b*) ของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดทดสอบ	ค่าสีแดง (Redness, a*)				
	Before	After	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	6.47	6.58	6.66	6.80	6.86
1 แผ่น	6.40	6.57	6.68	6.70	6.82
2 แผ่น	6.49	6.57	6.61	6.74	6.77

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก

การทดลองที่ 2.2 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยกระเพราที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพทางกายภาพของเนื้อสุกรบด

1. ด้านคุณภาพทางจุลินทรีย์

จากการสุ่มตัวอย่างเนื้อสุกรบดของชุดควบคุม ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพรา พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด มีค่าเริ่มต้น 4.66 log cfu/g. หลังจากนั้น 10 นาที นำมานับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอีกครั้งได้เท่ากับ 4.65, 4.73 และ 4.78 log cfu/g โดยทุกชุดการทดสอบและระยะเวลาในทุกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยรวมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนครบวันที่ 5 ของการสุ่ม และการเพิ่มขึ้นโดยรวมในแต่ละวันของจำนวนจุลินทรีย์

ทั้งหมดทั้ง 3 ชุดการทดสอบ มีค่าใกล้เคียงกันอย่างมาก เมื่อครบวันที่ 5 ค่าจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ได้ของ ชุดควบคุม , 1 แผ่น และ 2 แผ่น เท่ากับ 4.75, 5.06 และ 5.07 log cfu/g. ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยกระเพราและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดการทดสอบ	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)				
	Before	After	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	4.66	4.65	4.75	4.70	4.75
1 แผ่น	4.66	4.73	4.99	4.76	5.06
2 แผ่น	4.66	4.78	4.58	4.65	5.07

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ พบว่าน้ำมันหอมระเหยกระเพรามีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ กล่าวคือ จากการสุ่มตรวจจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำของชุดควบคุม ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรอง 1 แผ่น หยด 20 ไมโครลิตร และ ใช้กระดาษกรอง 2 แผ่น หยดแผ่นละ 10 ไมโครลิตร ที่หยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก มีค่าเริ่มต้น 4.72 log cfu/g. และหลังจากนั้น 10 นาที นำมาตรวจอีกครั้ง มีค่าเท่ากับ 4.75, 4.52 และ 4.86 log cfu/g. ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) โดยเมื่อเก็บนาน 3 วัน จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำลดลงตามกันทั้ง 3 ชุดการทดสอบ แต่เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษานาน 5 วัน จำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกลับเพิ่มขึ้นอีก 2 log cfu/g และมีค่าสูงกว่าวันเริ่มต้นทั้งชุดควบคุม , 1 แผ่น และ 2 แผ่น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.51, 5.71 และ 5.82 log cfu/g. ตามลำดับ และมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยกระเพราและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำของเนื้อสันนอกสุกรบด

	จำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ (log CFU/g)				
	Before	After	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	4.72	4.75	4.84	3.87	5.51
1 แผ่น	4.72	4.52	5.02	3.61	5.71
2 แผ่น	4.72	4.86	5.10	4.29	5.82

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

ราและยีสต์ พบว่าในทุกชุดการทดสอบและระยะเวลาตั้งแต่เริ่มต้นจนครบวันที่ 5 มีค่าใกล้เคียงกันและมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ซึ่งในวันเริ่มต้น มีค่าเท่ากับ 3.30 log cfu/g. เมื่อผ่านไป 5 วัน เชื้อราและยีสต์ของชุดควบคุม, 1 แผ่น และ 2 แผ่น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.29, 3.45 และ 3.33 log cfu/g. ตามลำดับ ดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวนราและยีสต์ของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดการทดสอบ	ราและยีสต์ (log CFU/g)				
	Before	After	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	3.30	2.85	2.82	3.32	3.29
1 แผ่น	3.30	2.68	2.82	3.81	3.45
2 แผ่น	3.30	2.86	2.93	3.70	3.33

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

โคลิฟอร์มในวันเริ่มต้นมีจำนวนเท่ากัน คือ 3.26 log MPN/g แล้วลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานาน 5 วัน และมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กล่าวคือ ชุดควบคุม ชุดที่ติดกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพรา ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จำนวน 1 แผ่น และ ใช้กระดาษกรอง 2 แผ่น หยดน้ำมันหอมระเหยแผ่นละ 10 ไมโครลิตร มีจำนวนโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ในวันที่ 5 เท่ากับ 2.71, 2.65 และ 2.71 log MPN/g ตามลำดับ ดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยกระเพราและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวนโคลิฟอร์มของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดการทดสอบ	โคลิฟอร์ม (log MPN/g)				
	Before	After	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	3.26	3.37	3.16	2.94	2.71
1 แผ่น	3.26	2.98	2.85	2.81	2.65
2 แผ่น	3.26	2.98	2.95	2.80	2.71

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

การศึกษาครั้งนี้ตรวจไม่พบ *E. coli* ในเนื้อสันนอกสุกรบดทั้ง 3 ชุดการทดสอบ ได้แก่ ชุดควบคุม ชุดที่ติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาทั้ง 1 และ 2 แผ่น ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 5 วัน ดังตารางที่ 24

ตารางที่ 24 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยกระเพราและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อจำนวน *E.coli* ของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดการทดสอบ	จำนวน *E.coli* (log MPN/g)				
	Before	After	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
1 แผ่น	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
2 แผ่น	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

2. ด้านคุณภาพทางกายภาพ

จากการสุ่มตัวอย่างเพื่อวัดค่าความเป็นกรดด่างเนื้อสุกรบดของชุดควบคุมก่อนติดกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพรา 1 และ 2 แผ่น พบว่า มีค่าเท่ากับ 5.79, 5.76 และ 5.75 ตามลำดับ หลังจากนั้น 10 นาที วัดค่าความเป็นกรดด่างอีกครั้ง ได้เท่ากับ 5.76, 5.73 และ 5.71 ซึ่งไม่มีค่าแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อครบวันที่ 1 วัดค่าความเป็นกรดด่างของชุดที่ติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพรา 2 แผ่น มีค่าต่ำสุด เท่ากับ 5.66 โดยที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกันทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุมและชุดที่ติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพรา 1 แผ่น (5.71 และ 5.73) ในวันที่ 3 กลับพบว่า ค่าความเป็นกรดด่างของทั้ง 3 ชุดการทดสอบ มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเก็บรักษาต่อถึงวันที่ 5 วัดค่าความเป็นกรดด่าง ได้เท่ากับ 5.74, 5.73 และ 5.68 ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ดังภาพที่ 25 แต่เนื่องจากความแตกต่างเริ่มต้นของค่าความเป็นกรดด่างในแต่ละชุดทดสอบไม่เท่ากัน จึงต้องพิจารณาอัตราการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างในวันที่ 1, 3 และ 5 เทียบกับก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาบนฝากล่องพลาสติก (Before) พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ในวันที่ 0, 1 และ 5 ส่วนวันที่ 3 พบว่าชุดควบคุมมีอัตราการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างน้อยที่สุด (0.07) แต่ไม่ต่างกับชุดที่ติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพรา 1 และ 2 แผ่น ดังตารางที่ 26

ตารางที่ 25 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าความเป็นกรดด่างของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดการทดสอบ	ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)				
	Before	After	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	5.79	5.76	5.71[a]	5.71[b]	5.74
1 แผ่น	5.76	5.73	5.73[a]	5.75[a]	5.73
2 แผ่น	5.75	5.71	5.66[b]	5.65[c]	5.68

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 26 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยกระเพราและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่ออัตราการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดการทดสอบ	อัตราการลดลงของค่าความเป็นกรดด่าง *			
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	0.01	0.07	0.07[ab]	0.02
1 แผ่น	0.03	0.03	0.02[b]	0.03
2 แผ่น	0.06	0.06	0.11[a]	0.11

*อัตราการลดลงของค่าความเป็นกรดด่าง หมายถึง ค่าความเป็นกรดด่างของ Before - ค่าความเป็นกรดด่างของ After, วันที่ 1, 3 และ 5

จากตารางที่ 27 พบว่าค่าเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษาเนื้อสันนอกสุกรบดชุดควบคุม ในวันที่ 1 มีค่าต่ำที่สุด เท่ากับ 0.67 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับวันที่ 3 และ 5 (0.33 และ 0.49) ส่วนชุดที่ติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพา 1 และ 2 แผ่น พบว่า ค่าเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษาไม่มีค่าแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ตลอดระยะเวลาการเก็บตั้งแต่วันที่ 1, 3 และ 5 โดยมีเปอร์เซนต์ลดลงเพียงเล็กน้อย

ตารางที่ 27 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษา ของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดการทดสอบ	ค่าการสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษา (%)		
	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	0.67[a]	0.33[b]	0.49[ab]
1 แผ่น	1.01	0.49	0.76
2 แผ่น	1.17	0.53	0.88

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

[a, b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ค่าสีของเนื้อสันนอกสุกรบด ได้แก่ ค่าความสว่าง (Lightness, L*) ค่าสีแดง (Redness, a*) และ ค่าสีเหลือง (yellowness, b*) ของเนื้อสันนอกสุกรบด พบว่าทั้ง 3 ชุดการทดสอบและตลอดระยะเวลาทั้ง 5 วัน ที่ทำการวัดค่าสีซึ่งผลที่ได้มีค่าไม่แตกต่างทางสถิติ (P>0.05) โดย ค่าความสว่างของชุดควบคุม ชุดที่ติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพา 1 และ 2 แผ่น พบว่า มีค่าลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานาน 5 วัน จาก 53.96 เป็น 52.24, 53.84เป็น 52.32 และ 53.87 เป็น 52.34 ตามลำดับ โดยค่าที่ได้ไม่แตกต่างทางสถิติ (P>0.05) ดังตารางที่ 28

ส่วนค่าสีแดง (Redness, a*) ของเนื้อสันนอกสุกรบดตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานาน 5 วัน พบว่าค่าสีแดงของเนื้อมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทั้ง 3 ชุดการทดสอบ แต่มีค่าไม่แตกต่างทางสถิติ (P>0.05) ซึ่งชุดควบคุม ก่อนติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพา 1 และ 2 แผ่น มีค่าความสีแดง เท่ากับ 14.26, 14.48 และ 14.95 ตามลำดับ จากนั้นตลอดระยะเวลา 5 วัน ค่าสีแดงเพิ่มขึ้นเท่ากับ 15.77, 15.79 และ 15.67 ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังตารางที่ 29

สำหรับค่าสีเหลือง (yellowness, b*) ของเนื้อสันนอกสุกรบดชุดควบคุม ชุดที่ติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพรา 1 และ 2 แผ่น พบว่า มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตั้งแต่วันแรก จนตลอดระยะเวลา 5 วัน โดยเพิ่มจาก 6.47 เป็น 6.86, 6.50 เป็น 6.74 และ 6.49 เป็น 6.77 โดยระยะเวลาและทุกชุดการทดสอบมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ(P>0.05) ดังตารางที่ 30

ตารางที่ 28 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าความสว่าง (L*) ของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดการทดสอบ	ค่าความสว่าง (L*)				
	Before	After	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	53.96	54.95	53.04	52.63	52.24
1 แผ่น	53.84	54.19	52.88	52.69	52.32
2 แผ่น	53.87	53.78	52.32	52.94	52.34

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

ตารางที่ 29 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าสีแดง (Redness, a*) ของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดการทดสอบ	ค่าสีแดง (Redness, a*)				
	Before	After	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	14.26	14.69	15.08	15.68	15.77
1 แผ่น	14.48	14.65	15.45	15.67	15.79
2 แผ่น	14.95	14.93	15.34	15.85	15.67

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

ตารางที่ 30 ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อค่าสีเหลือง (yellowness, b*) ของเนื้อสันนอกสุกรบด

ชุดการทดสอบ	ค่าสีเหลือง (yellowness, b*)				
	Before	After	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5
ชุดควบคุม	6.47	6.58	6.66	6.80	6.86
1 แผ่น	6.50	6.52	6.67	6.76	6.74
2 แผ่น	6.49	6.58	6.57	6.78	6.77

Before : ก่อนการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

After : หลังการติดแผ่นกระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยกระเพราบนฝากล่องพลาสติก

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

ส่วนที่ 1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาและกระเพราในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ (*In vitro*)

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพาในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ (*In vitro*)

จากศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพา ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีแพร่ผ่านแผ่นกระดาษกรอง (Disc diffusion method) แล้วอ่านผลจากบริเวณใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นจากผลการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่า น้ำมันหอมระเหยโหระพาสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทุกกลุ่มและทุกปริมาตร ได้แก่ แบคทีเรียแลคติก เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และ แบคทีเรียแกรมลบ ที่ปริมาตร 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร โดยน้ำมันหอมระเหยโหระพาสามารถยับยั้ง *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR 942 ได้ที่สุดสอดคล้องกับทดลองของ ดวงฤดี หวั้นหนู (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. hydrophila* TISTR 1321 มีประสิทธิภาพดีที่สุด เนื่องจาก *Leu. mesenteroides* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ส่วน *A. hydrophila* เป็นแกรมลบ ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกมีความไวต่อสารต้านจุลินทรีย์จากน้ำมันหอมระเหยมากกว่า

แบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบจะมีผนังเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่ม Lipopolysaccharide จึงทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีความแข็งแรงมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (ปทุม อรุณวัชรินทร์และคณะ, 2550) นอกจากนี้การผันแปรของค่า MIC ขึ้นอยู่กับชนิดของสารอิมัลซิไฟเออร์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายอีกด้วย (Suppakul *et al.* 2003) โดยสาเหตุที่การยับยั้งแตกต่างกันกับการศึกษาที่ผ่านมา เนื่องจากประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับ สายพันธุ์จุลินทรีย์ พฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบ ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย ฤดูกาล ช่วงระยะเวลาเก็บเกี่ยว อายุของใบโหระพา (Chang *et al.* 2009) พันธุ์ของโหระพา (Runyaro. 2009) ส่วนของต้นที่นำมาสกัด (ลำต้น ใบ และดอก) (Rattanachaikunsopon. 2010) แหล่งเพาะปลูก (จารุภา วิโยชน์, 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 ทำให้มีผลกระทบต่อการทำงานภายในเซลล์และทำให้เซลล์ตายได้, รบกวนหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์โดยไปละลายชั้นไขมัน (phosphol lipid bilayer) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งประสิทธิภาพของเซลล์ในการควบคุมการซึมผ่านของสาร (osmotic barrier) ลดลง เป็นสาเหตุให้น้ำซึมผ่านเข้าเซลล์เพิ่มขึ้นและทำให้ผนังเซลล์เกิดการฉีกขาด ทำให้สูญเสียสารประกอบภายในเซลล์ เซลล์จึงตายในที่สุด, ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากโปรตีนจะเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ปกติ และมีผลต่อระบบพันธุกรรมของเชื้อ ซึ่งไปทำลายหรือทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ได้ช้าลง

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากกระเพรา ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ (*In vitro*)

จากการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยกระเพราสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทุกชนิด ซึ่งจากผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เกิดจากองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในน้ำมันหอมระเหยกระเพราคือ

Eugenol, Methyl Eugenol และ Linalool โดยสาร 2 ตัวแรกอยู่ในกลุ่มของสารประกอบ Phenol ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ในขบวนการ Metabolism ของเชื้อแบคทีเรียโดยทำให้เอนไซม์และโปรตีนอื่นๆ ในเซลล์เสียสภาพ เกิดการบาดเจ็บที่เยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลทำให้สารต่างๆภายในเซลล์ไหลออกสู่ภายนอก ส่วน Linalool นั้นเป็นสารที่มีฤทธิ์ช่วยส่งเสริมการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย จึงเป็นผลให้กระเพรามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (วิชุดาและแหม่ม. 2550) นอกจากนี้ผลการศึกษายังสอดคล้องกับ 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.eroginosa* 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 4.2µl/ml. ส่วน *S.*Typhimurium DT104 ได้ MIC เท่ากับ >62.5 µl/ml.

ส่วนที่ 2 ศึกษาความสามารถของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และคุณภาพด้านกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด

1. คุณภาพด้านจุลินทรีย์

จากการนำเนื้อสันนอกสุกรบดบรรจุกล่องพลาสติกแล้วหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราบนกระดาษกรองติดไว้บริเวณฝากล่องโดยใช้ปริมาตรรวม 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) ที่กำหนดให้มีค่า ต่ำกว่า 5 log cfu/g. และต้องไม่พบ *E.coli* จากผลดังกล่าวจะเห็นว่าเนื้อสุกรที่นำมาใช้ในการทดลองผ่านกระบวนการผลิตที่ดี ส่วนผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด จุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ และ เชื้อราและยีสต์ ของทั้งน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราให้ผลไปในทางเดียวกัน มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) คือ เมื่อหยดน้ำมันหอมระเหย 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 แต่เมื่อระยะการเก็บนานขึ้นจำนวนของเชื้อทั้งสองลดลง เนื่องจากทั้งเชื้อโคลิฟอร์มและอีโคไลถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อนและความเย็น (ศศิธร คณะรัตน์และกาญจณี ธรรมาพิพัฒน์กุล. 2534) จึงทำให้มีจำนวนที่ลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น

จากการที่น้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราไม่สามารถลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อสันนอกบดได้นั้น ซึ่งแตกต่างจากการทดลองข้างต้นที่น้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ใน *in vitro* ได้ดี เนื่องจากว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนในเนื้อสุกรมีหลายชนิด ได้แก่ *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *E. coli*, *Yersinia* sp. และ *Listeria* sp. โดยการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ นอกจากจะทำให้เนื้อสัตว์ปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษแล้ว ยังทำให้เนื้อสัตว์เน่าเสียเร็วกว่าปกติ (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2542) ปกติแล้วปริมาณเชื้อตั้งต้นที่มีอยู่ในเนื้อสุกรมีผลต่อการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเช่นกัน ซึ่งหากเชื้อจุลินทรีย์ที่น้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราสามารถยับยั้งได้มีน้อยกว่าทำให้ไม่พบการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโหระพาอาจไม่เพียงพอที่จะยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ 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 แต่เมื่อนำมาใช้กับแหนมต้องใช้ความเข้มข้น 100 และ 150 ppm. ซึ่งความเข้มข้นมากกว่าถึง 5-7.5 เท่า จึงจะสามารถยับยั้งได้ โดยมีผลต่อการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคคือ ที่ความเข้มข้น 100 ppm. ผู้บริโภคให้การยอมรับ ส่วนที่ 150 ppm. ไม่ให้การยอมรับโดยรวม

นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราจะสัมผัสเฉพาะส่วนผิวหน้าเนื้อสุกรบดเท่านั้น และน้ำมันหอมระเหยยังไม่ได้สัมผัสกับเนื้อสุกรบดเพียงอย่างเดียวแต่ส่วนหนึ่งจะไปจับกับ organic matter โปรตีน ไขมันต่างๆ ที่อยู่ในเนื้อ และไขมันจะป้องกันตัวเซลล์ด้านนอก (Zhang *et al.* 2009) ทำให้สารที่จะจับกับเชื้อจุลินทรีย์มีจำนวนน้อยลง น้ำมันหอมระเหยจึงไม่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ เพราะเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ได้ถูกสารจับจะมีชีวิตรอดและเพิ่มปริมาณขึ้นอีกเมื่อสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ (คมแข พิลาสมบัติ. 2553) ดังนั้นปัจจัยที่จะต้องคำนึงถึงในการนำน้ำมันหอมระเหยมาใช้กับเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ คือ องค์ประกอบของอาหาร ได้แก่ ปริมาณน้ำ โปรตีน ค่าความเป็นกรด-ด่าง เกลือ วัตถุเจือปนอาหาร และ ปัจจัยด้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn. 2010)

2. คุณภาพด้านกายภาพ

ด้านค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของเนื้อสันนอกสุกรบดที่มีการติดกระดาษกรองที่หยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราไว้บริเวณฝากล่อง 1 , 2 แผ่น และ control มีการลดลงเพียงเล็กน้อยและใกล้เคียงกันนั้น และจะลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น เช่นเดียวกับค่าเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างตามระยะเวลาในการเก็บรักษา ทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนในเนื้อต่ำลง (Warriss. 2005)

ผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราทั้งชุดควบคุม , กระดาษกรองที่หยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราไว้บริเวณฝากล่อง 1 และ 2 แผ่น ต่อค่าสี พบว่า ค่าความสว่าง (L*) ของเนื้อสันนอกสุกรบดมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาการเก็บมีระยะนานขึ้นและมีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Maneenin *et al.* (2010) ทดลองนำเนื้อสันนอกสุกรบดมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 5 วัน พบว่า ค่าความสว่าง (lightness, L*) ของตัวอย่างลดลงอย่างช้าๆ ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ในส่วนค่าสีแดงของเนื้อสันนอกสุกรบดจะมีค่าลดลงเมื่อเก็บนานขึ้น แสดงว่าสีของเนื้อค่อยเปลี่ยนจากสีแดงสดเป็นสีน้ำตาลของเมทไมโอโกลบิน ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากความสามารถในการจับกับออกซิเจนของไมโอโกลบินสูญเสียไปและเกิดการเสื่อมสภาพของไมโอโกลบินจึงทำให้สีของเนื้อเปลี่ยนไป (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539) ซึ่งสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นเป็นดัชนีที่บ่งถึงความไม่สดของเนื้อ แต่อย่างไรก็ตามการชะลอการเปลี่ยนแปลงของสีเนื่องจากการออกซิเดชันของออกซีไมโอโกลบินสามารถทำได้โดยการรักษาเนื้อสัตว์ที่อุณหภูมิต่ำ (สุรสีห์ วัฒนวิกกิจย์และคณะ, 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

บทที่ 6

สรุปและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยโหระพาปริมาตร 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีแพร่ผ่านแผ่นกระดาษกรอง แล้วอ่านผลจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นจากผลการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่า น้ำมันหอมระเหยโหระพาสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทุกชุดการทดสอบและทุกปริมาตร โดยน้ำมันหอมระเหยโหระพาสามารถยับยั้ง *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR 942 ได้ที่สุด โดยไม่พบจุลินทรีย์ทดสอบเจริญในจานเพาะเชื้อ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 45 มิลลิเมตร) ทั้งที่ปริมาตรน้ำมันหอมระเหย 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร แต่เมื่อพิจารณาปริมาตรน้ำมันหอมระเหยโหระพาที่หยดลงบนกระดาษกรอง พบว่าที่ปริมาตร 20 ไมโครลิตร สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้มีประสิทธิภาพสูงแต่ใช้น้ำมันหอมระเหยเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับที่ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เมื่อนำศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพา ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC) อยู่ในช่วง 625 – 2,500 ppm. และ มีความสอดคล้องกันกับความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพาต่อการทำลายจุลินทรีย์ minimal bactericidal concentration (MBC) อยู่ในช่วง 312.5 – 2,500 ppm. โดยขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อทดสอบ

ในทำนองเดียวกันศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยกระเพราในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีแพร่ผ่านแผ่นกระดาษกรองน้ำมันหอมระเหยกระเพราสามารถยับยั้ง *L. sakei* TISTR 890 ได้ดีที่สุด ทั้งที่ปริมาตร 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 14.67, 18.67, 19.33 และ 23.67 มิลลิเมตร ตามลำดับ และแต่เมื่อพิจารณาปริมาตรน้ำมันหอมระเหยโหระพาที่หยดลงบนกระดาษกรอง แล้วนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อทดสอบพบว่าที่ปริมาตร 20 ไมโครลิตร สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้มีประสิทธิภาพสูง จากนั้นศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยกระเพราต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC) อยู่ในช่วง 625 – 5,000 ppm. เช่นเดียวกันกับความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยโหระพาต่อการทำลาย

จุลินทรีย์ minimal bactericidal concentration (MBC) อยู่ในช่วง 625 – 5,000 ppm. โดยขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อทดสอบ

เมื่อนำเนื้อสันนอกสุกรบดบรรจุกล่องพลาสติกแล้วใช้กระดาษกรองหยดน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรา ติดไว้บริเวณฝากล่อง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จำนวน 1 แผ่น และใช้กระดาษกรอง 2 แผ่น หยดน้ำมันหอมระเหยแผ่นละ 10 ไมโครลิตร นำกล่องพลาสติกไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0, 1, 3 และ 5 วัน สุ่มตรวจประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพราที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ พบว่า มีค่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนเชื้อราและยีสต์ จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา นาน 5 วัน มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในทางตรงกันข้ามกลับพบจำนวนโคลิฟอร์มกลับลดลงและตรวจไม่พบ *E. coli* เมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น เช่นเดียวกันกับชุดควบคุม ส่วนคุณภาพทางด้านกายภาพของเนื้อสันนอกสุกรบด พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างของเนื้อสันนอกสุกรบดพบความแตกต่างระหว่างชุดควบคุม โดยในวันที่ 0 และ 1 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่พบความแตกต่างในช่วงวันที่ 3 และ 5 สำหรับการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพา ส่วนน้ำมันหอมระเหยกระเพราไม่พบความแตกต่างในวันที่ 0 และ 5 แต่พบความแตกต่างในวันที่ 1 และ 3 อย่างไรก็ตาม ค่าเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษาของทั้ง 3 ชุดการทดสอบ มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) นอกจากนี้ ค่าสี ได้แก่ ความสว่าง (L*) ค่าสีแดง(a*) และค่าสีเหลือง(b*) ก็มีค่าไม่แตกต่างเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

6.2 ข้อเสนอแนะ

จากการใช้น้ำมันหอมระเหยโหระพาและกระเพรากับเนื้อสันนอกสุกรบดถึงแม้ว่าจะใช้กระดาษกรอง 1 แผ่น หยด 20 ไมโครลิตร และ ใช้กระดาษกรอง 2 แผ่น หยดแผ่นละ 10 ไมโครลิตร ติดด้านบนฝากล่องพลาสติก แต่ยังพบว่ามีกลิ่นของโหระพาและกระเพราติดอยู่กับเนื้อ ซึ่งเมื่อจะแปรรูปเป็นอาหารอื่นอาจไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ดังนั้นควรมีการทดสอบการยอมรับด้านประสาทสัมผัสก่อน

บรรณานุกรม

คมแข พิลาสมบัติ. 2550ก. **เอกสารประกอบการสอนวิชาสุขศาสตร์เนื้อสัตว์.** ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร.165 น.

คมแข พิลาสมบัติ. 2553. ผลของการใช้ชาเขียวในการลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. สำนักงานกองทุนการวิจัย. 137 น.

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539. **เอกสารประกอบการสอนวิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ขั้นสูง.** คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร. 203 น.

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2542. **การจัดการโรงฆ่าสัตว์.** คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร. 260 น.

จารุภา วิโยชน์. 2549. "ประสิทธิภาพและความปลอดภัยของน้ำมันที่แยกได้จากพืชในวงศ์ Labiatae สำหรับการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์รักษาสิว". วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. คณะเภสัชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก.

จันทร์เพ็ญ มะลิพันธ์. 2549. "**ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากขิงและผลิตภัณฑ์ขิง**" วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร.

ดวงฤดี หวั้นหนู และคณะ. 2553. "องค์ประกอบทางเคมีและประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิด". **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**. 41(3/1)(พิเศษ) : 633 – 636.

ธำรงค์ เมฆโหรา และ พงศ์ศักดิ์ ศรีธเนศชัย. 2549. การศึกษาค่าความเป็นกรด ด่าง และการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของเนื้อสุกรที่วางจำหน่ายในตลาดสดถาวรเขตกรุงเทพมหานคร. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 24 (3) : 32-46.

นิจศิริ เรืองรังษี. 2547. สมุนไพรไทย เล่ม 1. สำนักพิมพ์ บี เฮลท์ตี้, กรุงเทพ.

นิรนาม. 2554. ผักตระกูลโหระพา-กะเพรา. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.vetgetweb.com

นิรนาม. 2554. กะเพรา. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.greenclinic.in.th

บุษกร อุตรภิชาติ. 2547. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** การผลิตเอกสารและตำรา มหาวิทยาลัยทักษิณ, สงขลา. 425 น.

ปทุม อรุณวัชรินทร์, อาภากร สุภาพิพัฒน์และจิตศิริ ราชตนะพันธุ์. 2550. "การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทย." หน้า 508 – 515. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 สาขาส่งเสริมการเกษตรและคหกรรมศาสตร์ สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พสุดา เจี่ยปิยะสกุล. 2550. "การประเมินศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชพื้นบ้านบางชนิด." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร ,สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร.

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช 6000-2547ก). 2547. **มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ.** เนื้อสุกร. สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพมหานคร.

เยาวลักษณ์ สรุพันธพิศิษฐ์. 2536. **เทคโนโลยีเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์.** ภาควิชาอุตสาหกรรมการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร.127 น.

วิชุดา บุญชูและแหม่ม แซ่อึ้ง. 2550. "**ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคบางชนิดของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากสมุนไพรทางการค้า**". ปัญหาพิเศษ. สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก โครงการคณะอุตสาหกรรมการเกษตร,สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร. 34 น.

ศศิธร คณะรัตน์และกาญจณี ธรรมาพิพัฒน์กุล. 2534. การตรวจวิเคราะห์เนื้อสัตว์ให้องปฏิบัติการ. **เอกสารประกอบการฝึกอบรมพนักงานตรวจเนื้อฝ่ายสัตวแพทย์.** สาธารณสุข. กรมปศุสัตว์.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** สำนักพิมพ์เอส.บี.บิสสิเนส, นนทบุรี. 454 น.

สุรสีห์ วัฒนวิกกิจย์และคณะ. 2551. สถานการณ์ความปลอดภัยของเนื้อสุกรและข้อเสนอแนะแนวทางการบริหารจัดการความปลอดภัยด้านอาหารของเนื้อสุกรในจังหวัดนครศรีธรรมราชและพัทลุง. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : www.knit.or.th/images/documents/report/2551/food/p...

อรุณ บ่างตระกูลนนท์, แพรวผกา ทองระอาด และมยุรา กุสุมภ์. 2536. การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในเนื้อไก่สดแช่แข็งเพื่อการส่งออก. วารสารอาหาร. 23 (4) : 418-483.

AOAC. 2006. "Chapter 17 AOAC Official Method 966.23c-24." P. 5-6. In Horwitz, W. and Latimer, W. **Official methods of analysis of AOAC international**. Maryland : AOAC international .

Berruga, M.I., Vergara, H. and Gallogo, L. 2005. "Influence of packaging condition on microbial and lipid oxidation in lamb meat." **Small rumen. Res**. 57 : 257 – 264.

Bhattacharjee, I., Chatterjee, S.K., Ghosh, A. and Chandra, G. 2011. "Antibacterial activities of some plant extracts used in Indian traditional folk medicine". Asain Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 1 – 5.

Borch, E. and Arinder, P. 2002. "Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures." Meat Sci. 62 : 380-390.

Chang, X., Alderson, P.G. and Wright, C.j. 2009. "Variation in the essential oils in different leaves of Basil (*Ocimum basilicum* L.) at day time". **The Open Horticulture Journal**. 2 : 13 – 16.

Dainty, R.H., Shaw, B.G. and Roberts, T.A. 1983. "Microbial and Chemical chang in chill stored red meat.In Food Microbiology": Advances and Prospects,eds Robert T A and Skinner F A, Society of Applied Bacteriology Symposium Series no. 11 London, U.K., Academic Press, 151 – 178.

Daud, H.B., McMeekin T.A. and Thomas C.J. 1979. Spoilage association of chicken skin. **Appl. Environ.Microbiol**. 37 : 399-401.

Diliello, L.R. 1982. **Method in food and dairy microbiology**. Connecticut. AVI publishing company, Inc.

Garcia-López, M.L., M. Prieto and A. Otero. 1998. "The physiological attributes of gram-negative bacteria associated with spoilage of meat and meat product" p. 1-28 In **The Microbiology of Meat and Poultry**. Blackie Academic & Professional, London.

Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A. and Chatzopoulou, P.S. 2010. "The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteridis in minced sheep meat during refrigerated storage". **International Journal of Food Microbiology**. 137 : 175 – 180.

Huffman, R.D. 2002. Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. Meat Sci. 62 : 285-294.

Hussain A.I., Anwar F., Sherazi and Przybylski. 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum sanctum*) essential oils depends on seasonal variations. Food Chemistry. 108 : 986-995.

Lachowicz, K.J., Jones, G.P., Briggs, D.R., Bienvenu, F.E., Wan, J., Wilcock, A. and Conventry, M.J. 1998. "The synergistic preservative effect of the essential oils of sweet basil (*Ocimum Basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora". Letters in Applied Biology. 26 : 209 -214.

Mackey, B.M. and Robert, T.A. 1993. "Improving slaughter hygiene using HACCP and Monitoring". Fleischwirtschaft. 73 : 58 – 61.

Maneenin N., Pilasombut K., Bundit J. and Sethakul J. 2010. "Effect of green tea (*Camellia Sinensis*) extract on lipid oxidation and meat quality in raw ground pork during refrigerated storage". **The 14th AAAP Proceeding**. 13 : 1331 – 1334.

Mies, P.D., B.R. Covinton, K.B. Harry, L.M. Lucia, G.R.Acuff and J.W. Sawell. 1999. Commercial and laboratory application of cattle washes with and without antimicrobial agent as decontamination streategies hides. Department of Animal Science, A and M University. Texas.

Nanasombat, S. and Lohasupthawee, P. 2005. "Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against Salmonellae and other Enterobacteria". **KMITL Sci. Tech. J.** 5(3) : 527 – 538.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (9th International Supplement). M100-S9, Wayne, PA.

Nissen, H., T. Maugesten and P. Lea. 2001. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella enteritidis* on decontaminated and untreated meat. Meat Sci. 57 : 291-298.

Nwinyi, O.C., Chinedu, N.S., Ajiani, O.O., Ikpo, C.O. and Ogunniran, K.O. 2009. "Antibactirial effects of extracts of *Ocimum gratissimum* and *Piper guineense* on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*". **African Journal of Food Science**. 3(1) : 22 – 25.

Nyclas, G.J.E., Dillon, V.M. and Board, R.G. 1998. "Glucose, the key substrate in the microbiological change occurring in meat and curtain meat product." **Biotechnol. Appl. Biochem.** 10 : 203-231.

Ockerman, H.W., K. Pilasombat, J. Sethakul and Y. Opatpatanakit. 2001. Reduction of bacterial contamination of pork by using a lactic acid dip solutions. In research and reviews: Meat 2001. M.L. Eastridge (ed.). The Ohio State University. U.S.A.

Patel J.D., Patel D.K., Shrivastava A. and Kumar V. 2008. Screening of plant extracts used in traditional antidiarrhoeal medicines against pathogenic Escherichia coli. Scientific World. 6(6) : 63-67.

Pearson, A.M. and T.R. Dutson. 1986. Advance in Meat Research vol. 2 Meat and poultry microbiology. Avi, Connecticut. 436 p.

Pipek, P., Šikulová, M., Jeleniková, J. and Izumimoto, M. 2005. "Colour change after carcasses decontamination by steam and lactic acid". **Meat Sci.** 69 : 673 – 680.

Pipek, P., Houška, M., Hoke, K., Jeleniková, J.,Kýhos, K. and Šikulová, M. 2006. "Decontamination of pork carcasses by steam and lactic acid". **J.Food Eng**. 74 : 224 – 231.

Rao D.N., K.K.S. Nair and P.Z. Sakhare. 1998. Meat microbiology and spoilage in tropical countries, p. 220-265. In The Microbiology of Meat and Poultry. Blackie Academic & Professional, London.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. 2010. "Antimicrobial activity of Basil (*Ocimum basilicum*) oil against *Salmonella* Enteridis *in vitro* and in food". **Biosci. Biotechnol. Biochem**. 74(6) : 1200 – 1204.

Runyaro D., Ngassapa O., Vagionas K., Aligiannis N., Graikou K. And Chinou I. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* spices growing in Tanzania. Food Chemistry (impress).

Russo, F., Ercolini, D., Maurillo, E. and Villani F. 2006. "Behavior of Brochotrix thermosphacta in presence of other meat spoilage microbial groups." **Food Microbiol**. 23 : 797-802.

Sokovic, M., Marin, P.D., Brkic, D., Griensven, L.J.L.D. 2007. "Chemical composition and antibacterialactivity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria". Global Science Book. 1(1) : 1 - 7.

Smulders, F.J.M. and R.L.J.M. Van Laack. 1992. On the quality of pork 1. Microbiological concerns. Fleischwirts ch. 72 (6) : 888-890.

Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P. and Botsoglou, N. 2008. "The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage". Meat Science. 80 : 159 – 166.

Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K. and Bigger, S.W. 2003. "Antimicrobial properties of Basil and its possible application in food packaging". **J.Agric.Food Chem**. 51 : 3197 – 3207.

Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangchai, T. and Thubthimthed, S. 2005. "Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants". **Fitoterapia**. 76 : 233 – 236.

Warriss, P.D. 2000. Meat Science. CABI publishing, UK. 310 p.

Wiart C., Mogana S., Khalifah S., Mahan M., Ismail S., Buckle M., Narayana A.K. andSulaiman M. 2004. Antimicrobial screening of plants used for traditional medicine in the state of Perak, Penisular Malaysia. Fitoterapia. 75 : 68-73.

Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y.L. and Sun, X. 2009. "Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C". **Meat Science**. 81 : 686 – 692.

ภาคผนวก

ตารางที่ 5 Most probable numbers (MPN) per 1 g. test portion, using 3 tubes

หลอดที่เกิดก๊าซ			MPN	หลอดที่เกิดก๊าซ			MPN	หลอดที่เกิดก๊าซ			MPN	หลอดที่เกิดก๊าซ			MPN
0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001	
0	0	0	<3	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7.2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2[a]	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3[a]	9	1	0	3[a]	15	2	0	3[a]	26	3	0	3[a]	95
0	1	0	3	1	1	0	7.3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2[a]	9.2	1	1	2[a]	15	2	1	2[a]	27	3	1	2[a]	120
0	1	3[a]	12	1	1	3[a]	19	2	1	3[a]	34	3	1	3[a]	160
0	2	0	6.2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1[a]	9.3	1	2	1[a]	15	2	2	1[a]	28	3	2	1[a]	150
0	2	2[a]	12	1	2	2[a]	20	2	2	2[a]	35	3	2	2[a]	210
0	2	3[a]	16	1	2	3[a]	24	2	2	3[a]	42	3	2	3[a]	290
0	3	0	9.4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1[a]	13	1	3	1[a]	20	2	3	1[a]	36	3	3	1[a]	460
0	3	2[a]	16	1	3	2[a]	24	2	3	2[a]	44	3	3	2[a]	1100
0	3	3[a]	19	1	3	3[a]	29	2	3	3[a]	53	3	3	3[a]	>1100

[a] Such highly importable result suggest that factors were present that interfered with recovery or identification at the lower dilutions. Therefore,the indicated MPN value could be much lower than the true concentration