ผลของการใช้น้ำมันตะไคร้แกงเสริมในอาหารไก่ต่อเชื้อแบคทีเรีย*เอสเชอริเชีย โคไล* และเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกในลำไส้ไก่เนื้อ

นายโชติพล หาญณรงค์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์ ภาควิชาเภสัชวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

EFFECT OF DIETARY SUPPLEMENTATION OF LEMONGRASS OIL ON INTESTINAL *ESCHERICHIA COLI* AND LACTIC ACID PRODUCING BACTERIA IN BROILER CHICKENS

Mr. Chotipol Hannarong

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pharmacology
Department of Veterinary Pharmacology
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2013
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการใช้น้ำมันตะไคร้แกงเสริมในอาหารไก่ต่อเชื้อแบคทีเรีย*เอสเชอริเชีย โคไล* และเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกในลำไส้ไก่เนื้อ
โดย	นายโชติพล หาญณรงค์
สาขาวิชา	เภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร. สุพัตรา ศรีไชยรัตน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ชาญณรงค์ รอดคำ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. กฤษ อังคนาพร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร. สุพัตรา ศรีไชยรัตน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ชาญณรงค์ รอดคำ)

.....กรรมการ

(อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. นิภัทรา สวนไพรินทร์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. กาญจนา อิ่มศิลป์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โชติพล หาญณรงค์ : ผลของการใช้น้ำมันตะไคร้แกงเสริมในอาหารไก่ต่อเชื้อแบคทีเรีย *เอสเชอริเชีย โคไล* และเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกในลำไส้ไก่เนื้อ. (EFFECT OF DIETARY SUPPLEMENTATION OF LEMONGRASS OIL ON INTESTINAL *ESCHERICHIA COLI* AND LACTIC ACID PRODUCING BACTERIA IN BROILER CHICKENS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ภญ. ดร. สุพัตรา ศรีไชยรัตน์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. น.สพ. ดร. จิโรจ ศศิปรียจันทร์, ผศ. น.สพ. ดร. ชาญณรงค์ รอดคำ, 69 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้น้ำมันตะไคร้แกง (*Cymbopogon citratus*) เสริมในอาหารไก่ต่อเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของไก่เนื้อ ได้แก่ *Escherichia coli* (*E. coli*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเป็นแหล่งรังโรคให้กับเชื้อก่อโรค และแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เพื่อเป็นข้อมูลในการพิจารณานำน้ำมันตะไคร้แกงไปใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ การศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบทั้งแบบนอกร่างกายและในร่างกายสัตว์ โดยการทดสอบในหลอดทดลองทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันตะไคร้แกงด้วยวิธี broth microdilution และทำการทดสอบการใช้เป็นวัตถุเติมในอาหารไก่เนื้อจำนวน 120 ตัว โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 4 กลุ่มตามระดับความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกงที่ผสมในอาหาร ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับอาหารควบคุมปกติ, อาหารผสมน้ำมันตะไคร้แกงขนาด 0.01, 0.02 และ 0.04% หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 42 วัน ทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระและลำไส้ส่วนต่างๆ ของไก่ ได้แก่ ลำไส้เล็กส่วนกลาง, ลำไส้เล็กส่วนท้าย และ ลำไส้ตัน เพื่อนำไปเพาะเชื้อและนับจำนวนเชื้อ *E. coli* และแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก

ผลการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าน้ำมันตะไคร้แกงมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก สำหรับผลศึกษาแบบในร่างกายพบว่าน้ำมันตะไคร้แกงไม่ส่งผลกระทบต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ทั้งสามส่วน แต่พบความแตกต่างของจำนวนเชื้อในอุจจาระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 14 และ 21 ส่วนผลของน้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้อ *E. coli* พบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อในอุจจาระในวันที่ 28 ได้ด้วยน้ำมันตะไคร้แกงขนาด 0.02 และ 0.04 % และสามารถลดจำนวนเชื้อในลำไส้เล็กส่วนกลางและลำไส้ตันด้วยน้ำมันตะไคร้แกงขนาด 0.04% จากผลการศึกษาครั้งนี้สรุปว่าน้ำมันตะไคร้แกงมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* ได้ทั้งการทดสอบแบบในร่างกายและนอกร่างกาย ถึงแม้ว่าน้ำมันตะไคร้แกงมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้ในการทดสอบนอกร่างกาย แต่กลับไม่มีผลทำให้เชื้อที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหารไก่ดังกล่าวลดลงเมื่อให้ร่วมกับอาหารไก่

ภาควิชา	เภสัชวิทยา	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	เภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....
ปีการศึกษา	2556	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5475308531 : MAJOR VETERINARY PHARMACOLOGY
KEYWORDS: BROILER CHICKENS / CYMBOPOGON CITRATUS / ESCHERICHIA COLI / ESSENTIAL OIL / LACTIC ACID PRODUCING BACTERIA

CHOTIPOL HANNARONG: EFFECT OF DIETARY SUPPLEMENTATION OF LEMONGRASS OIL ON INTESTINAL *ESCHERICHIA COLI* AND LACTIC ACID PRODUCING BACTERIA IN BROILER CHICKENS. ADVISOR: ASSOC. PROF. SUPATRA SRICHAIRAT, Ph.D., CO-ADVISOR: PROF. JIROJ SASIPREEYAJAN, Ph.D., ASST. PROF. CHANNARONG RODKHUM, Ph.D., 69 pp.

The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of lemongrass oil (LGO) (*Cymbopogon citratus*) on *Escherichia coli* (*E. coli*), which serves as a reservoir for many pathogens and lactic acid producing bacteria (LAB), which provides the benefits for the host, in order to replace the antibiotics with LGO. This study consists of in vitro and in vivo experiments. Broth microdilution was used for determining of LGO antibacterial activity in the in vitro experiment. The in vivo experiment was conducted with 120 broiler chickens. They were divided into 4 groups: basal diet, basal diet supplemented with 0.01, 0.02 and 0.04 %. After 42 days of feeding trial, fecal, jejunal, ileal and cecal samples were collected for enumeration of *E. coli* and LAB.

The results from the in vitro experiment showed antibacterial activity against both *E. coli* and LAB. The in vivo experiment showed that LGO had no effect on LAB population investigated from all parts of intestines. However, there were some significant difference of fecal LAB population among the groups on day 14 and 21. LGO at the dose of 0.02% and 0.04% significantly reduced the population of *E. coli* from feces on day 28. In addition, the number of *E. coli* population from jejunums and cecums was significantly decreased in chickens treated with LGO at dose 0.04%. In conclusion, LGO had an antibacterial activity against *E. coli* for both in vitro and in vivo experiments. Eventhough LAB was sensitive to LGO in the in vitro experiment, LGO did not reduce the number of the beneficial bacteria in gastrointestinal tract of the chicken.

Department:	Veterinary Pharmacology	Student's Signature .....
Field of Study:	Veterinary Pharmacology	Advisor's Signature .....
Academic Year:	2013	Co-Advisor's Signature .....
		Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ.ภญ.ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำปรึกษา ข้อมูลข้อเสนอแนะเพิ่มเติม และช่วยแก้ไขขัดเกลาเนื้อหาต่างๆ เพื่อให้เกิดความกระชับ และเข้าใจชัดเจนมากขึ้น ขอขอบพระคุณ ศ.น.สพ.ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์ และ ผศ.น.สพ.ดร.ชาญณรงค์ รอดคำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือในการส่วนของการทดลองเป็นอย่างมากจนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้แก่ รศ.น.สพ.ดร.กฤษ อังคนาพร อ.สพ.ญ.ดร. นิภัทรา สวนไพรินทร์ และ ผศ.สพ.ญ.ดร.กาญจนา อิ่มศิลป์ ที่คอยให้คำแนะนำ ชี้จุดบกพร่องที่ต้องแก้ไข เพื่อให้งานวิจัยออกมาสมบูรณ์แบบมากขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกๆ ท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ และนักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ปฏิบัติการทดลอง และคอยช่วยเหลือเตรียมอุปกรณ์ และฝึกสอนวิธีการทดลองวิจัยต่างๆ ให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ด้ขวยดี โดยเฉพาะคุณสุภาพ กำลังแพทย์ ผู้ให้ความช่วยเหลือข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ บัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนทุนงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณครอบครัว บิดามารดาที่เคารพรักและ เพื่อนๆ ทุกคนที่คอยสนับสนุนช่วยเหลือในการทำวิจัย และเป็นกำลังใจให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์แบบได้ในที่สุด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูป ..... ญ

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย 1

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3

คำถามสำหรับงานวิจัย 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

เชื้อจุลชีพในทางเดินอาหารไก่ 4

ปัจจัยที่มีผลต่อเชื้อจุลชีพในทางเดินอาหารไก่ 7

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบปนเปื้อนในทางเดินอาหารไก่ 8

เชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก 10

การใช้น้ำมันหอมระเหยในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ 12

ตะไคร้แกง 13

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 22

การทดลองที่ 1 การหาปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกงที่น้อยที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration; MIC) และความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกงที่น้อยที่สุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration; MBC) 22

การทดลองที่ 2 การนับจำนวนและวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างอุจจาระและลำไส้ส่วนต่างๆ ของไก่ 25

บทที่ 4 ผลการทดลอง 30

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

การทดลองที่ 1 การหาปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกงที่ต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration; MIC) และความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกงที่น้อยที่สุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration; MBC) 30
การทดลองที่ 2 การนับจำนวนและวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างอุจจาระและลำไส้ส่วนต่างๆ ของไก่ 33
2.1 ผลของน้ำมันตะไคร้แกงต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรียในอุจจาระไก่ 33
2.2 ผลของน้ำมันตะไคร้แกงต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารส่วนต่างๆ ของไก่ 39
2.3 การตรวจพิสูจน์เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* 45
บทที่ 5 อภิปรายผล และสรุปผลการวิจัย 48
อภิปรายผลการวิจัย 48
ผลการทดสอบแบบนอกร่างกายของน้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้อแบคทีเรีย 48
ผลการใช้น้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้อแบคทีเรียในอุจจาระและลำไส้ของไก่ 51
สรุปผลการวิจัย 55
ข้อเสนอแนะ 56
รายการอ้างอิง 57
ภาคผนวก 67
ภาคผนวก ก 68
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 69

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2-1 ร้อยละของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในลำไส้แต่ละส่วนของไก่..... 6

2-2 ส่วนประกอบทางเคมีที่พบในน้ำมันตะไคร้แกง..... 15

4-1 ค่าความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกงที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียควบคุมชนิดต่างๆ 31

4-2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันตะไคร้แกงที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอุจจาระไก่เนื้อปกติและทางเดินหายใจไก่ป่วย..... 32

4-3 จำนวนเชื้อกลุ่ม lactic acid bacteria จากอุจจาระไก่เนื้อกลุ่มต่างๆ ที่อายุ1, 7, 14, 21, 28 และ 42 วัน.....34

4-4 จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากอุจจาระไก่เนื้อกลุ่มต่างๆ ที่อายุ1, 7, 14, 21, 28 และ 42 วัน.....36

4-5 อัตราส่วนระหว่างจำนวนเชื้อ lactic acid bacteria ต่อจำนวนเชื้อ *E. coli* จากอุจจาระไก่..... 38

4-6 จำนวนเชื้อ lactic acid bacteria จากลำไส้ส่วนต่างๆ ของไก่เนื้อในแต่ละกลุ่ม.....40

4-7 จำนวนเชื้อ *E. coli* จากลำไส้ส่วนต่างๆ ของไก่เนื้อในแต่ละกลุ่ม.....42

4-8 อัตราส่วนระหว่างจำนวนเชื้อ lactic acid bacteria ต่อจำนวนเชื้อ *E. coli* จากลำไส้ส่วนต่างๆ ของไก่เนื้อในแต่ละกลุ่ม..... 44

4-9 ผลการพิสูจน์ทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli* จากอุจจาระไก่.....45

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2-1 ลักษณะทั่วไปของต้นตะไคร้แกง..... 14

2-2 โครงสร้างเคมีของสารประกอบที่พบในน้ำมันตะไคร้แกง..... 16

4-1 กราฟแท่งแสดงจำนวนเชื้อกลุ่ม lactic acid bacteria จากอุจจาระไก่เนื้อกลุ่มต่างๆ ที่อายุ 1, 7, 14, 21, 28 และ 42 วัน..... 35

4-2 กราฟแท่งแสดงจำนวนเชื้อกลุ่ม *E. coli* จากอุจจาระไก่เนื้อกลุ่มต่างๆ ที่อายุ 1, 7, 14, 21, 28 และ 42 วัน..... 37

4-3 กราฟแท่งแสดงจำนวนเชื้อ lactic acid bacteria จากลำไส้ส่วนต่างๆ ของไก่เนื้อในแต่ละกลุ่ม..... 41

4-4 กราฟแท่งแสดงจำนวนเชื้อ *E. coli* จากลำไส้ส่วนต่างๆ ของไก่เนื้อในแต่ละกลุ่ม..... 43

4-5 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ *E. coli* ทางกล้องจุลทรรศน์..... 46

4-6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระไก่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Congo red agar..... 46

4-7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากทางเดินหายใจของไก่ป่วยบน อาหารเลี้ยงเชื้อ Congo red agar..... 47

5-1 ลักษณะโครงสร้างชั้นนอกของเชื้อแบคทีเรีย..... 49

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ

ATCC	=	American type culture collection
CFU	=	colony forming unit
COX-2	=	cyclooxygenase-2
E. coli	=	*Escherichia coli*
EDRF	=	endothelial derived relaxing factors
EMB	=	eosin methylene blue
ESBL	=	extended-spectrum beta-lactamase
g	=	gram
IL	=	interleukin
iNOS	=	inducible nitric oxide synthase
L. plantarum	=	*Lactobacillus plantarum*
L. sakei	=	*Lactobacillus sakei*
LGO	=	lemongrass oil
log	=	logarithm
MBC	=	minimum bactericidal concentration
MHB	=	Mueller Hinton broth
MIC	=	minimum inhibitory concentration
ml	=	millilitre
MRS	=	Mann Rogosa Sharpe
NO	=	nitric oxide
NRIC	=	NODAI research institute culture collection
P. aeruginosa	=	*Pseudomonas aeruginosa*
PDS	=	peptone diluting saline

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

S. aureus	=	*Staphylococcus aureus*
v/v	=	volume by volume
℃	=	degree Celsius
%	=	percent

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย

ในปัจจุบันการตรวจคุณภาพเนื้อไก่สำหรับการส่งออกไปยังต่างประเทศมีความเข้มงวดและมาตรฐานสูงขึ้น เพื่อเพิ่มความปลอดภัยและสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภค โดยเนื้อไก่ที่ได้รับมาตรฐานนั้นจะต้องปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพที่เป็นอันตรายและสารเคมีตกค้างต่างๆ เชื้อจุลชีพที่มีความสำคัญและจำเป็นต้องตรวจสอบก่อนส่งออกได้แก่ *Salmonella spp.* และ *Escherichia coli* ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารของคน (Mbata 2005) เชื้อ*เอสเชอริเชีย โคไล* (*Escherichia coli*) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง จัดอยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* สามารถพบเชื้อนี้ได้ปกติในลำไส้และอุจจาระของคนและสัตว์ รวมทั้งในสิ่งแวดล้อม จึงมักใช้เชื้อชนิดนี้เป็นตัวบ่งชี้ถึงระดับการปนเปื้อนของเชื้อบนอาหารและผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในสภาวะปกติเชื้อ *E. coli* ไม่ทำให้เกิดโรค แต่อาจก่อให้เกิดโรคได้ในกรณีที่สภาพร่างกายอ่อนแอหรือได้รับเชื้อชนิดสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคท้องเสียอย่างรุนแรงได้ (Gordon 2013) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *E. coli* ชนิดที่ไม่ก่อโรคสามารถเป็นแหล่งรังโรคและเพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *E. coli* ชนิดที่ก่อโรคได้มากขึ้นด้วย (Ewers, Antao et al. 2009)

เพื่อป้องกันปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว จึงมีการนำยาต้านจุลชีพมาใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่กันอย่างแพร่หลาย และมีการใช้เพื่อจุดประสงค์ในการเร่งอัตราการเจริญเติบโตของไก่ ทำให้ได้อัตราการแลกเนื้อเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามผลของการใช้ยาปฏิชีวนะในระดับขนาดยาที่ต่ำกว่าการใช้รักษา (subtherapeutic dose) โดยมีวัตถุประสงค์ป้องกันการติดเชื้อและเร่งการเจริญเติบโตของไก่ ทำให้เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพและมีการถ่ายทอดยีนดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคจนส่งผลกระทบต่อมนุษย์ที่ได้รับเชื้อที่ดื้อยานั้นด้วย นอกจากนี้ยังอาจได้รับผลข้างเคียงของยาตกค้างจากการรับประทานเนื้อสัตว์ในปริมาณมาก จึงทำให้หลายประเทศโดยเฉพาะในกลุ่มสหภาพยุโรปสั่งห้ามใช้ยาปฏิชีวนะเป็นวัตถุเติมในอาหารสัตว์ รวมทั้งมีการตรวจวัดระดับยาตกค้างในเนื้อสัตว์อย่างเข้มงวดมากขึ้น (Castanon 2007)

ปัจจุบันเริ่มมีการตระหนักถึงการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นวัตถุเติมในอาหารสัตว์ที่สามารถส่งผลกระทบต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ภายในทางเดินอาหารได้ ได้แก่ *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. โดยที่แบคทีเรียเหล่านี้ทำหน้าที่ปกป้องสัตว์จากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยการ

แย่งจับที่ผนังลำไส้ ทำให้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคไม่มีพื้นที่ยึดเกาะและไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ (Chambers and Gong 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์บางชนิด เช่น *Lactobacillus reuteri* สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ *Campylobacter jejuni ได้* (Nazef, Belguesmia et al. 2008) ด้วยเหตุนี้การใช้ยาปฏิชีวนะจึงอาจทำให้เกิดผลเสียมากกว่าผลดีต่อตัวสัตว์

จากการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะผสมในอาหารเลี้ยงสัตว์ในหลายประเทศ ทำให้มีการค้นคว้าวิจัยเพื่อหาสารตัวอื่นๆ มาทดแทนยาเพื่อให้เนื้อสัตว์ปราศจากการปนเปื้อนทั้งเชื้อที่เป็นอันตรายและการตกค้างของยา สารทดแทนที่นิยมมาใช้ผสมในอาหารสัตว์ ได้แก่ พรีไบโอติก โพรไบโอติก เอนไซม์ พืชสมุนไพร รวมทั้งน้ำมันหอมระเหยจากพืชที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลชีพก่อโรค และเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของสัตว์ โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อคนที่รับประทานเนื้อสัตว์ ในประเทศไทยได้มีการศึกษาเกี่ยวกับพืชสมุนไพรที่มีน้ำมันหอมระเหยหลากหลายชนิดซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้แกงมีคุณสมบัติที่ดีเทียบเท่ากับน้ำมันหอมระเหยจากออริกาโน (Friedman, Henika et al. 2002)

ตะไคร้แกง (lemongrass, *Cymbopogon citratus* Staphf.) เป็นพืชล้มลุกชนิดหนึ่ง สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตอบอุ่นและเขตร้อนชื้น สามารถนำส่วนของราก ต้น ใบของตะไคร้แกงมาใช้ประโยชน์เป็นเครื่องเทศสำหรับปรุงแต่งรสกลิ่นอาหาร นอกจากนี้ยังใช้เป็นสมุนไพรรักษาอาการผิดปกติในร่างกายได้มากมาย เช่น แก้อาการท้องผูก ปวดท้อง จุกเสียดแน่นเฟ้อ ลดไข้ แก้ไอ แก้ความผิดปกติระบบทางเดินปัสสาวะ ลดความตึงเครียดของระบบประสาท (Carlini, Contar et al. 1986) นอกจากนี้มีการนำส่วนของต้นหรือใบมาสกัดในรูปน้ำมันหอมระเหย (essential oil) มาใช้เป็นสารแต่งกลิ่นในธุรกิจสปา นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันตะไคร้แกงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อรา และต้านเชื้อแบคทีเรียบางชนิด (Tzortzakis and Economakis 2007) จากการศึกษาผลของการใช้น้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด พบว่าสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* (Naik, Fomda et al. 2010) ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานผลของการใช้น้ำมันตะไคร้แกงในระยะยาวนานแบบวัตถุเติมในอาหารต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารไก่ทั้งภายในและนอกร่างกาย ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะนำน้ำมันตะไคร้แกงมาใช้ทดสอบผลการเปลี่ยนแปลงต่อเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ ได้แก่ Lactic acid producing bacteria และแบคทีเรียก่อโรคจากลำไส้ไก่ ได้แก่ *Escherichia coli* ทั้งภายในและภายนอกร่างกาย เพื่อเป็นแนวทางการใช้น้ำมันตะไคร้แกงเป็นวัตถุเติมในอาหารไก่ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาผลของน้ำมันตะไคร้แกงในการต้านเชื้อแบคทีเรียแบบภายนอกร่างกายและศึกษาผลของการใช้น้ำมันตะไคร้แกงเป็นวัตถุเติมในอาหารไก่ต่อเชื้อแบคทีเรียภายในอุจจาระและทางเดินอาหารส่วนต่างๆ ของไก่ทั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ ได้แก่ เชื้อกลุ่ม Lactic acid producing bacteria และเชื้อแบคทีเรียที่ส่งผลเสียต่อสุขภาพทางเดินอาหารของไก่และมนุษย์ ได้แก่ *Escherichia coli*

คำถามสำหรับงานวิจัย

1. น้ำมันตะไคร้แกงสามารถลดจำนวนเชื้อ *Escherichia coli* ในทางเดินอาหารของไก่ได้หรือไม่
2. น้ำมันตะไคร้แกงมีผลกระทบต่อเชื้อ Lactic acid producing bacteria ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในทางเดินอาหารไก่หรือไม่

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้ทราบถึงฤทธิ์ของน้ำมันตะไคร้แกงในการใช้เป็นวัตถุเติมในอาหารไก่ ต่อเชื้อแบคทีเรียจากทางเดินอาหารไก่
2. สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้ไปพัฒนาเป็นสารเสริมในอาหารไก่ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อจุลชีพในทางเดินอาหารไก่

(Freter 1992) ให้คำนิยามของเชื้อจุลชีพในทางเดินอาหาร (intestinal microbiota) ว่า “เป็นกลุ่มเชื้อจุลชีพซึ่งอาศัยอยู่ภายในทางเดินอาหารของมนุษย์หรือสัตว์ที่ไม่เป็นโรค ไม่ได้รับยา หรือไม่อยู่ในการทดลอง” กล่าวคือเป็นเชื้อที่พบได้ตามปกติในทางเดินอาหารแต่ไม่ก่อให้เกิดโรค โดยทั่วไปเชื้อเหล่านี้มีความสัมพันธ์ต่อผู้ให้อาศัยหรือโฮสต์แบบอิงอาศัย (commensalism) หรือแบบได้ประโยชน์ร่วมกัน (mutualism) เชื้อจุลชีพเหล่านี้ผ่านเข้ามาในร่างกายโดยการกินหรือหายใจเข้าสู่ร่างกายและอาศัยอยู่ภายในทางเดินอาหารของแต่ละส่วนที่มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยในทางเดินอาหารของไก่ตั้งแต่บริเวณกระเพาะพักจนถึงลำไส้ใหญพบแบคทีเรียที่แตกต่างถึง 640 สปีชี่ส์ และ 140 จีนัส (Apajalahti, Kettunen et al. 2004)

เชื้อแบคทีเรียที่พบในกระเพาะพักส่วนใหญ่เป็นเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* ซึ่งเป็นกลุ่มที่สามารถสร้างกรดแลกติก จึงทำให้กระเพาะพักมีสภาพเป็นกรดและทำให้ยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดอื่นได้ พบว่าผนังเยื่อบุของกระเพาะพักของไก่มีความจำเพาะให้เชื้อกลุ่มนี้สามารถยึดเกาะได้ (Fuller and Brooker 1974) นอกจากนี้ยังพบเชื้อจุลชีพกลุ่ม *Streptococcus*, *Escherichia coli* และยีสต์เป็นบางส่วน ในส่วนของกระเพาะย่อยและกระเพาะบดเป็นบริเวณที่มีสภาพความเป็นกรดจากเอนไซม์ต่างๆ จึงทำให้พบการเจริญของเชื้อจุลชีพบริเวณนี้น้อยมาก (Fuller 1984)

สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่พบในลำไส้เล็กส่วนต้น มีจำนวนไม่มากเมื่อเทียบกับลำไส้ส่วนอื่น เนื่องจากบริเวณนี้มีสภาพความเป็นกรดจากเอนไซม์ ระดับความดันของออกซิเจนที่สูง และการบีบตัวของลำไส้ตลอดเวลา โดยพบจำนวนแบคทีเรียในปริมาณ 10^4 ถึง 10^5 โคโลนีต่อกรัม เมื่อเทียบกับในตำแหน่งลำไส้เล็กส่วนปลายพบจำนวนแบคทีเรียตั้งแต่ 10^6 ถึง 10^8 โคโลนีต่อกรัม (Salanitro, Blake et al. 1978) ชนิดแบคทีเรียที่พบในลำไส้ประกอบด้วยแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ได้แก่ กลุ่ม *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* และ *Escherichia coli* โดยพบกลุ่ม *Lactobacillus* เป็นส่วนมากถึง 70% และแบคทีเรียกลุ่มที่เจริญในสภาวะไม่มีออกซิเจน (obligative anaerobe) ได้แก่ กลุ่ม *Bacteroides, Fusobacterium, Eubacterium, Propionibacterium, Gemmiger, Clostridium* และแบคทีเรียกลุ่ม anaerobic coccus (Salanitro, Blake et al. 1978) จากตารางที่ 2-1 ที่ตรวจพบโดย (Lu, Idris et al. 2003) พบว่าในลำไส้เล็กส่วนท้ายของไก่ประกอบด้วยแบคทีเรียกลุ่ม facultative anaerobe เป็นส่วนมาก โดยเฉพาะ *Lactobacillus* ที่พบว่ามีปริมาณถึงร้อยละ 67.59 ของเชื้อทั้งหมดที่ตรวจแยกได้ และเชื้อแบคทีเรียที่พบในไส้ตันส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม obligate

anaerobe มีจำนวนแบคทีเรียสูงถึง 10^{11} โคโลนีต่อกรัม เนื่องจากภายในไส้ตันมีอัตราการบีบตัวที่ช้า ทำให้สภาพแวดล้อมภายในคงที่ ชนิดแบคทีเรียที่พบในส่วนนี้ ได้แก่ *Propionibacterium, Eubacterium, Bacteroides, Clostridium, Peptostreptococcus* และ *Bifidobacterium* (Salanitro, Blake et al. 1974)

เชื้อจุลชีพที่พบในอุจจาระของไก่ที่มีสุขภาพปกติมีความคล้ายกันกับเชื้อที่พบในทางเดินอาหาร เชื้อส่วนใหญ่ที่พบได้แก่เชื้อกลุ่ม *Lactobacillus*, เชื้อในวงศ์ Clostridiaceae, *Escherichia coli* และ *Shigella* และพบว่าปริมาณเชื้อจุลชีพที่พบในอุจจาระนั้นสอดคล้องกับปริมาณของเชื้อที่พบในทางเดินอาหารไก่ในแต่ละส่วน รวมทั้งลักษณะอาหารที่ให้ไก่กินก็มีผลต่อปริมาณเชื้อจุลชีพแต่ละชนิดที่ถูกขับออกมาพร้อมกับอุจจาระด้วยเช่นกัน โดยอาหารที่มีความหยาบจะกระตุ้นการทำงานของกระเพาะพักและกึ๋น ซึ่งภายในประกอบไปด้วยเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* ทำให้มีการขับเชื้อดังกล่าวออกมาตามทางเดินอาหารมากขึ้น (Sekelja, Rud et al. 2012)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2-1 ร้อยละของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในลำไส้แต่ละส่วนของไก่ (Lu, Idris et al. 2003)

แบคทีเรีย	ร้อยละของแบคทีเรียที่พบ	
	ileum	cecum
Lactobacillus	67.59	7.75
Weisella	1.05	0.48
Clostridium	9.69	39.26
Ruminococcus	0.44	16.48
Eubacterium	0.73	9.85
Bacillus	0.67	1.45
Staphylococcus	0.95	0
Streptococcus	6.63	0.65
Enterococcus	6.43	0.97
Fusobacterium	0.73	13.89
Bifidobacterium	0.19	0
Ochrobacterium	0.18	0.81
Alcaligenes	0.88	0.65
Escherichia	0.35	1.29
Campylobacter	0.88	0
Flavobacterium	0	0.16
Bacteroides	0.60	5.01

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ปัจจัยที่มีผลต่อเชื้อจุลชีพในทางเดินอาหารไก่

มีหลายปัจจัยสำคัญด้วยกันได้แก่

1 อายุ

ในช่วงแรกที่ลูกไก่ฟักออกมา พบว่าภายในลำไส้ลูกไก่มีสภาพที่ปลอดเชื้อ แต่อาจตรวจพบเชื้อจุลชีพได้จำนวนเล็กน้อยจากการได้รับเชื้อระหว่างการฟักตัวหรือเชื้อผ่านทะลุเข้าถึงเปลือกไข่ขณะที่ยังอยู่ในตัวแม่ เมื่อลูกไก่กินอาหารหรือน้ำเข้าไป แบคทีเรียจะอาศัยและเพิ่มจำนวนภายในลำไส้ หลังลูกไก่ฟัก 1 วันพบว่ามีจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดภายในลำไส้ส่วน ileum และ cecum ถึง 10^8 และ 10^{10} ต่อกรัมตามลำดับ (Apajalahti, Kettunen et al. 2004) และในช่วงอายุแต่ละสัปดาห์ระหว่างสัปดาห์ที่ 1 ถึง 6 จำนวนแบคทีเรียภายใน cecum เพิ่มขึ้นทุกสัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญ (Torok, Ophel-Keller et al. 2008)

2. อาหาร

อาหารแต่ละชนิดมีองค์ประกอบสารและเชื้อจุลชีพจากอาหารที่แตกต่างกัน พบว่าองค์ประกอบอาหารมีผลต่อโครงสร้างผนังลำไส้และการสร้างเยื่อเมือกภายในลำไส้ จึงมีผลทำให้การยึดเกาะของเชื้อจุลชีพมีความแตกต่างกัน (Lan, Verstegen et al. 2005) พบว่าสารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก เช่น โพลีแซคคาไรด์ ฟรุคโตโอลิโกแซค-คาไรด์ เป็นสารอาหารของเชื้อจุลชีพที่เป็นประโยชน์ทำให้เกิดการหมักและเพิ่มการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพดังกล่าวได้

3. สภาพแวดล้อม

สภาพโรงเรือนรวมทั้งวัสดุรองนอนชนิดต่างๆ ของลูกไก่มีผลต่อจำนวนเชื้อจุลชีพภายในลำไส้ไก่ เนื่องจากสภาวะแวดล้อมที่ต่างกันทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ไม่เท่ากัน วัสดุรองนอนที่มีคุณสมบัติเก็บกักเชื้อได้ดี เช่น ฟาง-สับ, ขี้เลื่อย จะทำให้ลูกไก่ได้รับเชื้อเข้าไปจำนวนมาก จึงทำให้พบปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้มากขึ้นด้วย (Torok, Ophel-Keller et al. 2008) นอกจากนี้สภาพความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม อาจส่งผลต่อปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ลดลงได้ ซึ่งเชื่อว่าเป็นสาเหตุส่วนหนึ่งที่ทำให้สัตว์มีอัตราการป่วยที่สูงขึ้น

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบปนเปื้อนในทางเดินอาหารไก่

***Escherichia coli* (*E. coli*)**

ลักษณะและความสำคัญของเชื้อ

จัดอยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* เป็นเชื้อแบคทีเรียติดสีแกรมลบ ลักษณะเป็นรูปแท่ง ขนาด 1-3 ไมโครเมตร สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลเจลลา (flagella) สร้างเอนไซม์ catalase แต่ไม่สร้างเอนไซม์ oxidase เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) จึงสามารถพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ตามปกติในลำไส้ของสัตว์และมนุษย์ รวมทั้งพบได้ทั่วไปตามสิ่งแวดล้อม (Ewers, Janssen et al. 2004)

เชื้อ *E. coli* ประกอบไปด้วยกลุ่มที่ไม่ก่อโรค (non-pathogenic *E. coli*) ที่สามารถพบได้ทั่วไปในลำไส้ของสิ่งมีชีวิต และกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic *E. coli*) เชื้อ *E. coli* สามารถจำแนกเป็นกลุ่มๆ ตามลักษณะการก่อโรค ทั้งนี้มีความสามารถในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพได้ต่างกัน ได้แก่ enterotoxigenic *E.coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) และ enteroaggregative *E. coli* (EAEC) (Kaper, Nataro et al. 2004) การก่อโรคในคนเกิดจากการได้รับเชื้อผ่านทางการกินน้ำหรืออาหารที่ปนเปื้อนเชื้อดังกล่าว ซึ่งทำให้เกิดอาการปวดท้องเกร็ง มีไข้ ท้องเสียอย่างรุนแรง โดยอาจมีเลือดปนอุจจาระ บางรายอาจรุนแรงถึงแก่ชีวิต

E. coli เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค colibacillosis ในไก่ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญสำหรับอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ การติดเชื้อเกิดจากการได้รับเชื้อโดยตรงจากแม่ไก่ โดยผ่านไข่ไปสู่ลูกไก่หรือปนเปื้อนจากมูลไก่ โดยเชื้อสามารถซึมผ่านเข้าไปในเปลือกไข่ได้ และเกิดจากการสูดหายใจเชื้อดังกล่าวที่ปะปนมากับฝุ่นละอองภายในโรงเรือนหรือวัสดุรองที่อาจเป็นแหล่งสะสมของเชื้อ นอกจากนี้ภาวะความเครียดทำให้ร่างกายอ่อนแอลง และเพิ่มโอกาสการติดเชื้อมากขึ้น พบว่าการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ เช่น โรคนิวคาสเซิล โรคหลอดลมอักเสบ สามารถทำให้ติดเชื้อ *E. coli* แทรกซ้อนได้ ทั้งนี้ซีโรไทป์ก่อโรคที่พบ ได้แก่ O1, O2 และ O78 ไก่ที่ป่วยจะแสดงอาการผิดปกติของระบบทางเดินหายใจ เช่น หายใจลำบาก จาม ไอ ซึ่งอาจรุนแรงจนถึงระดับติดเชื้อทั่วร่างกาย (septicemia) และตายในที่สุด (Kabir 2010)

ลักษณะรอยโรคจากเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบ ได้แก่ ถุงลมอักเสบ ช่องท้องอักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ตับอักเสบ ท่อนำไข่อักเสบ จากลักษณะทางจุลพยาธิพบการคั่งของเลือดภายในปอดและถุงลม และพบเซลล์อักเสบจำนวนมาก (Tonu, Sufian et al. 2011) และถึงแม้ว่าเชื้อชนิดนี้ไม่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของไก่ แต่หากมีจำนวนเชื้อ *E. coli* ที่มากเกินไปในระบบทางเดินอาหารอาจ

เพิ่มโอกาสติดเชื้อและเพิ่มจำนวนของเชื้อ *E. coli* ชนิดที่ก่อโรคได้มากขึ้น (Ewers, Antao et al. 2009)

ปัจจุบันเชื้อ *E. coli* บางกลุ่มมีการสร้างเอนไซม์เบต้าแลคแทมเมสชนิดขยาย (Extended-spectrum beta-lactamase; ESBL) ที่สามารถสลายยาในกลุ่มเบต้าแลคแทมส์ได้และทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อดังกล่าว ซึ่งปัญหาการดื้อยานี้ได้มีรายงานการระบาดมากขึ้น สำหรับประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อ *E. coli* ที่สร้าง ESBL ได้ เมื่อปีค.ศ. 2005-2007 พบเชื้อที่มีคุณสมบัติดังกล่าวมากถึงร้อยละ 65.9 จากตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วยในโรงพยาบาลศิริราช (Kiratisin, Chattammanat et al. 2008) และพบเชื้อที่สร้าง ESBL ร้อยละ 21.9 ของตัวอย่างที่ส่งตรวจจากผู้ป่วยโรงพยาบาลน่านและชุมชนเมื่อปีพ.ศ. 2547-2553 จากรายงาน (เดชพิภัทร์ อมรทิพย์วงศ์, ปวีญา มงคลวิสุทธิ์ et al. พ.ศ. 2554) เชื้อที่สร้าง ESBL นี้สามารถถ่ายทอดยีนที่มีคุณสมบัติดังกล่าวไปยังเชื้อตัวอื่นได้ รวมทั้งแพร่จากสัตว์มาสู่คนได้ทั้งจากสิ่งแวดล้อมและสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารของคน (Gaze, O'Neill et al. 2008)

การตรวจแยกเชื้อ *E. coli*

การตรวจเพาะแยกเชื้อ *E. coli* ทำได้โดยการเพาะตัวอย่างลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิด สำหรับการเพาะแยกเชื้อ *E. coli* นิยมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey, eosin methylene blue (EMB) เชื้อชนิดแกรมบวกจะไม่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดนี้ เนื่องจากมีการเติมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดแกรมบวกลงไป เช่น คริสตัลไวโอเลต และเมทิลลีนบลู สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey ประกอบไปด้วยเกลือน้ำดีและคริสตัลไวโอเลต นอกจากนี้ยังมี neutral red ซึ่งเป็นอินดิเคเตอร์ของค่า pH เชื้อที่มีคุณสมบัติในการหมักน้ำตาลแลกโตส ได้แก่ *E. coli*, *Klebsiella* และ *Enterobacter* เชื้อเหล่านี้ทำให้เกิดปฏิกิริยาการหมักแล้วได้ผลผลิตเป็นกรด และทำให้บริเวณนั้นมีค่า pH ลดลง และเกิดการตกตะกอนของเกลือน้ำดี และแสดงให้เห็นเป็นสีแดงอมชมพูรอบโคโลนีของเชื้อ (Flournoy, Wongpradit et al. 1990) อีกวิธีหนึ่งที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB จะประกอบไปด้วยแลกโตส ซูโครส และเมทิลลีนบลู (methylene blue) และมีสีย้อม eosin Y เป็นอินดิเคเตอร์ของค่า pH แบคทีเรียที่เกิดปฏิกิริยาการหมักของน้ำตาลแลกโตสจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรด ซึ่งทำให้มีค่า pH ลดลง และเกิดโคโลนีเป็นสีม่วงดำ สำหรับเชื้อ *E. coli* จะเกิดปฏิกิริยาการหมักแลกโตสที่รุนแรง จนสามารถทำให้เกิดลักษณะโคโลนีติดสีเขียวโลหะ (metallic sheen) ซึ่งสามารถใช้แยกแยะเชื้อดังกล่าวจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ (Leininger, Roberson et al. 2001)

นอกจากนี้ยังสามารถแยกแยะเชื้อ *E. coli* ชนิดที่ก่อโรคและไม่ก่อโรคได้จากการเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Congo red จากการศึกษาของ (Berkhoff and Vinal 1986) ซึ่งได้ทำการเพาะเชื้อ

E. coli จากตัวอย่างอวัยวะของไก่ที่แสดงอาการป่วยหลังการฉีดเชื้อเข้าถุงลมและไก่ที่ไม่แสดงอาการ พบว่าหลังการเพาะเชื้อ *E. coli* จากไก่ป่วยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Congo red โคโลนีของเชื้อติดสีแดงสดจากสีย้อม ในขณะที่ *E. coli* จากไก่ปกติมีลักษณะโคโลนีสีขาว กลไกการติดสีย้อมของเชื้อ *E. coli* ก่อโรคนั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่เชื่อว่าเชื้อดังกล่าวประกอบไปด้วยโปรตีนขนาด 101 กิโลดาลตันที่มาจากการแสดงออกของยีนก่อโรค ซึ่งโปรตีนชนิดนี้สามารถจับสีย้อมดังกล่าวได้ รวมทั้งสามารถพบได้ในเชื้อแบคทีเรีย *Shigella flexneri* ที่มียีนก่อโรคด้วยเช่นกัน (Stugard, Daskaleros et al. 1989)

เชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก

จัดเป็นกลุ่มแบคทีเรียติดสีแกรมบวก พบลักษณะรูปร่างทั้งแบบกลมและแท่ง ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน และสามารถสร้างกรดแลคติกได้จากกระบวนการหมักน้ำตาล เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus*, และ *Weissella* (Stiles and Holzapfel 1997) สามารถพบได้ทั่วไปในผลิตภัณฑ์จากนม เนื้อ ผัก ธัญพืช รวมทั้งพบได้ปกติในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิต (Phumkachorn and Rattanachaikunsopon 2010)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในไก่

จากการศึกษาเชื้อแบคทีเรีย lactobacilli ในทางเดินอาหารไก่ของ (Heravi, Kermanshahi et al. 2011) สามารถพบแบคทีเรีย *Lactobacillus* ได้ในทุกส่วนของทางเดินอาหารตั้งแต่กระเพาะพักไปจนถึงไส้ตัน และได้ระบุสปีชี่ส์ของสกุล *Lactobacillus* ที่แยกได้ด้วยวิธี polymerase chain reaction โดยพบทั้งหมด 6 สปีชี่ส์ด้วยกัน ได้แก่ *L. reuteri*, *L. crispatus*, *L. salivarius*, *L. agilis*, *L. johnsonii* และ *L. oris*

บทบาทและหน้าที่

เชื้อแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ภายในทางเดินอาหารมีความสำคัญอย่างมากในการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทั้งหลาย เนื่องจากพบว่าเชื้อเหล่านี้ทำหน้าที่ที่เป็นประโยชน์ให้กับโฮสต์ได้หลายประการ ได้แก่ ป้องกันการรุกรานและการเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลชีพก่อโรค โดยกลไกหนึ่งคือการแย่งจับที่ผนัง villi ของลำไส้ทำให้เชื้อโรคที่รุกรานเข้ามาไม่มีพื้นที่ยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้ อีกกลไกหนึ่งที่พบคือแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์บางชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียกรดแลกติกมีการสร้างสารที่เรียกว่า bacteriocin ซึ่งเป็นเปปไทด์หรือโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรีย มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Enterococcus faecium สามารถสร้าง enterocin P ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens, Clostridium botulinum* (Cintas, Casaus et al. 1997) พบว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus reuteri* สามารถเปลี่ยน glycerol ไปเป็น 3-hydroxypropionaldehyde ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียบางชนิดได้ (Nazef, Belguesmia et al. 2008) (Talarico and Dobrogosz 1989) นอกจากนี้ในการศึกษาของ (Messaoudi, Kergourlay et al. 2011)พบว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus salivarius* ที่แยกได้จากไส้ตันของไก่สามารถสร้าง bacteriocin ต่อต้านเชื้อ *Campylobacter jejuni* และ *C. coli*

เชื้อจุลชีพที่เป็นประโยชน์สามารถย่อยสารอาหารที่โฮสต์ไม่สามารถย่อยเองได้ เช่น ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ โพลีแซคคาไรด์ เป็นต้น โดยแบคทีเรียทำให้เกิดการหมักและได้ผลผลิตเป็นกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) พบว่ากรดไขมันสายสั้นมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของโคโลโนไซต์ (colonocyte) เร่งการสร้างเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ เพิ่มอัตราการผลัดเปลี่ยนเซลล์ของ crypt ซึ่งจากการศึกษาของ (Shirkey, Siggers et al. 2006) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของลำไส้หมูปลอดเชื้อกับหมูปกติพบว่าลำไส้หมูปกติมีความยาวของ villi และมีความลึกของ crypt ที่มากกว่าเมื่อเทียบกับในหมูปลอดเชื้อ นอกจากนี้เชื้อจุลชีพยังเพิ่มการบีบตัวของลำไส้ ลดโอกาสในการเกิดเซลล์มะเร็งในลำไส้ใหญ่ และยังสามารถดูดซึมเข้าร่างกายเปลี่ยนเป็นพลังงานแก่โฮสต์ได้ (Hijova and Chmelarova 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อจุลชีพที่เป็นประโยชน์ เช่น *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. สามารถสร้างกรดแลคติกจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของเชื้อ ทำให้ภายในลำไส้มีสภาพเป็นกรดมากขึ้น และสภาพที่เป็นกรดของลำไส้มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพก่อโรคได้ด้วย (Gareau, Sherman et al. 2010)

เชื้อจุลชีพที่มีประโยชน์ในลำไส้สามารถเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ทั้งภูมิคุ้มกันแบบ innate และ adaptive โดยการกระตุ้นนี้เกิดขึ้นผ่านทางตัวรับชนิดแท่ง (toll-like receptor) ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อโมเลกุลของเชื้อจุลชีพจับเข้ากับตัวรับ ทำให้เกิดการสร้างไซโตคายน์และกระบวนการ phagocytosis ของ macrophages นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มระดับ Immunoglobulin A (IgA) ในลำไส้ไก่ได้อีกด้วย (Brisbin, Gong et al. 2008) จากการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างหนูที่ปลอดเชื้อจุลชีพกับหนูปกติที่มีเชื้อจุลชีพในลำไส้พบว่าหนูที่ปลอดเชื้อมีความไวต่อการติดเชื้อสูงกว่า และมีการพัฒนาของ secondary lymphoid tissue ที่ช้ากว่าหนูที่มีเชื้อจุลชีพในลำไส้ (Umesaki, Setoyama et al. 1993)

การตรวจแยกเชื้อ

การตรวจแยกเชื้อทำได้โดยการเพาะตัวอย่างลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ De Mann, Rogosa and

Sharpe (MRS) ซึ่งประกอบไปด้วยยีสต์สกัด, peptone , น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* และยังประกอบไปด้วย polyoxyethylene sorbitan mono-oleate ที่ช่วยให้เชื้อดูดซึมสารอาหารได้ดีขึ้น , sodium acetate ซึ่งช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดอื่นๆ รวมทั้งแมกนีเซียมซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟตที่ช่วยให้การทำงานเมทาบอลิซึมเจริญของเชื้อและมีโพตัสเซียมฟอสเฟตเป็นบัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้พบว่าเชื้อกลุ่ม *Pediococcus* และ *Leuconostoc* สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ (De Man, Rogosa et al. 1960)

การใช้น้ำมันหอมระเหยในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่

จากการที่ประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรปและในเอเชียบางประเทศ เช่น ญี่ปุ่น และ เกาหลีใต้ประกาศห้ามใช้ยาปฏิชีวนะในระดับต่ำผสมลงอาหารสัตว์เพื่อการป้องกันโรค ทำให้มีการนำสารอื่นมาทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะโดยมุ่งเน้นไปที่สารสกัดจากพืชสมุนไพรต่างๆ เนื่องจากเชื่อว่ามีความปลอดภัย ไม่เกิดความเป็นพิษทั้งในสัตว์และคนที่นำเนื้อสัตว์นั้นมาบริโภค

น้ำมันหอมระเหย (essential oil) เป็นสารสกัดจากพืช ประกอบไปด้วยองค์ประกอบเคมีหลายองค์ประกอบด้วยกัน โดยทั่วไปพบสารประกอบกลุ่ม terpenoids, phenylpropenes น้ำมันหอมระเหยจากพืชบางชนิดที่ใช้เป็นเครื่องเทศประกอบอาหารให้ผลในทางที่ดีหลายประการ ได้แก่ ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพก่อโรค ต้านปรสิตภายในร่างกาย กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารเพื่อให้เกิดการดูดซึมสารอาหารได้ดีขึ้น ต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย และเพิ่มกลิ่นรสชาติให้มีความน่ารับประทานมากขึ้น (Lee, Everts et al. 2004) ผลที่เกิดขึ้นเหล่านี้มีส่วนช่วยให้สัตว์มีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากพืชแต่ละชนิดมีองค์ประกอบสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันไป จึงทำให้มีการใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชหลากหลายชนิดในการผสมอาหารไก่ เช่น ออริกาโน (oregano) ซึ่งพบว่าสามารถเร่งการเจริญเติบโตของไก่ได้ โดยมีผลมาจากการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซิน ทำให้มีการย่อยโปรตีนได้ดีขึ้นและดูดซึมได้มากขึ้น (Malayoglu, Baysal et al. 2010) และลดจำนวนเชื้อ *E. coli* ได้โดยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากไส้ตัน (Roofchaee, Irani et al. 2011) รวมทั้งน้ำมันหอมระเหยอบเชย (cinnamon) และ ไธม์ (thyme) ที่พบว่าสามารถเร่งการเจริญเติบโตของไก่เนื้อได้เช่นเดียวกับออริกาโน และยังสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในซีรั่มได้ (Al-Kassie 2009) และจากการศึกษาของ (Ciftci, Simsek et al. 2010) ที่ได้ทำการทดลองใช้น้ำมันอบเชยเสริมในอาหารไก่ พบว่าน้ำมันอบเชยสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลทั้งในซีรั่มและในกล้ามเนื้อของไก่ได้ และพบการทำงานของระบบการต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมรวมทั้งกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะด้วย

ตะไคร้แกง

อนุกรมวิธาน (Ravinder, Pawan et al. 2010)

Kingdom:	*Plantae*
Subkingdom:	*Tracheobionta*
Super division:	*Spermatophyta*
Division:	*Magnoliophyta*
Class:	*Liliopsida*
Subclass:	*Commelinidae*
Order:	*Cyperales*
Family:	*Graminae* (*Poaceae*)
Genus:	*Cymbopogon*
Species:	*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.

ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับตะไคร้แกง (Jayasinha 1999)

ตะไคร้แกงเป็นพืชล้มลุกตระกูลหญ้า สูงประมาณ 1 เมตร มีใบยาวเรียว กว้าง 1.3-2.5 เซนติเมตร ยาว 70-120 เซนติเมตร ใบซ้อนกันเป็นลักษณะพุ่ม (รูปที่ 2-1) สามารถพบการเจริญเติบโตได้ทั่วไปในพื้นที่เขตร้อนชื้นของทวีปอเมริกาและทวีปเอเชีย เช่น บราซิล อาร์เจนตินา คิวบา ศรีลังกา อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ รวมทั้งประเทศไทย ตะไคร้แกงสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 24-27 องศาเซลเซียสและมีความชื้นกับแสงสว่างที่เพียงพอ โดยเฉพาะแสงซึ่งเชื่อว่ามีผลต่อปริมาณ citral ในน้ำมันตะไคร้แกง โดยแสงทำให้เกิดการสังเคราะห์น้ำมันได้มากขึ้น (Handique, Gupta et al. 1984) ตะไคร้แกงเป็นพืชที่นิยมนำส่วนของใบมาสกัดในรูปน้ำมันหอมระเหยเพื่อใช้ในการประกอบอาหารหรือการปรุงแต่งกลิ่นรสของอาหารโดยให้กลิ่นรสเปรี้ยวคล้ายมะนาว รวมทั้งนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพรรักษาอาการผิดปกติต่างๆ ของร่างกาย (Jayasinha 1999)

รูปที่ 2-1 ก

รูปที่ 2-1 ข

รูปที่ 2-1 ลักษณะทั่วไปของต้นตะไคร้แกง (จาก http://plantfreak.wordpress.com/2012/03/08/the-grass-with-zest-lemongrass)

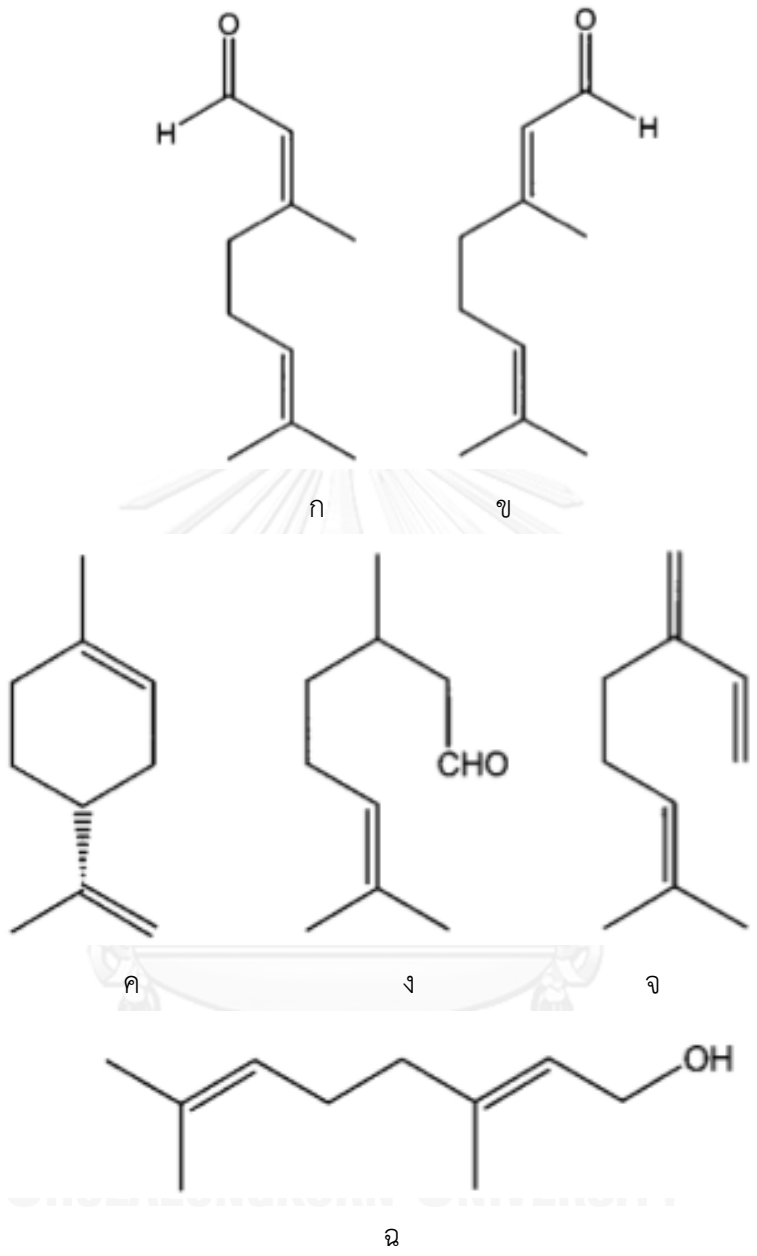
ส่วนประกอบทางเคมี

ตะไคร้แกงแต่ละชนิดมีส่วนประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันไปตามชนิดและถิ่นกำเนิด สำหรับน้ำมันตะไคร้แกงจาก *Cymbopogon citratus* ประกอบด้วยสารเคมีสำคัญ ได้แก่ citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal) ซึ่งอยู่ในรูปของน้ำมันหอมระเหย จัดเป็นสารประเภท acyclic monoterpene aldehyde มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{10}H_{16}O$ พบส่วนประกอบนี้ถึงร้อยละ 75 citral ในน้ำมันตะไคร้แกงอยู่ในรูปแบบที่เป็นไอโซเมอร์กัน ได้แก่ citral **α** (geranial) และ citral *β* (neral) (รูปที่ 2-2) ซึ่งพบในน้ำมันตะไคร้แกงร้อยละ 40.8 และ 32.0 ตามลำดับ ส่วนประกอบอื่นๆ ที่พบในน้ำมันตะไคร้แกง ได้แก่ nerol, geraniol, citronellol, terpinolene, geranyl acetate, *β*-myrcene, **α**-terpineol, **α**-pinene, *β*-pinene (ตารางที่ 2-2) (Saleem, Afza et al. 2003) และยังพบ limonene, linalool ในปริมาณเล็กน้อย

ตารางที่ 2-2 ส่วนประกอบทางเคมีที่พบในน้ำมันตะไคร้แกง (Saleem, Afza et al. 2003)

สารประกอบ	**% ที่พบ**
citral **α**	40.8
citral *β*	32.0
nerol	4.18
geraniol	3.04
citronellal	2.10
terpinolene	1.23
geranyl acetate	0.83
β -myrcene	0.72
terpinol	0.45
methylheptenone	0.20
borneol	0.1-0.4
linalyl acetate	0.1
α pinene	0.07
β pinene	0.04

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ก ข

ค ง จ

ฉ

รูปที่ 2-2 แสดงโครงสร้างเคมีของสารประกอบที่พบในน้ำมันตะไคร้แกง ได้แก่ neral (ก), geranial (ข) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลัก , limonene (ค), citronellal (ง), *β*-myrcene (จ) และ geraniol (ฉ) (Saleem, Afza et al. 2003)

ข้อมูลทางเภสัชวิทยาของตะไคร้แกง

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าตะไคร้แกงมีฤทธิ์ในการรักษาความผิดปกติของร่างกายได้หลากหลาย และนิยมใช้เป็นสมุนไพรรักษาในหลายๆ ประเทศที่พบการเจริญเติบโตของตะไคร้แกง ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของตะไคร้แกงรวมทั้งในรูปแบบของน้ำมันหอมระเหยและส่วนต่างๆ ของต้นตะไคร้แกง

ข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์

ยังไม่มีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับเภสัชจลนศาสตร์ของน้ำมันตะไคร้แกงโดยตรง แต่มีรายงานการศึกษาของเภสัชจลนศาสตร์ของ citral ซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่สำคัญที่สุดในน้ำมันตะไคร้แกง โดย (Phillips, Kingsnorth et al. 1976) ได้ทำการทดลองศึกษาการดูดซึม การกระจายตัว และการขับออกของ citral ในหนูแรทและหนูไมซ์ พบว่า citral ดูดซึมผ่านทางผนังลำไส้เล็กได้อย่างรวดเร็ว หลังได้รับสารที่ผสม citral โดยการกิน และถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปเมทาบอไลท์ 7 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ 3-hydroxy-3,7-dimethyl-6-octenedioic acid, 3,8-dihydroxy-3,7-dimethyl-6-octenoic acid, 3,9-dihydroxy-3,7-dimethyl-6-octenoic acid, E-3,7-dimethyl-2,6-octadienedioic acid, Z-3,7-dimethyl-2,6-octadienedioic acid, 3,7-dimethyl-6-octenedioic และ E-3,7-dimethyl-2,6-octadienoic acid (Dilberto, Srinivas et al. 1990) พบการกระจายตัวของ citral ตามอวัยวะต่างๆ ทั่วร่างกายหลังได้รับสารภายใน 12 ชั่วโมง จากนั้นจะถูกขับออกจนหมดภายใน 72 ชั่วโมงสำหรับหนูแรท และ 120 ชั่วโมงสำหรับหนูไมซ์ โดยพบการขับออกของ citral ผ่านทางปัสสาวะเป็นทางหลัก (60%) รองลงมาคือการหายใจออกทางปอด (20%) และพบการขับออกทางอุจจาระประมาณ 17%

ฤทธิ์ต่อระบบไหลเวียน

พบว่า citral และสารสกัดจากตะไคร้แกงมีฤทธิ์ทำให้กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงหนูคลายตัว โดยเชื่อว่า citral มีฤทธิ์กระตุ้นผ่านวิถีทาง nitric oxide ซึ่งเป็น EDRFs (endothelial derived relaxing factors) จากชั้น endothelium ของหลอดเลือดที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัว (Devi, Sim et al. 2012) จึงทำให้ลดระดับความดันเลือดได้

ฤทธิ์ต่อระบบทางเดินอาหาร

จากการศึกษาผลของน้ำมันตะไคร้แกงต่อการทำงานของลำไส้เล็กส่วนท้ายในกระต่ายของ (Devi, Sim et al. 2011) พบว่าน้ำมันตะไคร้แกงสามารถลดอัตราการบีบตัวของกล้ามเนื้อลำไส้เล็กโดยสามารถลดอัตราการบีบตัวได้มากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกง ผลที่เกิดขึ้นพบว่า

เกี่ยวข้องกับ nitric oxide (NO) ซึ่งทำให้เกิดการคลายตัวของลำไส้ นอกจากนี้ยังพบว่า citral มีฤทธิ์เป็น antagonist ของ Ca^{2+} ด้วย

ฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง

จากการศึกษาผลของน้ำมันตะไคร้แกงต่อระบบประสาทส่วนกลางในหนูไมซ์ของ (Blanco, Costa et al. 2009) ด้วยวิธีการทดสอบ elevated plus maze และการทดสอบ light/dark box พบว่าน้ำมันตะไคร้แกงมีฤทธิ์ลดระดับความตื่นกลัวของหนูได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยประเมินจากระยะเวลาที่หนูใช้ของแต่ละการทดสอบ นอกจากนี้มีการทดสอบฤทธิ์การป้องกันการชักในหนูของน้ำมันตะไคร้แกงด้วยวิธีการกระตุ้นให้เกิดการชักด้วยไฟฟ้า พบว่าหนูที่ได้รับน้ำมันตะไคร้แกงสามารถลดอุบัติการณ์การเกิดการชักของหนูได้ โดยเชื่อว่ากลไกการยับยั้งการชักมาจากการเพิ่มระดับ threshold ของการชัก

ฤทธิ์ต้านกระบวนการอักเสบ

พบว่า citral สามารถกดการทำงานของ cyclooxygenase-2 (COX-2) ได้จากการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง murine macrophages ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (Katsukawa, Nakata et al. 2010) รวมทั้งมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไซโตคายน์ต่างๆ ได้แก่ IL-1β, IL-6 และ IL-10 (Bachiega and Sforcin 2011) ลดการสร้าง NO และ iNOS (inducible nitric oxide synthase) ที่กระตุ้นจาก lipopolysaccharide อันเป็นกลไกที่ทำให้น้ำมันตะไคร้แกงมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ (Figueirinha, Cruz et al. 2010)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าสารสกัดจากตะไคร้แกงสามารถดักจับ 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระ โดยตรวจจากค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบ DPPH นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์ xanthine oxidase ซึ่งเป็นตัวออกซิไดส์ hypoxanthine ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ superoxide anion และยังลดการเกิดสารประกอบของ TBAR (thiobarbituric acid) ซึ่งเป็นผลผลิตจากการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ในเซลล์เม็ดเลือดแดง (Cheel, Theoduloz et al. 2005)

ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

จากการศึกษาของ (Puatanachokchai 1994) พบว่าสารสกัดจากตะไคร้แกงสามารถลดการเจริญของก้อนเนื้องอกและลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปที่ปอดได้ หลังจากการปลูกถ่าย

เซลล์มะเร็งชนิด fibrosarcoma ลงบนหนู และมีการงานศึกษาของ (Suaeyun, Kinouchi et al. 1997) พบว่าเมื่อใช้สารสกัดจากตะไคร้แกง สามารถยับยั้งกระบวนการ DNA adduction และลดอุบัติการณ์การเกิดรอยโรคที่ crypt ของลำไส้ใหญ่ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดเซลล์มะเร็งได้

ฤทธิ์ต่อระดับโคเลสเตอรอลและน้ำตาลในเลือด

จากการศึกษาของ (Costa, Bidinotto et al. 2011) พบว่าหนูไมซ์ที่ได้รับน้ำมันตะไคร้แกงขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีระดับโคเลสเตอรอลในซีรั่มต่ำกว่าในหนูกลุ่มทดลองและหนูที่ได้รับน้ำมันตะไคร้แกงขนาด 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีรายงานการศึกษาผลของน้ำมันตะไคร้แกงต่อระดับน้ำตาล โคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ ไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูงและต่ำ ผลการศึกษาที่ทำในหนูแรท พบว่าน้ำมันตะไคร้แกงสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูได้หลังการเหนี่ยวนำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นด้วย alloxan โดยหลังจากได้รับน้ำมันตะไคร้แกงนาน 2 สัปดาห์ ระดับน้ำตาลและไลโปโปรตีนในเลือดหนูที่ได้รับน้ำมันตะไคร้แกงต่ำกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้พบระดับไตรกลีเซอไรด์และโคเลสเตอรอลในเลือดหนูที่ได้รับน้ำมันตะไคร้แกงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ต่ำกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (Ewenighi, Dimkpa et al. 2013)

ฤทธิ์ต้านเชื้อรา

จากการทดสอบภายนอกร่างกายของน้ำมันตะไคร้แกงพบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ *Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus, Colletotrichum coccodes, Botrytis cinerea, Cladosporium herbarum* และ *Rhizopus stolonifer* จึงทำให้มีการนำน้ำมันตะไคร้แกงไปใช้ถนอมอาหารป้องกันการเจริญของเชื้อรา (Tzortzakis and Economakis 2007) รวมทั้งยีสต์ในกลุ่ม Candida ได้แก่ *Candida albicans, Candida glabrata, Candida krusei, Candida parapsilosis และ Candida tropicalis* (Silva Cde, Guterres et al. 2008) นอกจากนี้มีการศึกษาของ (Wannissorn, Jarikasem et al. 1996) เกี่ยวกับผลของน้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้อราประเภท dermatophyte ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *Trichophyton rnentugrophytes, Trichophyton rubrum, Epidermophyton fioccosum* และ *Microsporum gypseum* ซึ่งพบว่าเชื้อราดังกล่าวมีความไวต่อน้ำมันตะไคร้แกงทั้งในรูปแบบน้ำมันและครีม และพบรูปแบบการออกฤทธิ์ของน้ำมันตะไคร้แกงเป็นสารฆ่าเชื้อรา (fungicidal) จากการเปรียบเทียบค่า MIC และ MBC ในหลอดทดลอง

ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

น้ำมันตะไคร้แกงมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยออกฤทธิ์ได้ดีกับแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่า

แบคทีเรียแกรมลบ พบว่าจากการทดสอบภายนอกร่างกาย น้ำมันตะไคร้แกงมีฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Neisseria gonorhoeae, Clostridium perfringens, Acinetobacter baumanii, Aeromonas veronii, Enterobacter faecalis, Salmonella enterica* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Serratia marcenscens, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Shigella flexneri, Listeria monocytogenes* และ *Yersinia pseudotuberculosis* แต่ไม่พบฤทธิ์ต้าน *Pseudomonas aeruginosa* (Naik, Fomda et al. 2010) (Rusenova and Parvanov 2009) ทั้งนี้มีรายงานว่าเมื่อใช้น้ำมันตะไคร้แกงร่วมกับ phenoxyethanol จะมีฤทธิ์ต้านเชื้อดังกล่าวได้ (Onawunmi 1988) พบว่าสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ geranial และ neral ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม citral อย่างไรก็ตามพบว่า myrcene สามารถมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับ citral แต่ไม่พบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเมื่อให้ myrcene เพียงตัวเดียว (Onawunmi, Yisak et al. 1984) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่า MIC ของ citral และน้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้อชนิดเดียวกันจากงานวิจัยของ (Aiemsaard, Aiumlamai et al. 2011) พบว่าน้ำมันตะไคร้แกงมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการให้ citral เพียงอย่างเดียว

จากการศึกษากลไกของน้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้อแบคทีเรียในระดับเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า น้ำมันตะไคร้แกงทำให้เกิดความเสียหายที่ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* โดยพบการแตกและหลุดลอกบริเวณผิวเซลล์ พบการกระจายตัวของไซโตพลาสซึมที่ไม่สม่ำเสมอ และพบความหนาของชั้นผนังเซลล์แบคทีเรียที่ไม่สม่ำเสมอกัน (Tyagi and Malik 2012) เช่นเดียวกับการศึกษาของ (Aiemsaard, Aiumlamai et al. 2011) ซึ่งได้ใช้น้ำมันตะไคร้แกงทดสอบกับเชื้อ *Staphylococcus aureus* พบว่าเกิดรอยหลุมที่บริเวณผิวเซลล์ชั้นนอกของเชื้อแบคทีเรีย และพบว่าเมื่อและมีงานศึกษาการใช้น้ำมันตะไคร้จาก *Cymbopogon densiflorus* ต่อเชื้อ *S. aureus* โดยพบว่าหลังได้รับน้ำมันตะไคร้ พบลักษณะรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียมีความเสียหาย จึงคาดว่าฤทธิ์ของน้ำมันตะไคร้อาจเกี่ยวข้องกับเมทาบอลิซึมของไซโตพลาซึมและผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย (Takaisi-Kikuni, Kruger et al. 1996)

การตรวจความไวของสารต้านจุลชีพ

วิธีการตรวจหาความไวรับของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพที่นิยมใช้มีดังนี้

- Disc diffusion method: ทดสอบโดยการใช้แผ่นกระดาษกรองที่มีสารต้านจุลชีพวางลงในจานเพาะเชื้อที่มีการกระจายเชื้อแล้ว หลังการบ่มเชื้ออ่านผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสรอบแผ่น disc หากมีขนาด inhibition zone มากแสดงว่าสาร

ต้านจุลชีพมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อได้มาก วิธีนี้บอกได้ว่าเชื้อมีความไวต่อสารต้านจุลชีพหรือไม่ แต่ไม่สามารถบอกค่า MIC หรือ MBC ได้ (CLSI 2008)

- Agar dilution method: ทดสอบโดยการเจือจางสารต้านจุลชีพลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้น แล้วทำการถ่ายเชื้อลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีนี้สามารถอ่านค่า MIC ได้จากความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่น้อยที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่สามารถตรวจค่า MBC ได้ (CLSI 2008)

- Broth dilution method: วิธีนี้ใช้หลักการเดียวกับ agar dilution method แต่เปลี่ยนจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นเป็นชนิดเหลว และอ่านค่า MIC จากความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่น้อยที่สุดที่ไม่พบความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อมองด้วยตาเปล่า นอกจากนี้ยังสามารถตรวจค่า MBC ได้โดยการเพาะเชื้อจากอาหารเหลวที่ไม่พบความขุ่น หลังการบ่มเพาะเชื้ออ่านค่า MBC จากความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารต้านจุลชีพที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ (CLSI 2008)

ผลการศึกษาการใช้ตะไคร้แกงเป็นวัตถุเติมในอาหารไก่

ได้มีการทดลองนำใบตะไคร้แกงบดมาเสริมลงในอาหารเลี้ยงไก่ในอัตราส่วน 1% เพื่อเปรียบเทียบสมรรถนะการเจริญเติบโตระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ Teramycin พบว่าไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับใบตะไคร้แกงบดผสมอาหารให้อัตราการแลกเนื้อได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และให้ผลเทียบเท่ากับกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ รวมทั้งพบอัตราการตายที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มไก่ที่ได้รับใบตะไคร้แกงบดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Mmereole 2010) ในขณะที่การทดลองของ (บงกช นพผล, เสรี แข็งแอ et al. พ.ศ. 2546) ได้ใช้ตะไคร้แกงผงเสริมลงในอาหารไก่เพื่อวัดน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในไก่พื้นเมือง พบว่าการเสริมตะไคร้แกงผงนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มไก่ที่ได้รับอาหารควบคุม ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ให้เหตุผลว่าอาจเกี่ยวข้องจากปริมาณของตะไคร้แกงผงที่ใส่ในอาหารนั้นประกอบไปด้วยเส้นใยมากกว่าสมุนไพรชนิดอื่นที่ผู้วิจัยนำมาใช้ในการเร่งการเจริญเติบโต รวมทั้งมีปริมาณโปรตีนและไขมันค่อนข้างต่ำ ทำให้ไก่เจริญเติบโตได้ช้า

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 การหาปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกงที่น้อยที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration; MIC) และความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกงที่น้อยที่สุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration; MBC)

1.1 วัสดุอุปกรณ์

1.1.1 96-well microplate (Thermo Scientific Nunc, USA)
1.1.2 automatic pipette (Gilson, U54756, France)
1.1.3 micropipette tip (Socorex, Swiss)
1.1.4 multichannel pipette (BioPette™, Labnet)
1.1.5 pipette 5, 10 ml
1.1.6 หลอดทดลอง
1.1.7 เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer Genie 2) (Scientific Industries, G650E)
1.1.8 ห่วงเขี่ยเชื้อ
1.1.9 cotton swab ปลอดเชื้อ
1.1.10 ตะเกียงบุนเซน
1.1.11 จานเพาะเชื้อ
1.1.12 ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 °C (Termaks B1112)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.2 สารเคมี

1.2.1 Mueller Hinton broth (MHB) (DIFCO)
1.2.2 Nutrient agar (DIFCO)
1.2.3 sodium chloride (Sigma, U.S.A.)
1.2.4 Tween-80 (Merck, Germany)
1.2.5 น้ำกลั่น
1.2.6 น้ำมันตะไคร้แกง (Thai-China Flavours and Fragrances Industry Co.)

1.3 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียอ้างอิงและเชื้อแบคทีเรียจากการทดลองที่นำมาทดสอบ ได้แก่

1.3.1 *Escherichia coli* ATCC 25922

1.3.2 *Lactobacillus plantarum* NRIC 1067

1.3.3 *Lactobacillus sakei* ATCC 15521

1.3.4 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

1.3.5 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

1.3.6 *Lactobacillus* spp. จากอุจจาระไก่ปกติ 30 ตัวอย่าง

1.3.7 *E. coli* จากอุจจาระไก่ปกติ 30 ตัวอย่างและจากทางเดินหายใจไก่ที่แสดงอาการป่วยทางระบบทางเดินหายใจ 1 ตัวอย่าง

นำแบคทีเรียแต่ละชนิดมาเพาะลงบน nutrient agar บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อบริสุทธิ์ก่อนที่จะนำเชื้อไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ให้นำ cotton swab ปลอดเชื้อป้ายเอาโคโลนีจากจานเพาะเชื้อมาปรับความเข้มข้นด้วย normal saline 0.85% ให้มีความเข้มข้นของเชื้อที่ 0.5 McFarland มาตรฐาน (1 x 10^8 CFU/ml) และนำเชื้อมาเจือจางด้วย Mueller Hinton broth (MHB) 10 เท่า

1.4 น้ำมันตะไคร้แกง

ใช้ผลิตภัณฑ์น้ำมันตะไคร้แกงจากบริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทยจีนจำกัด ผลิตภัณฑ์บรรจุในขวดอะลูมิเนียมปิดสนิทจนกว่าจะนำมาใช้

1.5 การเตรียมสารละลายน้ำมันตะไคร้แกง

เตรียมสารละลายน้ำมันตะไคร้แกงใน MHB ให้มีความเข้มข้น 1% (v/v) และเติม tween-80 ให้มีความเข้มข้น 1% (v/v) จากนั้นทำ Two-fold serial dilution ให้มีความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกงที่ 0.5%, 0.25%, 0.12%, 0.06%, 0.03% และ 0.01% (v/v) เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4°C ไม่เกิน 24 ชั่วโมง และเก็บให้พ้นแสงสว่าง

1.6 การทำ broth microdilution test (Hammer, Carson et al. 1996)

เตรียมสารละลายน้ำมันตะไคร้แกงความเข้มข้น 2% ,1%, 0.5%, 0.25%, 0.125%, 0.06% และ 0.03% (v/v) ลงในแต่ละแถว แถวละ 10 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 100 ไมโครลิตร โดยแยกชนิดของเชื้อแต่ละชุด เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันตะไคร้แกงที่ 1%, 0.5% 0.25%, 0.125%, 0.06%, 0.03% และ 0.01% (v/v)

เติม Mueller Hinton broth 100 ไมโครลิตร และเชื้อแบคทีเรียอีก 100 ไมโครลิตรเพื่อใช้

เทียบเป็น positive control และเติม MHB 200 ไมโครลิตรเพื่อทำเป็น negative control การทดลองทั้งหมดทำซ้ำอีก 1 ชุด จากนั้นนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.7 การอ่านค่า MIC

หลังการบ่มเชื้อสังเกตการเจริญของเชื้อในแต่ละหลุม โดยค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันตะไคร้แกงที่ทำให้เชื้อไม่เจริญเติบโตเมื่อมองด้วยตาเปล่า

1.8 การทดลองหาค่า MBC

หลังการบ่มเชื้อและอ่านผล MIC ให้เพาะเชื้อจากหลุมที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar โดยเลือกจากหลุมที่มีความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกงน้อยที่สุด 3 ความเข้มข้นที่ทำให้เชื้อไม่เจริญเมื่อมองด้วยตาเปล่า นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยค่า MBC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันตะไคร้แกงที่ไม่ทำให้เกิดการเจริญของเชื้อหลังนำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.9 การแสดงผลการทดลอง

ค่า MIC และ MBC ที่ได้จะนำเสนอในหน่วย % โดยปริมาตร (v/v) และแสดงข้อมูลทางสถิติแบบพรรณนา (descriptive statistics)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การทดลองที่ 2 การนับจำนวนและวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างอุจจาระและลำไส้ส่วนต่างๆ ของไก่

2.1 วัสดุอุปกรณ์

2.1.1 กรงเลี้ยงไก่
2.2.2 รางอาหารและน้ำ
2.2.3 มีดผ่าตัด
2.2.4 กรรไกรผ่าตัด
2.2.5 เครื่องชั่งไฟฟ้า (Precisa, BJ410C)
2.2.6 automatic pipette (Gilson, U54756, France)
2.2.7 micropipette tip (Socorex, Switzerland)
2.2.8 หลอดทดลอง
2.2.9 เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer Genie 2) (Scientific Industries, G650E)
2.2.10 จานเพาะเชื้อ
2.2.11 ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37°C (Termaks)
2.2.12 ตู้อบลมร้อน (WTC Binder, 1905330000200, Germany)
2.2.13 แท่งแก้วสามเหลี่ยม (MIT technology, Thailand)
2.2.14 ตะเกียงบุนเซน (Science integration, Thailand)
2.2.15 เข็มเขี่ยเชื้อ
2.2.16 ห่วงเขี่ยเชื้อ
2.2.17 กระจกสไลด์
2.2.18 กล้องจุลทรรศน์
2.2.19 กระดาษกรอง (Whatman No.1, England)

2.3 สารเคมี

2.2.1 95% ethanol (Carlo Erba, Italy)
2.2.2 bile salt No.3 (DIFCO, USA)
2.2.3 Congo red dye (Sigma-Aldrich, USA)
2.2.4 dimethyl-p-phenylenediamine hydrochloride (Sigma, USA)
2.2.5 dipotassium phosphate (Sigma, USA)
2.2.6 eosin methylene blue (EMB) agar (DIFCO, USA)
2.2.7 glucose (Merck, Germany)
2.2.8 Hugh Leifson OF medium (Oxoid, UK)
2.2.9 hydrogen peroxide (Sigma, USA)
2.2.10 Man Rogosa and Sharpe (MRS) agar (DIFCO, USA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2.11 motility test medium (DIFCO, USA)
2.2.12 peptone (DIFCO, USA)
2.2.13 sodium chloride (Merck, Germany)
2.2.14 Simmon's citrate medium (Oxoid, UK)
2.2.15 stock culture agar (DIFCO, USA)
2.2.16 trypticase soy agar (TSA) (DIFCO, USA)
2.2.17 urea agar (Oxoid, UK)

2.3 สัตว์ทดลอง

ไก่เนื้อพันธุ์ Cobb-500 เพศเมีย อายุ 1 วัน เลี้ยงในห้องวิจัยทดลองไก่ ณ ศูนย์ฝึกนิสิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม แยกห้องเลี้ยงตามกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่มเปิดไฟสว่างตลอด 24 ชั่วโมง ได้รับอาหารและน้ำสะอาดตลอดเวลา ทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 42 วัน ให้วัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลในไก่อายุ 1 วันและทำวัคซีนซ้ำที่อายุ 7 วัน และทำวัคซีนโรคเบอร์ซ่าอักเสบติดต่อที่อายุ 18 วัน เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงให้ทำเมตตาฆาตด้วยวิธีการดึงคอ (cervical dislocation)

ขั้นตอนการเลี้ยงและกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ครั้งที่ 4/2556 (ใบอนุญาตเลขที่ 13310030)

2.4 อาหารสัตว์ทดลอง

ใช้อาหารพื้นฐานสำเร็จรูปชนิดผงจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) สำหรับกลุ่มอาหารทดลองจะถูกผสมกับน้ำมันตะไคร้แกงในรูปของสารผสมล่วงหน้า (premix) อาหารที่ผสมเสร็จแล้วจะแบ่งบรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ปิดสนิทจนกว่าจะนำมาใช้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.5 กลุ่มทดลอง

ไก่เนื้อทั้งหมด 120 ตัว แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 30 ตัว ทำ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 6 ตัว ดังนี้

- กลุ่มที่ 1: ได้รับอาหารควบคุมปกติ (กลุ่มควบคุม)
- กลุ่มที่ 2: ได้รับอาหารผสมกับน้ำมันตะไคร้แกงขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (0.01%)
- กลุ่มที่ 3: ได้รับอาหารผสมกับน้ำมันตะไคร้แกงขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (0.02%)

- กลุ่มที่ 4: ได้รับอาหารผสมกับน้ำมันตะไคร้แกงขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (0.04%)

2.6 การเก็บตัวอย่าง

วันที่ 1 ของการเลี้ยง สุ่มเลือกไก่จากแต่ละกลุ่มมากลุ่มละ 5 ตัว ทำการเมตตาฆาตไก่และเก็บลำไส้เล็กส่วนต้นจนถึงส่วนท้ายมาตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย

เก็บอุจจาระไก่บนกระดาษมันรองใต้กรงเลี้ยงไก่ ในวันที่ 7, 14, 21, 28 และ 42 ของการเลี้ยง อุจจาระไก่ที่เก็บได้นำมา pool รวมกันภายในกลุ่ม และเก็บตัวอย่างทางเดินอาหารส่วนต่างๆ ของไก่ ได้แก่ jejunum, ileum และ cecum หลังการทำเมตตาฆาตไก่

ตัวอย่างที่ได้เก็บใส่ถุงพลาสติก เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C นำมาตรวจภายใน 24 ชั่วโมง

2.7 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

2.7.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียม Mann Rogosa Sharpe (MRS) agar ในอัตราส่วน 70 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร และ Eosin methylene blue (EMB) agar ในอัตราส่วน 36 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเข้ากันดีแล้วนำไปบรรจุใส่ขวดแก้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาเทลงในจานเพาะเชื้อ ทิ้งให้วุ้นแข็งตัว แล้วนำจานเพาะเชื้อไปเป่าให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 5 นาที

2.7.2 การเตรียมสารละลาย peptone diluting saline (PDS)

เตรียม peptone ในอัตราส่วน 1 กรัม และ sodium chloride 8.5 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ตวงใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 9 มิลลิลิตร ปิดหลอดด้วยสำลี แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2.8 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

2.8.1 การนำตัวอย่างมาเพาะเชื้อ (ISO-6887-1 1999)

นำตัวอย่างอุจจาระหรือลำไส้มาบดให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วชั่งตัวอย่างมา 1 กรัม ละลายในสารละลายเจือจาง PDS ปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer จากนั้นทำ ten-fold dilution โดยให้มีความเข้มข้นของสารละลายตั้งแต่ 10^{-1} ไปจนถึง 10^{-9} กรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายตัวอย่างมา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน EMB agar แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยสารละลายให้ทั่วจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สำหรับการเพาะเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ให้ดูดสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อเปล่าแล้วเท MRS agar ลงในจาน (pour plate) แกว่งจานเพาะเชื้อให้สารละลายกระจายทั่วกัน รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวแล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.8.2 การนับจำนวนเชื้อ (ISO-15214 1998)

เลือกนับจำนวนเชื้อจากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนตั้งแต่ 30 - 300 โคโลนี สำหรับการนับจำนวนเชื้อบน EMB agar ให้นับเฉพาะโคโลนีที่มีสีเขียวโลหะ (metallic sheen) รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (colony forming unit; CFU/g)

2.8.3 การตรวจพิสูจน์เชื้อ *E. coli*

เชื้อที่เพาะได้จากตัวอย่างบน EMB agar สุ่มเลือกมา 1-2 โคโลนีที่มีสีเขียวโลหะ เก็บลงใน stock culture agar แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อที่เพาะได้นำมาตรวจพิสูจน์ในขั้นต่อไป

2.8.3.1 การตรวจยืนยันลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli*

นำเชื้อมาตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยวิธีต่างๆ ตามคู่มือของ Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria (Cowan and Steel 1993) คัดเลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar โดยการทดสอบคุณสมบัติขั้นปฐมภูมิ (primary biochemical test) ได้แก่ การย้อมสีแกรม, การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase test), การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test), การทดสอบคุณสมบัติในการเคลื่อนที่ของเชื้อ (motility test) และการทดสอบออกซิเด-ชั่นเฟอร์เมนเตชั่น (oxidation-fermentation test) นำมาเปรียบเทียบตารางของ Cowan and Steel's จากนั้นทำการพิสูจน์คุณลักษณะทางชีวเคมีขั้นทุติยภูมิ (secondary biochemical test) ได้แก่ การทดสอบอินโดล (Indole test), การทดสอบเมทิลเรด (methyl red test), การทดสอบ Voges-Proskauer, การทดสอบซิเตรต (citrate test)และ การทดสอบยูริเอส (urease test) เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ *E. coli*

2.8.3.2 การตรวจแยกชนิดของเชื้อ *E. coli*

เป็นการแยกประเภทของเชื้อ *E. coli* ว่าเป็นชนิด pathogenic หรือ non-pathogenic *E. coli* ด้วยวิธีของ (Berkhoff and Vinal 1986) โดยเพาะเชื้อ *E. coli* ลงบน Congo red agar จากนั้นนำไปบ่มเชื้อในสภาพ aerobic ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทิ้งไว้ที่

อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน สังเกตสีของโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าเป็น *E. coli* ชนิด pathogenic โคโลนีจะติดสีแดงเข้มและพบ clear zone รอบโคโลนี

2.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการนับจำนวนเชื้อแสดงอยู่ในค่า log ของจำนวนโคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี One-way Analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's multiple range test โดยพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 95% ($p < 0.05$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกงที่ต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration; MIC) และความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกงที่น้อยที่สุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration; MBC)

ผลของการใช้น้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้อแบคทีเรียควบคุม (ตารางที่ 4-1) พบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดยกเว้น *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ไวต่อน้ำมันตะไคร้แกง โดยเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 มีค่า MIC ของน้ำมันตะไคร้แกงที่ความเข้มข้น 0.03% และเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, *Lactobacillus plantarum* NRIC 1067 มีค่า MIC ของน้ำมันตะไคร้แกงที่ความเข้มข้น 0.12% นอกจากนี้พบว่าค่า MBC ที่ได้ไม่แตกต่างกันกับค่า MIC ของแต่ละแบคทีเรียทุกชนิด

ผลของการใช้น้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. จากตัวอย่างอุจจาระไก่เนื้อทั้งหมด 30 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4-2) พบว่าค่า MIC ของน้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้ออยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.06 ถึง 0.25% โดยพบค่า MIC ความเข้มข้น 0.12% มากที่สุดเป็นจำนวน 13 ตัวอย่าง คิดเป็นค่า MIC_{90} เท่ากับ 0.25% สำหรับเชื้อ *E. coli* พบค่า MIC ของน้ำมันตะไคร้แกงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.12 ถึง 0.5% โดยพบค่า MIC ที่ความเข้มข้น 0.25% มีมากที่สุดเป็นจำนวน 17 ตัวอย่าง คิดเป็นค่า MIC_{90} เท่ากับ 0.25% ส่วนผลต่อเชื้อ *E. coli* จากทางเดินหายใจของไก่ป่วย พบว่าค่า MIC และ MBC ของน้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้อเท่ากับ 0.12%

สำหรับค่า MBC ต่อเชื้อ *Lactobacillus* spp. จากทุกตัวอย่างพบว่าไม่แตกต่างกันกับค่า MIC ของแต่ละแบคทีเรีย และค่า MBC ต่อเชื้อ *E. coli* พบว่ามีเพียง 3 ตัวอย่างที่ต้องใช้ความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกงสูงขึ้นกว่าเดิมเป็น 2 เท่าในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ส่วนอีก 27 ตัวอย่างพบว่าค่า MBC ที่ได้ไม่แตกต่างกันกับค่า MIC

ตารางที่ 4-1 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันตะไคร้แกงที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียควบคุมชนิดต่างๆ

เชื้อแบคทีเรีย	**MIC (%v/v)**	**MBC (%v/v)**
Staphylococcus aureus ATCC 29213	0.03	0.03
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	> 1.0	N/A
Escherichia coli ATCC 25922	0.12	0.12
Lactobacillus sakei ATCC 15521	0.12	0.12
Lactobacillus plantarum NRIC 1067	0.12	0.12

N/A: ไม่ได้ทำการทดสอบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4-2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันตะไคร้แกงที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอุจจาระไก่เนื้อปกติและทางเดินหายใจไก่ป่วย (ในวงเล็บแสดงถึงจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลต่อจำนวนตัวอย่างทั้งหมด)

เชื้อแบคทีเรีย	**MIC (%)**	**MIC_{90} (%)**	**MBC (%)**	**MBC_{90} (%)**
Lactobacillus spp. จากอุจจาระ	0.06 (11/30) 0.12 (13/30) 0.25 (6/30)	0.25	0.06 (11/30) 0.12 (13/30) 0.25 (6/30)	0.25
E. coli จากอุจจาระ	0.12 (12/30) 0.25 (17/30) 0.5 (1/30)	0.25	0.12 (9/30) 0.25 (18/30) 0.5 (3/30)	0.25
E. coli จากทางเดินหายใจ	0.12 (1/1)	-	0.12 (1/1)	-

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การทดลองที่ 2 การนับจำนวนและวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างอุจจาระและลำไส้ส่วนต่างๆ ของไก่

2.1 ผลของน้ำมันตะไคร้แกงต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรียในอุจจาระไก่

ในวันที่ 1 และ 7 จำนวนเชื้อกลุ่ม lactic acid bacteria จากอุจจาระไก่เนื้อ (ตารางที่ 4-3) (รูปที่ 4-1) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลอง ในวันที่ 14 และ 21 พบว่ากลุ่มไก่ที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันตะไคร้แกง 0.01% พบจำนวนเชื้อน้อยกว่ากลุ่มทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวันที่ 28 และในวันที่ 42 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลอง

จำนวนเชื้อ *E. coli* จากอุจจาระไก่เนื้อ (ตารางที่ 4-4) (รูปที่ 4-2) ในวันที่ 1, 7 และ 14 ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลอง วันที่ 21 พบว่ากลุ่มไก่ที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันตะไคร้แกง 0.01% มีจำนวนเชื้อน้อยกว่ากลุ่มทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวันที่ 28 พบว่ากลุ่มไก่ที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันตะไคร้แกง 0.02% และ 0.04% มีจำนวนเชื้อน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในวันที่ 42 พบว่าจำนวนเชื้อในแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเทียบอัตราส่วนระหว่างจำนวนเชื้อ lactic acid bacteria ต่อจำนวนเชื้อ *E. coli* ในอุจจาระไก่ของแต่ละวันพบว่าในวันที่ 21 และ 28 อัตราส่วนมีแนวโน้มที่มากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกง ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4-5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4-3 จำนวนเชื้อกลุ่ม lactic acid bacteria ในหน่วย log colony forming unit; CFU ต่อกรัมจากอุจจาระไก่เนื้อกลุ่มต่างๆ ที่อายุ 1, 7, 14, 21, 28 และ 42 วัน

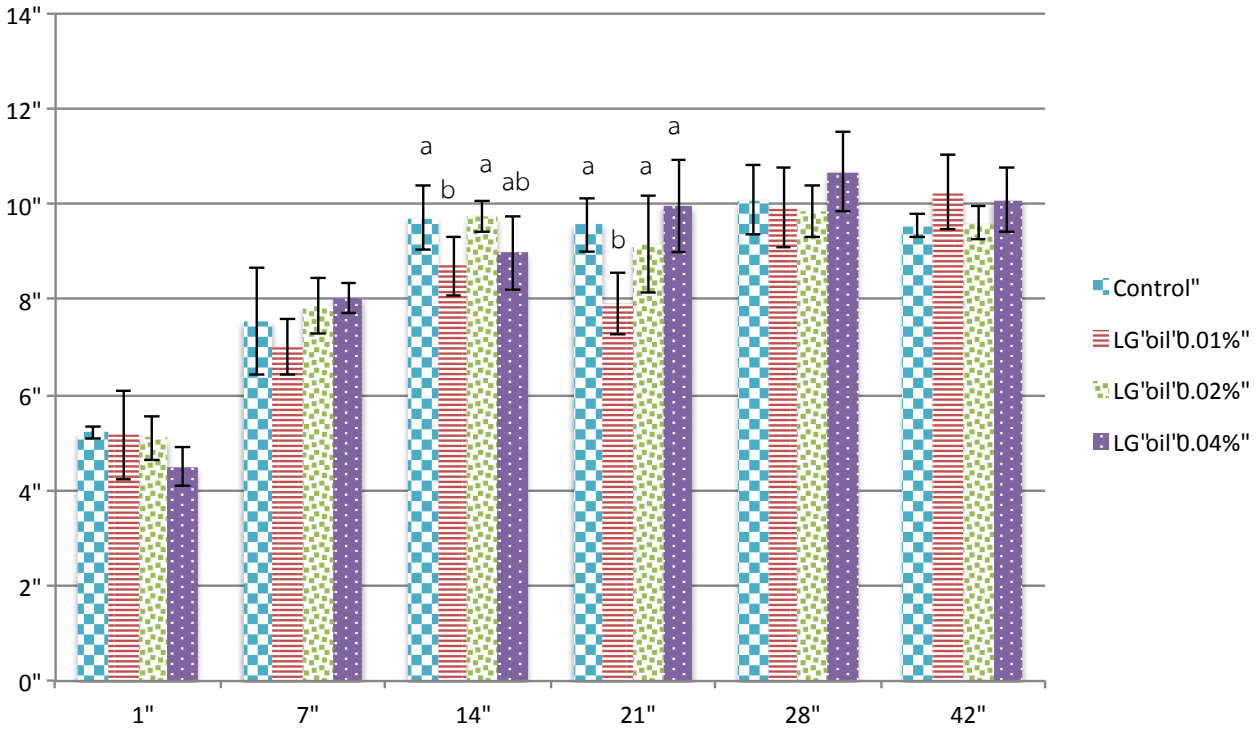
กลุ่มการทดลอง	จำนวนเชื้อ lactic acid bacteria ในรูปของ log_{10} (CFU/g)					
	1 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	28 วัน	42 วัน
กลุ่มควบคุม	5.21 ± 0.12	7.54 ± 1.11	9.72 ± 0.68[a]	9.58 ± 0.57[a]	10.09 ± 0.72	9.56 ± 0.26
น้ำมันตะไคร้แกง 0.01%	5.17 ± 0.94	7.02 ± 0.59	8.70 ± 0.61[b]	7.90 ± 0.65[b]	9.92 ± 0.84	10.25 ± 0.77
น้ำมันตะไคร้แกง 0.02%	5.10 ± 0.47	7.87 ± 0.58	9.75 ± 0.34[a]	9.16 ± 1.01[a]	9.85 ± 0.55	9.61 ± 0.34
น้ำมันตะไคร้แกง 0.04%	4.49 ± 0.41	8.04 ± 0.32	8.97 ± 0.76[ab]	9.97 ± 0.97[a]	10.69 ± 0.86	10.09 ± 0.67

ข้อมูลแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จำนวนตัวอย่างต่อกลุ่ม (n) = 5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4-1 กราฟแท่งแสดงจำนวนเชื้อกลุ่ม lactic acid bacteria ในหน่วย log colony forming unit; CFU ต่อกรัมจากอุจจาระไก่เนื้อกลุ่มต่างๆ ที่อายุ 1, 7, 14, 21, 28 และ 42 วัน

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p <0.05)
จำนวนตัวอย่างต่อกลุ่ม (n) = 5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4-4 จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในหน่วย log colony forming unit; CFU ต่อกรัมจากอุจจาระไก่เนื้อกลุ่มต่างๆ ที่อายุ 1, 7, 14, 21, 28 และ 42 วัน

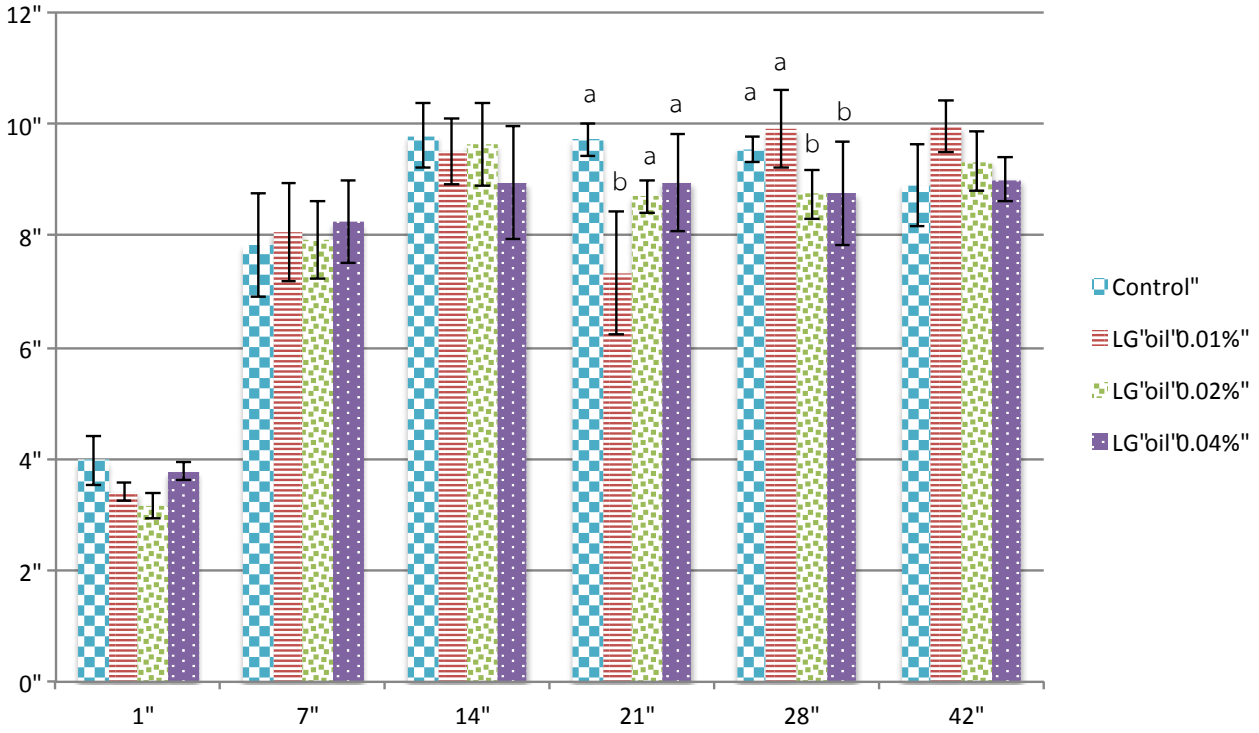
กลุ่มการทดลอง	จำนวนเชื้อ *E. coli* ในรูปของ log_{10} (CFU/g)					
	1 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	28 วัน	42 วัน
กลุ่มควบคุม	3.97 ± 0.44	7.82 ± 0.93	9.78 ± 0.58	9.73 ± 0.30[a]	9.55 ± 0.23[a]	8.90 ± 0.73
น้ำมันตะไคร้แกง 0.01%	3.41 ± 0.16	8.06 ± 0.89	9.52 ± 0.60	7.34 ± 1.11[b]	9.90 ± 0.70[a]	9.96 ± 0.48
น้ำมันตะไคร้แกง 0.02%	3.17 ± 0.24	7.92 ± 0.70	9.64 ± 0.75	8.71 ± 0.30[a]	8.74 ± 0.44[b]	9.33 ± 0.53
น้ำมันตะไคร้แกง 0.04%	3.77 ± 0.16	8.24 ± 0.73	8.94 ± 1.00	8.95 ± 0.87[a]	8.75 ± 0.92[b]	9.01 ± 0.39

ข้อมูลแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จำนวนตัวอย่างต่อกลุ่ม (n) = 5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4-2 กราฟแท่งแสดงจำนวนเชื้อกลุ่ม *E. coli* ในหน่วย log colony forming unit; CFU ต่อกรัมจากอุจจาระไก่เนื้อกลุ่มต่างๆ ที่อายุ 1, 7, 14, 21, 28 และ 42 วัน

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p <0.05)
จำนวนตัวอย่างต่อกลุ่ม (n) = 5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4-5 อัตราส่วนระหว่างจำนวนเชื้อ lactic acid bacteria ต่อจำนวนเชื้อ *E. coli* จากอุจจาระไก่เนื้อกลุ่มต่างๆ ที่อายุ 1, 7, 14, 21, 28 และ 42 วัน

กลุ่มการทดลอง	อัตราส่วนจำนวนเชื้อ lactic acid bacteria ต่อจำนวนเชื้อ *E. coli*					
	1 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	28 วัน	42 วัน
กลุ่มควบคุม	1.31	0.96	0.99	0.98	1.05	1.11
น้ำมันตะไคร้แกง 0.01%	1.51	0.87	0.91	1.07	1.00	1.02
น้ำมันตะไคร้แกง 0.02%	1.60	0.99	1.01	1.05	1.12	1.03
น้ำมันตะไคร้แกง 0.04%	1.19	0.97	1.00	1.11	1.22	1.11

อัตราส่วนที่แสดงคำนวณจากค่า log CFU เฉลี่ยของเชื้อ lactic acid bacteria หารด้วยค่า log CFU เฉลี่ยของเชื้อ *E. coli*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2 ผลของน้ำมันตะไคร้แกงต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารส่วนต่างๆ ของไก่

จำนวนเชื้อกลุ่ม lactic acid bacteria ภายในลำไส้เล็กส่วนกลาง ส่วนท้ายและลำไส้ตันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองทั้ง 4 กลุ่ม (ตารางที่ 4-6), (รูปที่ 4-3)

สำหรับเชื้อ *E. coli* พบว่ากลุ่มไก่ที่ได้รับน้ำมันตะไคร้แกง 0.04% มีจำนวนเชื้อภายใน jejunum น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ใน ileum พบว่ากลุ่มไก่ที่ได้รับน้ำมันตะไคร้แกง 0.02% มีจำนวนเชื้อน้อยกว่ากลุ่มไก่ที่ได้รับน้ำมันตะไคร้แกง 0.01% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และใน cecum พบว่าไก่ที่ได้รับน้ำมันตะไคร้แกง 0.02% และ 0.04% มีจำนวนเชื้อน้อยกว่าไก่กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4-7), (รูปที่ 4-4)

เมื่อเทียบอัตราส่วนระหว่างจำนวนเชื้อ lactic acid bacteria ต่อจำนวนเชื้อ *E. coli* พบว่าอัตราส่วนจำนวนเชื้อในทางเดินอาหารทั้งสามส่วนมีแนวโน้มที่สูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกง ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4-8

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

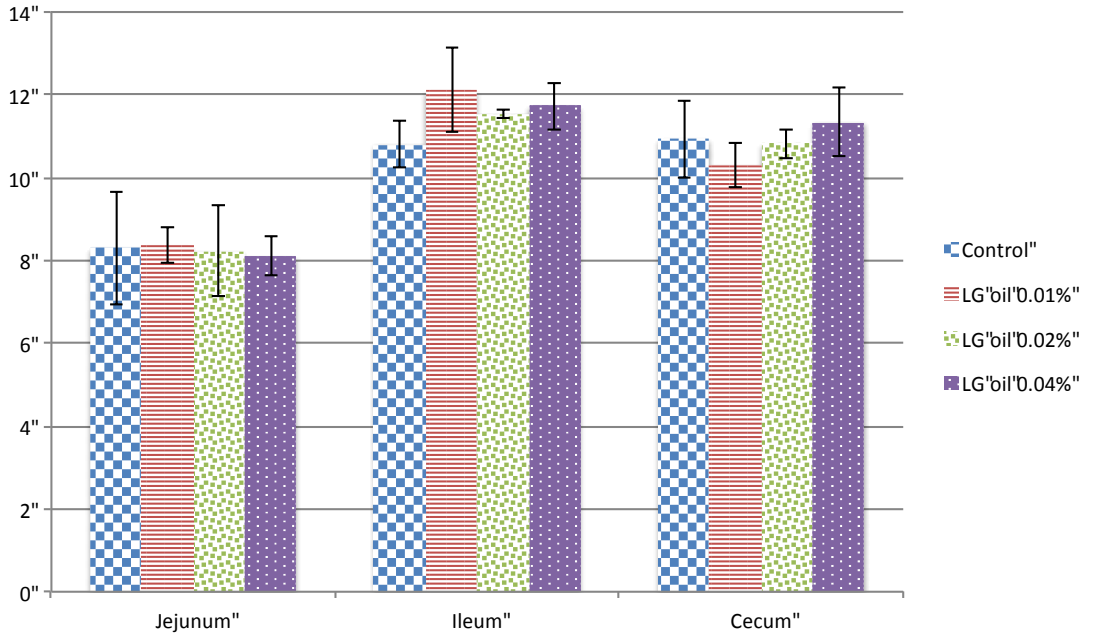
ตารางที่ 4-6 จำนวนเชื้อ lactic acid bacteria ในหน่วย log colony forming unit; CFU ต่อกรัม จากลำไส้ส่วนต่างๆ ของไก่เนื้อในแต่ละกลุ่ม

กลุ่มการทดลอง	จำนวนเชื้อ lactic acid bacteria ในรูปของ $\log_{10}$ (CFU/g)		
	jejunum	ileum	cecum
กลุ่มควบคุม	8.31 ± 1.38	10.81 ± 0.57	10.93 ± 0.93
น้ำมันตะไคร้แกง 0.01%	8.36 ± 0.43	12.11 ± 1.01	10.31 ± 0.54
น้ำมันตะไคร้แกง 0.02%	8.23 ± 1.09	11.55 ± 0.11	10.82 ± 0.35
น้ำมันตะไคร้แกง 0.04%	8.10 ± 0.45	11.73 ± 0.58	11.34 ± 0.82

ข้อมูลแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p <0.05)
จำนวนตัวอย่างต่อกลุ่ม (n) = 5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4-3 กราฟแท่งแสดงจำนวนเชื้อ lactic acid bacteria ในหน่วย log colony forming unit; CFU ต่อกรัมจากลำไส้ส่วนต่างๆ ของไก่เนื้อในแต่ละกลุ่ม

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p <0.05)
จำนวนตัวอย่างต่อกลุ่ม (n) = 5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

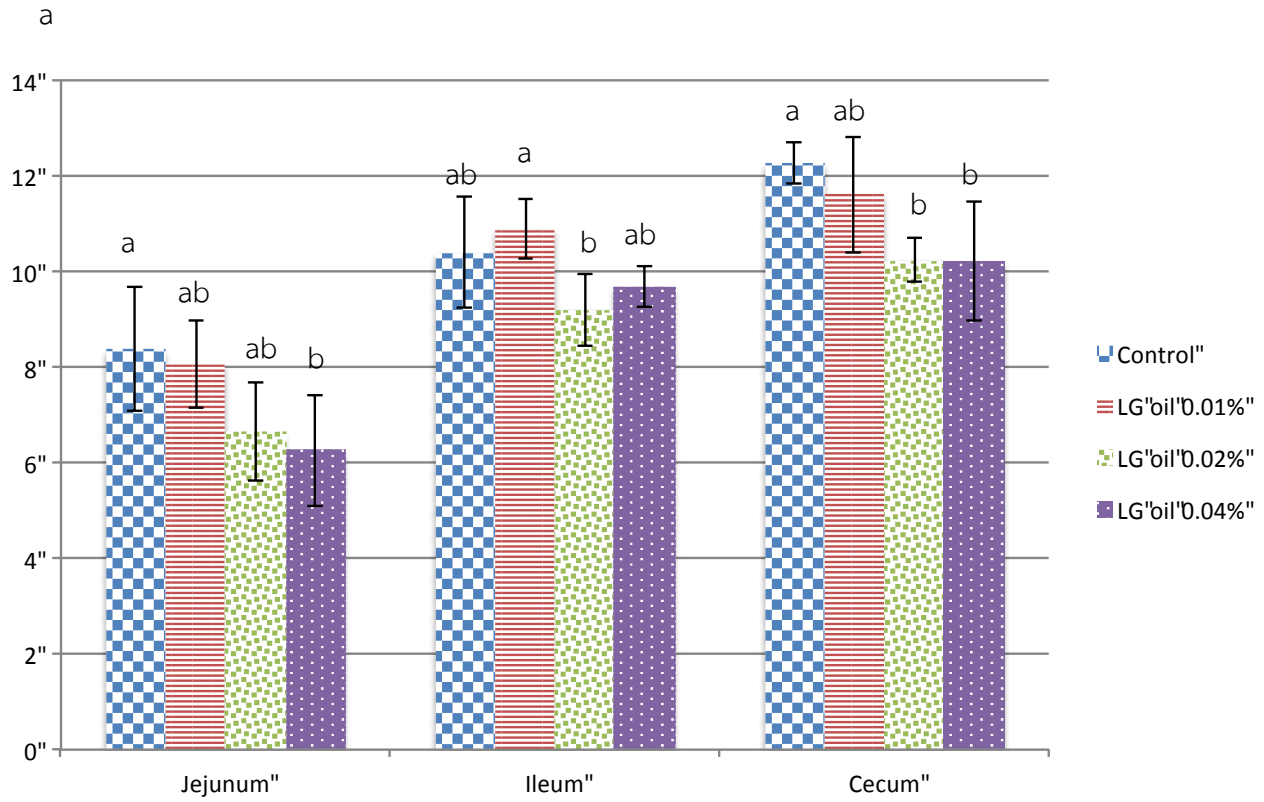
ตารางที่ 4-7 จำนวนเชื้อ *E. coli* ในหน่วย log colony forming unit; CFU ต่อกรัมจากลำไส้ส่วนต่างๆ ของไก่เนื้อในแต่ละกลุ่ม

กลุ่มการทดลอง	จำนวนเชื้อ *E. coli* ในรูปของ $\log_{10}$ (CFU/g)		
	jejunum	ileum	cecum
กลุ่มควบคุม	8.37 ± 0.28^{a}	10.40 ± 1.17^{ab}	12.26 ± 0.44^{a}
น้ำมันตะไคร้แกง 0.01%	8.05 ± 0.90^{ab}	10.89 ± 0.63^{a}	11.61 ± 1.21^{ab}
น้ำมันตะไคร้แกง 0.02%	6.64 ± 1.04^{ab}	9.20 ± 0.75^{b}	10.24 ± 0.47^{b}
น้ำมันตะไคร้แกง 0.04%	6.25 ± 1.15^{b}	9.68 ± 0.42^{ab}	10.21 ± 1.25^{b}

ข้อมูลแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p <0.05)
จำนวนตัวอย่างต่อกลุ่ม (n) = 5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4-4 กราฟแท่งแสดงจำนวนเชื้อ *E. coli* ในหน่วย log colony forming unit; CFU ต่อกรัมจากลำไส้ส่วนต่างๆ ของไก่เนื้อในแต่ละกลุ่ม

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p <0.05)
จำนวนตัวอย่างต่อกลุ่ม (n) = 5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4-8 อัตราส่วนระหว่างจำนวนเชื้อ lactic acid bacteria ต่อจำนวนเชื้อ *E. coli* จากลำไส้ส่วนต่างๆ ของไก่เนื้อในแต่ละกลุ่ม

กลุ่มการทดลอง	อัตราส่วนจำนวนเชื้อ lactic acid bacteria ต่อจำนวนเชื้อ *E. coli*		
	jejunum	ileum	cecum
กลุ่มควบคุม	0.99	1.03	0.89
น้ำมันตะไคร้แกง 0.01%	1.03	1.11	0.88
น้ำมันตะไคร้แกง 0.02%	1.23	1.25	1.05
น้ำมันตะไคร้แกง 0.04%	1.29	1.21	1.11

อัตราส่วนที่แสดงคำนวณจากค่า log CFU เฉลี่ยของเชื้อ lactic acid bacteria หารด้วยค่า log CFU เฉลี่ยของเชื้อ *E. coli*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.3 การตรวจพิสูจน์เชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

ผลการพิสูจน์เชื้อ *E. coli* จากอุจจาระไก่ หลังแยกเชื้อลงบน EMB agar ด้วยวิธีต่างๆ มีดังต่อไปนี้

2.3.1 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ

เชื้อมีลักษณะเป็นแท่ง ติดสีแกรมลบ (รูปที่ 4-5)

2.3.2 การตรวจพิสูจน์เชื้อทางชีวเคมี

ผลการตรวจพิสูจน์เชื้อแสดงไว้ในตารางที่ 4-9

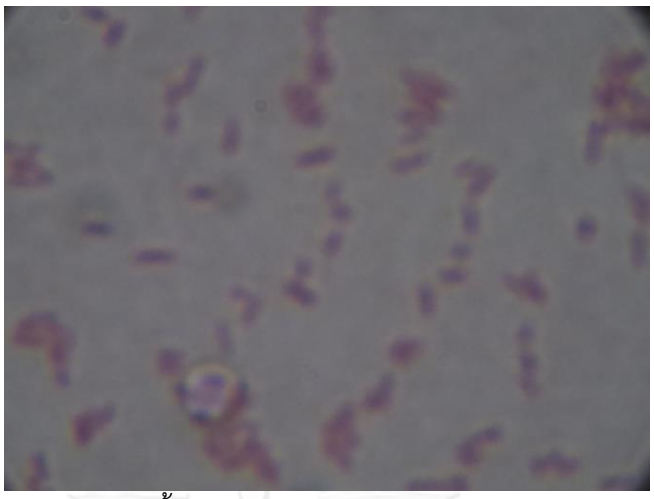
ตารางที่ 4-9 ผลการพิสูจน์ทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli* จากอุจจาระไก่

การทดสอบ	**ผลการทดสอบ**
catalase test	+
oxidase test	-
Motility test	+
Oxidation-Fermentation test	fermentation
Indole test	+
Methyl red test	+
Voges-Proskauer test	-
Citrate test	-
Urease test	-

+: แสดงผลการทดสอบบวก

-: แสดงผลการทดสอบลบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

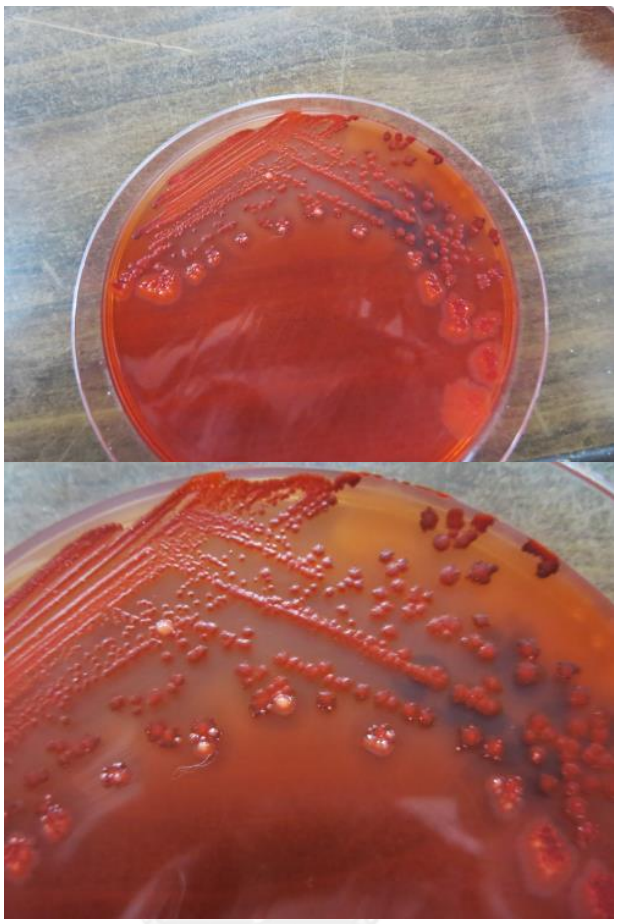


รูปที่ 4-5 แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อ *E. coli* ทางกล้องจุลทรรศน์

2.3.3 การตรวจแยกชนิดของเชื้อ *E. coli*

หลังการเพาะเชื้อ *E. coli* ลงบน Congo red agar พบว่า เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระของไก่มีลักษณะโคโลนี รูปร่างกลม สีขุ่น ขอบเรียบ (รูปที่ 4-6) ในขณะที่เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากทางเดินหายใจของไก่ป่วยมีลักษณะโคโลนี กลม สีแดง อาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนีมีลักษณะใส เมื่อเทียบกับลักษณะโคโลนีจากอุจจาระไก่ พบว่า มีขนาดเล็กกว่าเล็กน้อย (รูปที่ 4-7)

รูปที่ 4-6 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระไก่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Congo red agar



รูปที่ 4-7 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากทางเดินหายใจของไก่ป่วยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Congo red agar

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5

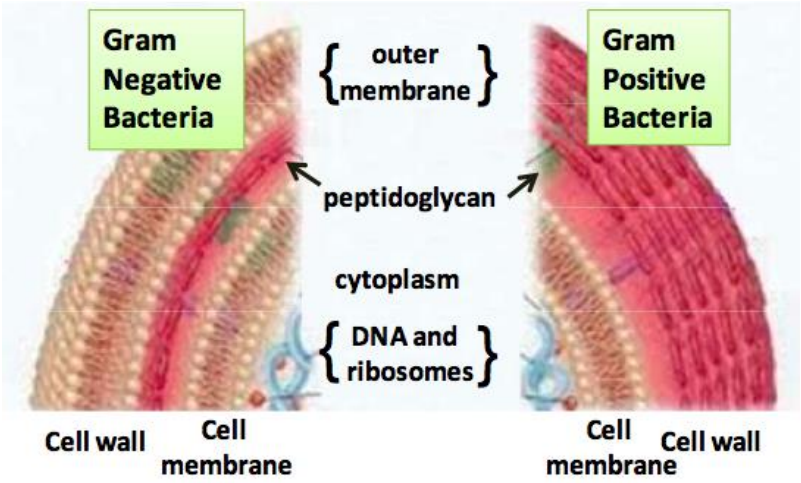
อภิปรายผล และสรุปผลการวิจัย

อภิปรายผลการวิจัย

ผลการทดสอบแบบนอกร่างกายของน้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้อแบคทีเรีย

น้ำมันหอมระเหยเป็นสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่นิยมนำมาใช้รักษาเบื้องต้น เนื่องจากมีสรรพคุณการรักษาที่หลากหลาย และคุณสมบัติการต้านจุลชีพก็เป็นหนึ่งในสรรพคุณที่พบในน้ำมันหอมระเหยหลายๆ ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีสารออกฤทธิ์แตกต่างกันไปและมีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียได้ต่างชนิดด้วย

โดยทั่วไปน้ำมันหอมระเหยออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากโครงสร้างของแบคทีเรียแกรมบวกประกอบไปด้วยผนังเซลล์ที่มีส่วนโครงสร้างเปปทิโดไกล-แคน (peptidoglycan) ที่มีความหนา (รูปที่ 5-1) และด้วยคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยที่ละลายในไขมัน จึงสามารถซึมผ่านชั้นเปปทิโดไกลแคนเข้าไปในชั้นไซโตพลาซึมของแบคทีเรียได้ ทำให้เกิดการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยต่อแบคทีเรียได้ทั่วทั้งเซลล์ ในขณะที่ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบประกอบไปด้วยชั้นเปปทิโดไกลแคนที่บาง (รูปที่ 5-1) และห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) และเยื่อหุ้มชั้นใน (inner membrane) ที่มีส่วนประกอบเป็นไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ซึ่งสามารถป้องกันสารที่มีคุณสมบัติละลายในไขมันได้ดี และโพริน (porin) ที่ทำหน้าที่เป็นช่องผ่านระหว่างชั้นเยื่อหุ้มและยอมให้โมเลกุลที่ละลายน้ำได้ซึมผ่านได้มากกว่าโมเลกุลที่ละลายในไขมัน (Nazzaro, Fratianni et al. 2013) จากผลการทดลอง พบว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum* และ *L. sakei* จากการทดลองนี้ไวต่อน้ำมันตะไคร้แกง โดยเฉพาะ *S. aureus* ซึ่งพบค่า MIC ที่ระดับ 0.03% โดยปริมาตรเท่านั้น ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ พบการออกฤทธิ์ของน้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้อ *E. coli* เท่านั้น และไม่สามารถต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ ผลที่เกิดขึ้นนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ (Naik, Fomda et al. 2010) และการศึกษาของ (Onawunmi, Yisak et al. 1984) โดยทั่วไปเชื้อ *Pseudomonas* spp. จัดเป็นเชื้อที่มีความดื้อยาสูงกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เนื่องจากโครงสร้างของเชื้อประกอบไปด้วย exopolysaccharide ที่เยื่อหุ้มชั้นนอกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น จึงทำให้มีสภาพการให้ผ่านเข้าออก (permeability) ที่ต่ำกว่าของยาต้านจุลชีพรวมทั้งน้ำมันหอมระเหย (Mann, Cox et al. 2000) นอกจากนี้ยังมีกลไกการขับสารออกนอกเซลล์หรือ efflux pump หลาย



รูปที่ 5-1 แสดงลักษณะโครงสร้างชั้นนอกของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (ซ้าย) และเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (ขวา) (Nazzaro, Fratianni et al. 2013)

ชนิดด้วยกัน (Hancock 1998) อย่างไรก็ตามในการศึกษาของ (Hammer, Carson et al. 1999) พบว่าน้ำมันตะไคร้แกงที่ความเข้มข้น 1.0% โดยปริมาตร สามารถต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ ค่า MIC ที่แตกต่างกันนี้อาจมีสาเหตุจากน้ำมันตะไคร้แกงที่ใช้มาสกัดมาจากแหล่งที่ต่างกัน ทำให้ปริมาณหรือองค์ประกอบในน้ำมันตะไคร้แกงไม่เท่ากันด้วย ซึ่งส่งผลต่อความเข้มข้นที่ใช้ในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ

จากค่า MIC และ MBC ที่ไม่แตกต่างกันของแต่ละเชื้อ แสดงว่าน้ำมันตะไคร้แกงมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแบบ bactericidal (Pankey and Sabath 2004) โดยทั่วไปแล้วน้ำมันหอมระเหยมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียหลายกลไกด้วยกัน อาทิเช่น ทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียเสื่อมสภาพ, ทำลายชั้นเยื้อหุ้มเซลล์, ทำให้ไซโตพลาซึมจับตัวเป็นก้อน, ทำลายโปรตีนในชั้นเยื่อหุ้ม, เพิ่มการผ่านเข้าออกของสารจนทำให้มีการรั่วไหลของไอออนต่างๆ และยับยั้งการสร้าง adenosine triphosphate (ATP) (Burt 2004) โดยที่ในแต่ละกลไกสามารถเป็นผลให้เกิดความเสียหายในเซลล์แบคทีเรียต่อเนื่องกันไป และทำให้เกิดการตายของแบคทีเรียได้ในที่สุด ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพขึ้นอยู่กับคุณสมบัติขององค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด ได้แก่ สภาพการละลายได้ในไขมันของสาร (lipid solubility) และสถานะของประจุบริเวณผิวเซลล์ (net surface charge) (Trombetta, Castelli et al. 2005)

องค์ประกอบของน้ำมันตะไคร้แกงที่พบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ citral, citronellal, citronellol, geraniol และ linalool (Onawunmi, Yisak et al. 1984) ซึ่งจัดเป็นสารประกอบในกลุ่ม terpenoids ที่มีหมู่ฟังก์ชันของไฮดรอกซิลเป็นองค์ประกอบสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยเชื่อว่าทำให้เกิดการดึงอิเล็คตรอนจากเซลล์แบคทีเรียและรบกวนกระบวนการขนส่ง

อิเล็คตรอน (Dorman and Deans 2000) และการศึกษาในอดีตแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้องค์ประกอบที่มีอยู่ร่วมกันจะมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารตัวเดียว เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar diffusion พบว่าบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้สารตัวใดตัวหนึ่งเพียงอย่างเดียว (Onawunmi, Yisak et al. 1984) แสดงว่าในน้ำมันหอมระเหยมีสารที่ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียอย่างน้อย 1 ชนิดและเป็นการออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์กัน

จากการศึกษาถึงประสิทธิภาพต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียสูง เช่น น้ำมันจากอบเชย ออริกาโน และไธม์ ซึ่งประกอบไปด้วยสารเคมีหลักคือ cinnamaldehyde, carvacrol และ thymol ตามลำดับ สารเหล่านี้พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดี โดยพบค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยอบเชย ออริกาโน และไธม์ ต่อเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 0.015, 0.015 และ 0.25% โดยปริมาตร ตามลำดับ และพบค่า MIC ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* เท่ากับ 0.125, 2.0 และ 2.0% โดยปริมาตรตามลำดับ (Rusenova and Parvanov 2009) ในขณะที่การทดลองของ (Hammer, Carson et al. 1999) พบค่า MIC ของน้ำมันออริกาโนต่อเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* เท่ากับ 0.12 และ 2.0% โดยปริมาตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่า MIC ของน้ำมันตะไคร้แกงจากการทดลองนี้เท่ากับ 0.25% กับค่า MIC ของน้ำมันอบเชย และออริกาโนที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่แรงกว่าน้ำมันตะไคร้แกง โดยเฉพาะน้ำมันหอมระเหยอบเชย และออริกาโน

Lactobacillus เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ถือว่ามีความปลอดภัย เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์ อย่างไรก็ตามเมื่อมีการใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อกำจัดเชื้อที่ไม่พึงประสงค์ภายในทางเดินอาหาร ยาต้านจุลชีพดังกล่าวอาจมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ด้วย ด้วยเหตุนี้การใช้สารต้านจุลชีพในไก่จึงควรเลือกใช้สารชนิดอื่นที่สามารถออกฤทธิ์ต่อเชื้อก่อโรคได้โดยที่ไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย อันได้แก่ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของน้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้อดังกล่าวด้วย ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นว่าน้ำมันตะไคร้แกงมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Lactobacillus* ทั้งสายพันธุ์ควบคุม และสายพันธุ์ทั่วไป ผลที่เกิดขึ้นนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ (Singh, Singh et al. 2011) ที่พบจากการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion โดยพบว่าเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ไวต่อน้ำมันตะไคร้แกง และสอดคล้องกับการศึกษาของ (Baratta, Dorman et al. 1998) ซึ่งพบว่าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ไวต่อน้ำมันตะไคร้แกงจากการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion เมื่อเปรียบเทียบค่า MIC ของน้ำมันตะไคร้แกงระหว่างเชื้อ *Lactobacillus* กับ *E. coli* พบว่ามีค่าความเข้มข้นที่ไม่แตกต่างกันสำหรับเชื้อสายพันธุ์ควบคุม ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อให้น้ำมันตะไคร้แกงเพื่อหวังผลต้านเชื้อ *E. coli* อาจส่งผลกระทบต่อเชื้อ *Lactobacillus* ด้วย จึงทำการทดลองให้น้ำมันตะไคร้แกงผสมอาหารในไก่เนื้อ โดยดูผลของน้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการทดลองที่ 2 ด้วย

เมื่อเปรียบเทียบค่า MIC ที่ได้ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* และ *E. coli* สายพันธุ์ควบคุมกับแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระไก่ พบว่าค่า MIC ของเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างอุจจาระไก่สูงกว่าแบคทีเรียควบคุมและสูงกว่า *E. coli* จากทางเดินหายใจไก่ป่วยเป็น 2 เท่า การที่พบค่า MIC ที่สูงขึ้นนี้อาจมีสาเหตุมาจาก แบคทีเรียจากไก่อาจเคยได้รับสารที่มีส่วนประกอบคล้ายกันกับน้ำมันตะไคร้แกง เช่น citral หรือสารประกอบกลุ่มอื่นที่พบได้ในน้ำมันหอมระเหยนอกเหนือจากน้ำมันตะไคร้แกง มีรายงานพบการดื้อต่อน้ำมันหอมระเหยนี้จากการศึกษาของ (Becerril, Nerin et al. 2012) โดยหลังจากให้น้ำมันออริกาโนในระดับความเข้มข้นต่ำกับเชื้อแบคทีเรีย พบว่าค่า MIC และ MBC ของน้ำมันออริกาโนสูงขึ้นเมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ได้รับน้ำมันออริกาโนมาก่อน จึงมีโอกาสที่พบค่า MIC และ MBC ของเชื้อ *E. coli* และ *Lactobacillus* spp. ที่ได้จากงานวิจัยนี้สูงขึ้นสำหรับเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคเมื่อเทียบกับเชื้อ *E. coli* ที่ไม่ก่อโรค จากการยืนยันชนิดของเชื้อ *E. coli* ด้วยการเพาะเชื้อบน Congo red agar โดยพบว่ามีค่า MIC ที่ต่ำกว่า เชื้อ *E. coli* มาตรฐานแสดงว่าปัจจัยในการก่อโรคของเชื้อไม่ส่งผลต่อค่า MIC อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ทดสอบเชื้อที่ก่อโรคแค่เพียงตัวอย่างเดียว จึงควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างทดสอบเพื่อยืนยันผลที่แน่นอนมากขึ้น

ผลการใช้น้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้อแบคทีเรียในอุจจาระและลำไส้ของไก่

สภาพภายในลำไส้ของลูกไก่หลังฟักออกมามีสภาพปลอดเชื้อ หรือสามารถพบจำนวนเชื้อในระดับที่น้อยมาก เนื่องมาจากลูกไก่ได้รับเชื้อตั้งแต่อยู่ในไข่หรือได้รับเชื้อทันทีหลังสัมผัสกับสภาพแวดล้อม ผลจากงานวิจัยนี้พบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและ *E. coli* ภายในลำไส้ของไก่ตั้งแต่วันแรก แสดงว่าลูกไก่แต่ละตัวอาจได้รับเชื้อผ่านทางการกินก่อนที่จะนำตัวอย่างจากไก่มาตรวจ ทั้งนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของจำนวนเชื้อที่พบในวันแรกของไก่ทุกกลุ่ม เนื่องจากไก่ทุกตัวยังไม่ได้รับอาหารผสมน้ำมันตะไคร้แกง

จากการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียตลอดการทดลอง 6 สัปดาห์ พบว่ามีจำนวนเพิ่มขึ้นในช่วง 3 สัปดาห์แรก ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานศึกษาของ (Torok, Ophel-Keller et al. 2008) ในช่วงหลังจากลูกไก่ฟักตัว อวัยวะระบบทางเดินอาหารของไก่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยพบว่า villi ของลำไส้เล็กส่วนกลางมีการสร้างและขยายตัวอย่างรวดเร็วจนถึงอายุ 10 วันหลังการฟักตัวที่พบว่า villi เริ่มมีอัตราการเจริญคงที่ จึงทำให้พื้นที่ผิวภายในผนังลำไส้เพิ่มขึ้นและทำให้มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียยึดเกาะอาศัยเพิ่มขึ้นด้วย (Ravindran 2003)

เมื่อพิจารณาจำนวนเชื้อแบคทีเรียในอุจจาระของแต่ละกลุ่มตลอดระยะ 42 วัน พบว่าผลที่ได้ไม่สม่ำเสมอกัน โดยในวันที่ 21 พบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดจากอุจจาระของไก่ที่ได้รับน้ำมันตะไคร้แกง 0.01% น้อยกว่าในไก่กลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลที่เกิดขึ้นนี้แสดงว่าน้ำมัน

ตะไคร้แกง 0.01% สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้ดี จึงส่งผลให้พบจำนวนเชื้อในอุจจาระไก่น้อยลง แสดงว่าจำนวนเชื้อในทางเดินอาหารย่อมน้อยลงด้วย แต่ผลการทดลองในกลุ่มไก่ที่ได้รับน้ำมันตะไคร้แกงความเข้มข้น 0.02% และ 0.04% ที่พบจำนวนเชื้อแบคทีเรียในอุจจาระลดลงเช่นกัน แต่ไม่มากพอที่ทำให้แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในวันที่ 28 พบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากอุจจาระไก่กลุ่มที่ได้รับน้ำมันตะไคร้แกง 0.02% และ 0.04% น้อยกว่าในไก่กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลที่ได้เป็นไปตามสมมติฐาน ในกลุ่มไก่ที่ได้รับน้ำมันตะไคร้แกง 0.01% กลับพบจำนวนเชื้อแบคทีเรียสูงขึ้นจากวันที่ 21 จึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีการปรับตัวและทนต่อน้ำมันตะไคร้แกงได้มากขึ้น ทำให้แบคทีเรียอยู่รอดและเพิ่มจำนวนกลับมาเทียบเท่ากับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามอัตราส่วนจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อจำนวนเชื้อ *E. coli* ในอุจจาระไก่มีแนวโน้มที่สูงขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกง

สำหรับผลของน้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกภายในลำไส้ไก่ทั้งสามส่วน ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองทั้ง 4 กลุ่ม แสดงว่าน้ำมันตะไคร้แกงไม่มีผลต่อเชื้อกลุ่มดังกล่าว ผลที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Cross, McDevitt et al. 2007) เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำมันหอมระเหยหลายชนิดที่ใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ ได้แก่ ออริกาโน ไธม์ โรสแมรี่ (rosemary) มาร์จอรัม (majorum) และยาโรว์ (yarrow) ในขนาดสูงกว่าน้ำมันตะไคร้แกงที่ใช้ในปัจจุบัน ยังไม่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอุจจาระและลำไส้ตัน โดยที่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การที่ไม่พบความแตกต่างของจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกระหว่างกลุ่มนี้ จึงอาจสรุปได้ว่าน้ำมันตะไคร้แกงระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ไม่มีผลกระทบต่อเชื้อดังกล่าวสำหรับการทดสอบในตัวไก่ อย่างไรก็ตามผลที่เกิดขึ้นนี้ไม่สอดคล้องกับผลการทดลองที่ทดสอบเชื้อ *Lactobacillus* นอกร่างกาย ซึ่งพบว่าเชื้อไวต่อน้ำมันตะไคร้แกง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อภายในลำไส้ เช่น อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน สภาพความเป็นกรดด่าง ทำให้เชื้อแบคทีเรียทนต่อสภาพภายในทางเดินอาหารไก่ได้ (Adamberg, Kask et al. 2003) นอกจากนี้ยังพบว่าสภาพความเป็นกรดด่างเป็นปัจจัยสำคัญต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ด้วย โดยพบว่า geraniol ที่สามารถพบได้ในน้ำมันตะไคร้แกง นั้นมีประสิทธิภาพต้านเชื้อจุลชีพได้น้อยลงเมื่อเปลี่ยน pH จาก 7 เป็น 2 (Si, Gong et al. 2006) โดยที่ภายในระบบทางเดินอาหารมีสภาวะความเป็นกรดสูง จึงอาจมีผลทำให้น้ำมันตะไคร้แกงมีประสิทธิภาพลดลงได้ การที่ไม่พบความแตกต่างของจำนวนเชื้อกรดแลคติกในลำไส้จึงสามารถใช้น้ำมันตะไคร้แกงได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อเชื้อดังกล่าวแม้ว่าจะใช้ในระดับความเข้มข้น

สูงสุด 0.04% แต่การที่เชื้อไวต่อน้ำมันตะไคร้ในการทดสอบแบบนอกร่างกายนี้อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ เช่น อุณหภูมิ โดยทั่วไปพบว่าอุณหภูมิปกติในร่างกายไก่เฉลี่ยเท่ากับ 41.8°C (Olivo, Bolzani et al. 1980) แต่ในการทดลองได้ทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C ซึ่งอาจส่งผลให้เชื้ออ่อนแอและไวต่อน้ำมันตะไคร้แกงได้มากขึ้น อีกทั้งในงานศึกษาในหลอดทดลองของ (Ben Arfa, Combes et al. 2006) ที่ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ชนิดเหลวผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Iso-sensitest ในการทดสอบความไวต่อน้ำมันหอมระเหย carvacrol ซึ่งจัดเป็นน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียสูง และพบว่าเชื้อ *L. plantarum* สามารถทนต่อน้ำมัน carvacrol ได้ เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่พบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมีการเจริญเติบโตได้ไม่ดี เนื่องมาจากการขาดสารอาหารที่จำเป็นในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Klare, Konstabel et al. 2005) ส่งผลให้เชื้อมีความไวต่อน้ำมันตะไคร้แกงได้มากขึ้นเช่นกัน อีกทั้งเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในทางเดินอาหารไก่ได้รับสารอาหารอยู่ตลอดเวลาทำให้เชื้อมีการเจริญได้ดียิ่งขึ้นและมีผลให้เชื้อมีความทนทานสูง

สำหรับผลของน้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้อ *E. coli* ภายในลำไส้ พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับน้ำมันตะไคร้แกง 0.02% และ 0.04% มีจำนวนเชื้อ *E. coli* ในลำไส้ตันน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับที่ลำไส้เล็กส่วนกลางพบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับน้ำมันตะไคร้แกง 0.04% มีจำนวนเชื้อ *E. coli* น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งให้ผลเป็นไปตามสมมติฐาน และแสดงให้เห็นว่าที่ระดับความเข้มข้นนี้เพียงพอในการต้านเชื้อ *E. coli* ได้โดยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ เช่นเดียวกับการใช้น้ำมันออริกาโนในไก่ (Roofchaee, Irani et al. 2011) ที่น้ำมันออริกาโนไม่มีผลเสียต่อเชื้อจุลชีพที่ดี การที่ไม่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก แต่สามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli* ในลำไส้ตันได้นั้นอาจเกิดจากกลไกอื่นๆ ที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทนต่อน้ำมันหอมระเหยรวมทั้งน้ำมันตะไคร้แกงได้มากกว่าเชื้อ *E. coli* โดยมีรายงานว่าเมื่อใช้น้ำมันออริกาโนที่สกัดเอาส่วนที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียออกไปทดสอบผลต่อเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* และ *Pediococcus cerevisiae* พบว่าส่วนประกอบที่เหลือของน้ำมันมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างกรดจากแบคทีเรียมากขึ้น (Zaika and Kissinger 1981) แสดงว่าในน้ำมันหอมระเหยอาจมีส่วนประกอบที่นอกจากจะต้านเชื้อแบคทีเรียแล้วยังมีส่วนประกอบที่เป็นตัวเร่งการสร้างกรดจากแบคทีเรียได้หากได้รับน้ำมันหอมระเหยในปริมาณที่ต่ำกว่าการใช้ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย กรดที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียอาจมีผลลดประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยได้ (Si, Gong et al. 2006) จนอาจมีผลทำให้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทนต่อน้ำมันหอมระเหยได้มากกว่าเชื้อ *E. coli*

อัตราส่วนระหว่างจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อจำนวนเชื้อ *E. coli* ในลำไส้ที่พบว่ามีแนวโน้มสูงขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกง มีความเป็นไปได้ว่าเกิดจากการที่มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมากขึ้นหรือมีจำนวนของเชื้อ *E. coli* ลดน้อยลง ทั้งนี้อัตราส่วนจำนวนเชื้อที่

เปลี่ยนแปลงไปไม่มากเป็นผลที่ดี เนื่องจากทำให้สมดุลของเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารอยู่ในระดับที่เหมาะสม หากมีการใช้ยาหรือสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในระดับความเข้มข้นที่มากเกินไป อาจส่งผลให้เกิดสภาวะความไม่สมดุลของเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารได้ การเกิดสภาวะความไม่สมดุลของปริมาณเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารไก่ (dysbacteriosis) มักมีสาเหตุมาจากอาหาร สภาพแวดล้อมการเลี้ยงไม่ถูกสุขลักษณะที่เป็นผลทำให้เกิดการสะสมของเชื้อแบคทีเรียมากขึ้น รวมทั้งการหยุดใช้ยาต้านจุลชีพที่ใช้เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของไก่ (Bailey 2010) ความไม่สมดุลของจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นนี้ทำให้เกิดผลเสียหลายประการ ได้แก่ การแย่งใช้สารอาหารจากโฮสต์ และการเปลี่ยนรูปน้ำดีให้เป็น unconjugated bile acid ทำให้เกิดการย่อยและดูดซึมไขมันลดลง จนได้รับสารอาหารไม่เพียงพอ ส่งผลให้ลดอัตราการเจริญเติบโตด้วย (Dukowicz, Lacy et al. 2007) และยังพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroides* ที่พบได้ในลำไส้ไก่ที่มีจำนวนมากเกินไปจะส่งผลทำให้ปลายเยื่อบุลำไส้เสียหายจนมีผลให้ลดการดูดซึมของสารอาหาร (Riepe, Goldstein et al. 1980) นอกจากนี้มีรายงานว่า ในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง จำนวนเชื้อ *Lactobacillus* ที่มากเกินอาจส่งผลทำให้เกิดการอักเสบภายในลำไส้ และเกิดการแพร่เข้าไปในกระแสเลือดได้ (Muszynski, Mirska et al. 2007)

อย่างไรก็ตามการที่จำนวนเชื้อจุลชีพบางชนิดมีอยู่น้อยเกินไป สามารถส่งผลเสียต่อโฮสต์ได้เช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ โดยผ่านกลไกตัวรับชนิดแท่ง (toll-like receptor) ซึ่งอาศัยลักษณะรูปแบบของโมเลกุลของเชื้อแบคทีเรียในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างไซโตคายน์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องและช่วยเพิ่มระดับ IgA ภายในลำไส้อีกด้วย (Brisbin, Gong et al. 2008) ปัจจุบันมีการนำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวในรูปแบบโปรไบโอติกมาใช้รักษากลุ่มอาการลำไส้อักเสบ (inflammatory bowel disease) (Hart, Stagg et al. 2003) เนื่องจากมีการค้นพบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวภายในลำไส้ที่น้อยเกินไป ทำให้เพิ่มโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อจุลชีพก่อโรคและก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบได้ง่ายขึ้น การศึกษาไม่นานมานี้แสดงให้เห็นว่าการขาดเชื้อดังกล่าวอาจส่งผลให้ปริมาณกรดไขมันสายสั้นจากการหมักโดยเชื้อแบคทีเรียลดน้อยลง จนมีผลต่อระบบการทำงานในทางเดินอาหาร เช่น การบีบตัวของลำไส้ และการผลัดเปลี่ยนเซลล์ที่ผนังลำไส้ที่ลดน้อยลง (Wong, de Souza et al. 2006) อย่างไรก็ตามมีรายงานก่อนหน้านี้ได้พบว่า เชื้อ *E. coli* ชนิดไม่ก่อโรคที่น้อยเกินไปอาจส่งผลเสียได้เช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลเสียจากการป้องกันการเกาะจับของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium, *Clostridium perfringens* (Van Immerseel, De Buck et al. 2004) (Chambers and Gong 2011) รวมทั้งการสังเคราะห์วิตามินเคของแบคทีเรีย (Bentley and Meganathan 1982) จากที่กล่าวมาจะเห็นว่าปริมาณและสัดส่วนของเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารไก่มีความสำคัญอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ จึงควรมีระบบการจัดการเลี้ยงที่ดี และใช้วัตถุเติมในอาหารด้วยปริมาณที่

เหมาะสม เพื่อให้ไก่มีสุขภาพโดยรวมดีและให้ผลผลิตเป็นที่น่าพึงพอใจด้วย

เมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้จากอุจจาระวันที่ 42 และจากลำไส้ของไก่ พบว่าผลไม่สอดคล้องกัน โดยจำนวนเชื้อ *E. coli* ในอุจจาระที่ไม่ลดต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของทุกกลุ่ม ในขณะที่จำนวนเชื้อดังกล่าวในลำไส้กลับพบว่ามีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลอง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากน้ำมันตะไคร้แกงมีฤทธิ์ในการลดการบีบตัวของลำไส้ ทำให้อัตราการขับอุจจาระน้อยลงรวมทั้งปริมาณเชื้อที่ขับออกมาก็เปลี่ยนแปลงตามด้วย (Tangpu and Yadav 2006) ดังนั้นการนับเชื้อแบคทีเรียจากอุจจาระอาจให้ผลที่ไม่แน่นอนเท่ากับการนับเชื้อแบคทีเรียจากลำไส้

เมื่อศึกษาผลของการใช้น้ำมันตะไคร้แกงต่อพารามิเตอร์อื่นๆ ในการทดลองของ (Vasuntrarak 2013) ที่ใช้ไก่ชุดเดียวกันกับงานวิจัยนี้ พบว่าน้ำมันตะไคร้แกงสามารถเร่งการเจริญเติบโต ลดอัตราแลกเนื้อ เพิ่มภูมิต้านทาน เพิ่มสมรรถนะการทำงานของเอนไซม์ α-amylase และลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมันในซีรั่มของไก่ได้ โดยให้ผลเด่นชัดเมื่อให้น้ำมันตะไคร้แกงระดับความเข้มข้น 0.02% เช่นเดียวกับในการศึกษานี้ซึ่งให้ผลในการลดจำนวนเชื้อ *E. coli* ได้ในระดับความเข้มข้นดังกล่าว ดังนั้นในการเลือกใช้น้ำมันตะไคร้แกงเสริมในอาหารไก่อาจพิจารณาให้ที่ระดับความเข้มข้น 0.02% เพื่อให้ได้ผลที่ต้องการ และลดความสิ้นเปลืองในการใช้น้ำมันตะไคร้แกงมากเกินความจำเป็นด้วย

จากผลการทดลองทั้งหมดจะเห็นว่าปริมาณเชื้อที่นับได้จากตัวอย่างมีความไม่สม่ำเสมออยู่มาก โดยเฉพาะจำนวนเชื้อในอุจจาระ เนื่องจากไก่แต่ละตัวในกลุ่มการทดลองเดียวกันได้รับปริมาณน้ำมันตะไคร้แกงที่ไม่เท่ากันทุกตัว อีกทั้งสารประกอบหลักในน้ำมันตะไคร้แกงสามารถถูกออกซิไดซ์กับอากาศได้ (Guimaraez, Cardosa et al. 2008) ทำให้ไก่ได้รับปริมาณที่น้อยกว่ากำหนด ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลที่แน่นอนมากขึ้นอาจต้องปรับเปลี่ยนวิธีการให้น้ำมันตะไคร้แกง เช่น การทดลองแยกเลี้ยงไก่ หรือเปลี่ยนรูปแบบของน้ำมันตะไคร้แกง โดยใช้การเคลือบเป็น microencapsulation เพื่อให้มีความคงตัวมากขึ้นเพื่อลดโอกาสในการระเหยและการเกิดออกซิไดซ์ของน้ำมันตะไคร้แกงได้

Chulalongkorn University

สรุปผลการวิจัย

น้ำมันตะไคร้แกงมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ทั้งการทดลองนอกร่างกายและในร่างกาย โดยการทดลองในร่างกายของไก่ สามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli* ได้ที่ส่วนของลำไส้เล็กส่วนกลาง ลำไส้เล็กส่วนท้ายและลำไส้ตัน ถึงแม้ว่าน้ำมันตะไคร้แกงมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการทดลองนอกร่างกาย แต่การทดลองใช้เป็นวัตถุเติมในอาหารไก่กลับพบว่าน้ำมันตะไคร้แกงไม่ส่งผลกระทบต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในทางเดินอาหารไก่

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ชนิดก่อโรคในการศึกษาหาค่า MIC เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องและมีความแม่นยำมากขึ้น

2. ในการให้อาหารผสมน้ำมันตะไคร้แกง ควรแบ่งให้กินแยกเลี้ยงแต่ละตัวในการทดลอง เนื่องจากการที่ไก่แต่ละตัวกินไม่เท่ากันส่งผลให้ไก่ได้รับน้ำมันตะไคร้แกงไม่เท่ากัน และผลการทดลองเกิดความไม่สม่ำเสมอได้ หรือทำการเพิ่มจำนวนตัวอย่างแต่ละกลุ่มเพื่อให้ผลการทดลองมีความแน่นอนมากขึ้น

3. ควรศึกษาการใช้น้ำมันหอมระเหยชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากการใช้น้ำมันตะไคร้แกงในไก่ เพื่อเป็นข้อมูลในการนำมาใช้ในการผสมอาหารเลี้ยงไก่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

Adamberg, K., S. Kask, T. M. Laht and T. Paalme (2003). "The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study." Int J Food Microbiol **85**(1-2): 171-183.

Aiemsaard, J., S. Aiumlamai, C. Aromdee, S. Taweechaisupapong and W. Khunkitti (2011). "The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745." Res Vet Sci **91**(3): e31-37.

Al-Kassie, G. A. M. (2009). "Influence of two plants extracts derived from thyme and cinnamon on broiler performance." Pak Vet J **29**(4): 169-173.

Apajalahti, J., A. Kettunen and H. Graham (2004). "Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken." Worlds Poultry Science Journal **60**(2): 223-232.

Bachiega, T. F. and J. M. Sforcin (2011). "Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages." J Ethnopharmacol **137**(1): 909-913.

Bailey, R. A. (2010). Intestinal microbiota and the pathogenesis of dysbacteriosis in broiler chickens. Doctor of Philosophy, East Anglia.

Baratta, M. T., H. J. D. Dorman, S. G. Deans, A. C. Figueiredo, J. G. Barroso and G. Ruberto (1998). "Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils." Flavour and Fragrance Journal **13**(4): 235-244.

Becerril, R., C. Nerin and R. Gomez-Lus (2012). "Evaluation of Bacterial Resistance to Essential Oils and Antibiotics After Exposure to Oregano and Cinnamon Essential Oils." Foodborne Pathogens and Disease **9**(8): 699-705.

Ben Arfa, A., S. Combes, L. Preziosi-Belloy, N. Gontard and P. Chalier (2006). "Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure." Lett Appl Microbiol **43**(2): 149-154.

Bentley, R. and R. Meganathan (1982). "Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria." Microbiol Rev **46**(3): 241-280.

Berkhoff, H. A. and A. C. Vinal (1986). "Congo red medium to distinguish between invasive and non-invasive *Escherichia coli* pathogenic for poultry." Avian Dis **30**(1): 117-121.

Blanco, M. M., C. A. Costa, A. O. Freire, J. G. Santos, Jr. and M. Costa (2009). "Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice." Phytomedicine **16**(2-3): 265-270.

Brisbin, J. T., J. Gong and S. Sharif (2008). "Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken." Anim Health Res Rev **9**(1): 101-110.

Burt, S. (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review." Int J Food Microbiol **94**(3): 223-253.

Carlini, E. A., J. d. D. P. Contar, A. R. Silva-Filho, N. G. da Silveira-Filho, M. L. Frochtengarten and O. F. Bueno (1986). "Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals." J Ethnopharmacol **17**(1): 37-64.

Castanon, J. I. R. (2007). "History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds." Poultry Science **86**(11): 2466-2471.

Chambers, J. R. and J. S. Gong (2011). "The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens." Food Research International **44**(10): 3149-3159.

Cheel, J., C. Theoduloz, J. Rodriguez and G. Schmeda-Hirschmann (2005). "Free radical scavengers and antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(7): 2511-2517.

Ciftci, M., U. G. Simsek, A. Yuce, O. Yilmaz and B. Dalkilic (2010). "Effects of Dietary Antibiotic and Cinnamon Oil Supplementation on Antioxidant Enzyme Activities, Cholesterol Levels and Fatty Acid Compositions of Serum and Meat in Broiler Chickens." Acta Veterinaria Brno **79**(1): 33-40.

Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Havarstein, P. E. Hernandez and I. F. Nes (1997). "Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum." Appl Environ Microbiol **63**(11): 4321-4330.

CLSI (2008). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard-Third Edition: M31-A3. Pennsylvania, Wayne. **28:** 102.

Costa, C. A. R. A., L. T. Bidinotto, R. K. Takahira, D. M. F. Salvadori, L. F. Barbisan and M. Costa (2011). "Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil." Food and Chemical Toxicology **49**(9): 2268-2272.

Cowan, S. T. and K. J. Steel (1993). Bacterial characters and characterization. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. G. I. a. F. Barrow, R.K.A. Great Britain, Cambridge University Press**:** 21-45.

Cross, D. E., R. M. McDevitt, K. Hillman and T. Acamovic (2007). "The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age." Br Poult Sci **48**(4): 496-506.

De Man, J. C., M. Rogosa and M. E. Sharpe (1960). "A medium for the cultivation of *Lactobacilli*." J Appl Bact. **23**(1): 130-135.

Devi, R. C., S. M. Sim and R. Ismail (2011). "Spasmolytic effect of citral and extracts of *Cymbopogon citratus* on isolated rabbit ileum." J Smooth Muscle Res **47**(5): 143-156.

Devi, R. C., S. M. Sim and R. Ismail (2012). "Effect of Cymbopogon citratus and Citral on Vascular Smooth Muscle of the Isolated Thoracic Rat Aorta." Evid Based Complement Alternat Med **2012**: 539475.

Dilberto, J. J., P. Srinivas, D. Overstreet, G. Usha, L. T. Burka and L. S. Birnbaum (1990). "Metabolism of citral, an alpha,beta-unsaturated aldehyde, in male F344 rats." Drug Metab Dispos **18**(6): 866-875.

Dorman, H. J. D. and S. G. Deans (2000). "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils." Journal of Applied Microbiology **88**(2): 308-316.

Dukowicz, A. C., B. E. Lacy and G. M. Levine (2007). "Small intestinal bacterial overgrowth: a comprehensive review." Gastroenterol Hepatol (N Y) **3**(2): 112-122.

Ewenighi, C. O., U. Dimkpa, Adejumo, B.I., J. C. Onyeanusi, L. U. M. Onoh, U. Ezeugwu, G. O. Onoh, S. C C Uzor, E. Orji and A. Anojulu (2013). "Estimation of lipid profile and glucose level in alloxan-induced diabetic rats treated with *Cymbopogon citratus* (lemongrass)." J Exp Integr Med **3**(3): 249-253.

Ewers, C., E. M. Antao, I. Diehl, H. C. Philipp and L. H. Wieler (2009). "Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential." Appl Environ Microbiol **75**(1): 184-192.

Ewers, C., T. Janssen, S. Kiessling, H. C. Philipp and L. H. Wieler (2004). "Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry." Vet Microbiol **104**(1-2): 91-101.

Figueirinha, A., M. T. Cruz, V. Francisco, M. C. Lopes and M. T. Batista (2010). "Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaf infusion in lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells: contribution of the polyphenols." J Med Food **13**(3): 681-690.

Flournoy, D. J., S. Wongpradit and S. L. Silberg (1990). "Facilitating Identification of Lactose-Fermenting Enterobacteriaceae on MacConkey Agar." Proc Okla Acad Sci **70**: 5-8.

Freter, R. (1992). Factors affecting the microecology of the gut. Probiotics, the scientific basis. R. Fuller. New York, NY, Chapman and Hall**:** 111-144.

Friedman, M., P. R. Henika and R. E. Mandrell (2002). "Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*." Journal of Food Protection **65**(10): 1545-1560.

Fuller, R. (1984). "Microbial activity in the alimentary tract of birds." Proc Nutr Soc **43**(1): 55-61.

Fuller, R. and B. E. Brooker (1974). "*Lactobacilli* which attach to the crop epithelium of the fowl." Am J Clin Nutr **27**(11): 1305-1312.

Gareau, M. G., P. M. Sherman and W. A. Walker (2010). "Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **7**(9): 503-514.

Gaze, W., C. O'Neill, E. Wellington and P. Hawkey (2008). "Antibiotic resistance in the environment, with particular reference to MRSA." Adv Appl Microbiol **63**: 249-280.

Gordon, D. M. (2013). The ecology of *Escherichia coli*. Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis. M. Donnenberg. Massachusetts, Academic Press**:** 3-20.

Guimaraez, L. G. D. L., M. D. G. Cardosa, L. M. Zacaroni and R. K. D. Lima (2008). "Influence of light and temperature on the oxidation of the essential oil of lemongrass (*Cymbopogon Citratus* (D.C.) Stapf)." Quim Nova **31**(6): 1476-1480.

Hammer, K. A., C. F. Carson and T. V. Riley (1996). "Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)." American Journal of Infection Control **24**(3): 186-189.

Hammer, K. A., C. F. Carson and T. V. Riley (1999). "Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts." Journal of Applied Microbiology **86**(6): 985-990.

Hancock, R. E. (1998). "Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria." Clin Infect Dis **27 Suppl 1**: S93-99.

Handique, A. K., R. K. Gupta and D. N. Borddoi (1984). "Variation of oil content in lemongrass as influenced by seasonal changes and its genetic aspects." Indian Perfumer **28**(1): 54-63.

Hart, A. L., A. J. Stagg and M. A. Kamm (2003). "Use of Probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease." Journal of Clinical Gastroenterology **36**(2): 111-119.

Heravi, R. M., H. Kermanshahi, M. Sankian, M. R. Nassiri, A. H. Moussavi, L. R. Nasiraii and A. R. Varasteh (2011). "Screening of *lactobacilli* bacteria isolated from gastrointestinal tract of broiler chickens for their use as probiotic." African Journal of Microbiology Research **5**(14): 1858-1868.

Hijova, E. and A. Chmelarova (2007). "Short chain fatty acids and colonic health." Bratisl Lek Listy **108**(8): 354-358.

ISO-6887-1 (1999). "Microbiology of Food Animal Feeding stuffs-Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilution for microbiological examination: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilution."

ISO-15214 (1998). "Microbiology of Food Animal Feeding stuffs-Horizontal Method for the enumeration of Mesophilic Lactic acid Bacteria Colony-Count Technique at 30°C : Microbiology."

Jayasinha, K. (1999). Lemongrass (*Cymbopogon citratus*). Medicinal and Aromatic Plants. D. Warnasuriya and H. Dissanayake. Colombo, Information Services Centre, Industrial Technology Institute**:** 1-45.

Kabir, S. M. L. (2010). "Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns." International Journal of Environmental Research and Public Health **7**(1): 89-114.

Kaper, J. B., J. P. Nataro and H. L. T. Mobley (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*." Nature Reviews Microbiology **2**(2): 123-140.

Katsukawa, M., R. Nakata, Y. Takizawa, K. Hori, S. Takahashi and H. Inoue (2010). "Citral, a component of lemongrass oil, activates PPARalpha and gamma and suppresses COX-2 expression." Biochim Biophys Acta **1801**(11): 1214-1220.

Kiratisin, P., S. Chattammanat, S. Sa-Nguansai, B. Dansubutra, P. Nangpatharapornthawee, P. Patthamalai, N. Tirachaimongkol and T. Nunthanasup (2008). "A 2-year trend of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Thailand: an alert for infection control." Trans R Soc Trop Med Hyg **102**(5): 460-464.

Klare, I., C. Konstabel, S. Muller-Bertling, R. Reissbrodt, G. Huys, M. Vancanneyt, J. Swings, H. Goossens and W. Witte (2005). "Evaluation of new broth media for

microdilution antibiotic susceptibility testing of Lactobacilli, Pediococci, Lactococci, and Bifidobacteria." Appl Environ Microbiol **71**(12): 8982-8986.

Lan, Y., M. W. A. Verstegen, S. Tamminga and B. A. Williams (2005). "The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens." Worlds Poultry Science Journal **61**(1): 95-104.

Lee, K. W., H. Everts and A. C. Beynen (2004). "Essential Oils in Broiler Nutrition." Int J Poult Sci **3**(12): 738-752.

Leininger, D. J., J. R. Roberson and F. Elvinger (2001). "Use of eosin methylene blue agar to differentiate *Escherichia coli* from other gram-negative mastitis pathogens." Journal of Veterinary Diagnostic Investigation **13**(3): 273-275.

Lu, J., U. Idris, B. Harmon, C. Hofacre, J. J. Maurer and M. D. Lee (2003). "Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken." Appl Environ Microbiol **69**(11): 6816-6824.

Malayoglu, H. B., S. Baysal, Z. Misirlioglu, M. Polat, H. Yilmaz and N. Turan (2010). "Effects of oregano essential oil with or without feed enzymes on growth performance, digestive enzyme, nutrient digestibility, lipid metabolism and immune response of broilers fed on wheat-soybean meal diets." British Poultry Science **51**(1): 67-80.

Mann, C. M., S. D. Cox and J. L. Markham (2000). "The outer membrane of Pseudomonas aeruginosa NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil)." Letters in Applied Microbiology **30**(4): 294-297.

Mbata, T. I. (2005). "Poultry meat pathogens and its control." Internet J Food Safety **5**(7): 20-28.

Messaoudi, S., G. Kergourlay, A. Rossero, M. Ferchichi, H. Prevost, D. Drider, M. Manai and X. Dousset (2011). "Identification of *lactobacilli* residing in chicken ceca with antagonism against *Campylobacter*." Int Microbiol **14**(2): 103-110.

Mmereole, F. U. C. (2010). "Effects of Lemon Grass (*Cymbopogon citratus*) Leaf Meal Feed Supplement on Growth Performance of Broiler Chicks." Int J Poult Sci **9**(12): 1107-1111.

Muszynski, Z., I. Mirska and K. Matuska (2007). "[Lactobacillus speciesas opportunistic pathogens in children]." Przegl Epidemiol **61**(1): 79-84.

Naik, M. I., B. A. Fomda, E. Jaykumar and J. A. Bhat (2010). "Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias." Asian Pacific Journal of Tropical Medicine **3**(7): 535-538.

Nazef, L., Y. Belguesmia, A. Tani, H. Prevost and D. Drider (2008). "Identification of lactic acid bacteria from poultry feces: evidence on anti-campylobacter and anti-listeria activities." Poult Sci **87**(2): 329-334.

Nazzaro, F., F. Fratianni, L. De Martino, R. Coppola and V. De Feo (2013). "Effect of essential oils on pathogenic bacteria." Pharmaceuticals (Basel) **6**(12): 1451-1474.

Olivo, O. M., R. Bolzani and F. Ruggeri (1980). "Average weight and temperature rhythms of fasting chickens from hatching to death." Boll Soc Ital Biol Sper **56**(9): 932-938.

Onawunmi, G. O. (1988). "In vitro studies on the antibacterial activity of phenoxyethanol in combination with lemon grass oil." Pharmazie **43**(1): 42-44.

Onawunmi, G. O., W. A. Yisak and E. O. Ogunlana (1984). "Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf." J Ethnopharmacol **12**(3): 279-286.

Pankey, G. A. and L. D. Sabath (2004). "Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections." Clin Infect Dis **38**(6): 864-870.

Phillips, J. C., J. Kingsnorth, S. D. Gangolli and I. F. Gaunt (1976). "Studies on the absorption, distribution and excretion of citral in the rat and mouse." Food Cosmet Toxicol **14**(6): 537-540.

Phumkachorn, P. and P. Rattanachaikunsopon (2010). "Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production." Ann Biol Res **1**(4): 218-228.

Puatanachokchai, R. (1994). Antimutagenicity, cytotoxicity and antitumor activity of lemon grass extract (*Cymbopogon citratus* DC Stapf). Master degree, Chiang Mai University.

Ravinder, K., K. Pawan, S. Gaurav, K. Paramjot, S. Gagan and K. Appramdeep (2010). "Pharmacognostical Investigation of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf." Pharm Lett **2**(2): 181-189.

Ravindran, V. (2003). "Development of digestive function in neonatal poultry: Physiological limitations and potential." Proc Aust Poult Sci Sym **15**: 1-7.

Riepe, S. P., J. Goldstein and D. H. Alpers (1980). "Effect of secreted Bacteroides proteases on human intestinal brush border hydrolases." J Clin Invest **66**(2): 314-322.

Roofchaee, A., M. Irani, M. A. Ebrahimzadeh and M. R. Akbari (2011). "Effect of dietary oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil on growth performance, cecal

microflora and serum antioxidant activity of broiler chickens." African Journal of Biotechnology **10**(32): 6177-6183.

Rusenova, N. and P. Parvanov (2009). "Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance." Trakia J Sci **7**(1): 37-43.

Salanitro, J. P., I. G. Blake, P. A. Muirehead, M. Maglio and J. R. Goodman (1978). "Bacteria isolated from the duodenum, ileum, and cecum of young chicks." Appl Environ Microbiol **35**(4): 782-790.

Salanitro, J. P., I. G. Blake and P. A. Muirhead (1974). "Studies on the cecal microflora of commercial broiler chickens." Appl Microbiol **28**(3): 439-447.

Saleem, M., N. Afza, M. A. Anwar, S. M. A. Hai, M. S. Ali, S. Shujaat and Atta-Ur-Rahman (2003). "Chemistry and biological significance of essential oils of *Cymbopogon citratus* from Pakistan." Natural Product Research **17**(3): 159-163.

Sekelja, M., I. Rud, S. H. Knutsen, V. Denstadli, B. Westereng, T. Naes and K. Rudi (2012). "Abrupt temporal fluctuations in the chicken fecal microbiota are explained by its gastrointestinal origin." Appl Environ Microbiol **78**(8): 2941-2948.

Shirkey, T. W., R. H. Siggers, B. G. Goldade, J. K. Marshall, M. D. Drew, B. Laarveld and A. G. Van Kessel (2006). "Effects of commensal bacteria on intestinal morphology and expression of proinflammatory cytokines in the gnotobiotic pig." Exp Biol Med (Maywood) **231**(8): 1333-1345.

Si, W., J. Gong, R. Tsao, T. Zhou, H. Yu, C. Poppe, R. Johnson and Z. Du (2006). "Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria." Journal of Applied Microbiology **100**(2): 296-305.

Silva Cde, B., S. S. Guterres, V. Weisheimer and E. E. Schapoval (2008). "Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp." Braz J Infect Dis **12**(1): 63-66.

Singh, B. R., V. Singh, R. K. Singh and N. Ebibeni (2011). "Antimicrobial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against microbes of environmental, clinical and food origin." Int Res J Pharm Pharmacol **1**(9): 228-236.

Stiles, M. E. and W. H. Holzapfel (1997). "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy." International Journal of Food Microbiology **36**(1): 1-29.

Stugard, C. E., P. A. Daskaleros and S. M. Payne (1989). "A 101-kilodalton heme-binding protein associated with congo red binding and virulence of *Shigella flexneri* and enteroinvasive *Escherichia coli* strains." Infect Immun **57**(11): 3534-3539.

Suaeyun, R., T. Kinouchi, H. Arimochi, U. Vinitketkumnuen and Y. Ohnishi (1997). "Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) on formation of azoxymethane-induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon." Carcinogenesis **18**(5): 949-955.

Takaisi-Kikuni, N. B., D. Kruger, W. Gnann and J. Wecke (1996). "Microcalorimetric and electron microscopic investigation on the effects of essential oil from *Cymbopogon densiflorus* on *Staphylococcus aureus*." Microbios **88**(354): 55-62.

Talarico, T. L. and W. J. Dobrogosz (1989). "Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*." Antimicrob Agents Chemother **33**(5): 674-679.

Tangpu, V. and A. K. Yadav (2006). "Antidiarrhoeal activity of *Cymbopogon citratus* and its main constituent, citral." Pharmacologyonline **2**: 290-298.

Tonu, N. S., M. A. Sufian, S. Sarker, M. M. Kamal, M. H. Rahman and M. M. Hossain (2011). "Pathological study on colibacillosis in chickens and detection of *Escherichia coli* by PCR." Bang J Vet Med **9**(1): 17-25.

Torok, V. A., K. Ophel-Keller, R. J. Hughes, R. Forder, M. Ali and R. Macalpine (2008). "Environment and age: impact on poultry gut microflora." Aust Poult Sci Symp **19**: 149-152.

Trombetta, D., F. Castelli, M. G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti and G. Bisignano (2005). "Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes." Antimicrob Agents Chemother **49**(6): 2474-2478.

Tyagi, A. K. and A. Malik (2012). "Bactericidal action of lemon grass oil vapors and negative air ions." Innovative Food Science & Emerging Technologies **13**(0): 169-177.

Tzortzakis, N. G. and C. D. Economakis (2007). "Antifungal activity of lemongrass (*Cympopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens." Innovative Food Science & Emerging Technologies **8**(2): 253-258.

Umesaki, Y., H. Setoyama, S. Matsumoto and Y. Okada (1993). "Expansion of Alpha-Beta T-Cell Receptor-Bearing Intestinal Intraepithelial Lymphocytes after Microbial Colonization in Germ-Free Mice and Its Independence from Thymus." Immunology **79**(1): 32-37.

Van Immerseel, F., J. De Buck, F. Pasmans, G. Huyghebaert, F. Haesebrouck and R. Ducatelle (2004). "Clostridium perfringens in poultry: an emerging threat for animal and public health." Avian Pathol **33**(6): 537-549.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Vasuntrarak, K. (2013). Effects of dietary supplementation of lemongrass oil on growth performance, digestive enzyme activity and gut health in chickens. Master, Chulalongkorn University.

Wannissorn, B., S. Jarikasem and T. Soontorntanasart (1996). "Antifungal activity of lemon grass oil and lemon grass oil cream." Phytotherapy Research **10**(7): 551-554.

Wong, J. M., R. de Souza, C. W. Kendall, A. Emam and D. J. Jenkins (2006). "Colonic health: fermentation and short chain fatty acids." J Clin Gastroenterol **40**(3): 235-243.

Zaika, L. L. and J. C. Kissinger (1981). "Inhibitory and Stimulatory Effects of Oregano on *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus cerevisiae*." Journal of Food Science **46**(4): 1205-1210.

เดชพิภัทร์ อมรทิพย์วงศ์, ปวีญา มงคลวิสุทธิ์, พวงมณี จิตตวงศ์พันธุ์, อำไพ สุภาจีน and ว. นนทสิทธิ์ (พ.ศ. 2554). "ความชุกของเชื้อ *K. pneumoniae* และ *E. coli* ชนิดสร้างเอนไซม์ extended - spectrum β-lactamase ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลน่าน และโรงพยาบาลชุมชนในจังหวัดน่านระหว่าง ปี พ.ศ. 2547-2553." วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ **44**(3): 169-176.

บงกช นพผล, เสรี แข็งแอ, วสันต์ จันทรสนิท and พ. น้อยเมล์ (พ.ศ. 2546). "การเสริมตะไคร้ผงในอาหารต่อการเจริญเติบโตของไก่พื้นเมืองลูกผสม." วารสารสมุนไพร **10**(1): 19-23.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันตะไคร้แกงที่ใช้ในงานวิจัย (วิเคราะห์โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

ลำดับที่	องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละ
1	6-methyl-5-hepten-2-one	1.99
2	myrcene	7.67
3	cis-ocimene	0.95
4	linalool	0.89
5	neral (citral b)	33.93
6	geraniol	4.30
7	geranial (citral a)	45.10
8	geranyl acetate	1.61

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายโชติพล หาญณรงค์ เกิดเมื่อวันอังคารที่ 8 เมษายน พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนสาธิตแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการศึกษา ปีการศึกษา 2546 เข้าศึกษาต่อในระดับอุดมศึกษาที่คณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต ปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิตหลักสูตรเภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554 ถึง 2556

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University