รหัสโครงการ SUT 3-303-53-24-18

รายงานการวิจัย

การใช้สะระแหน่ (*Mentha cordiforlia* Opiz.) เป็นสารเสริมเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารไก่เนื้อ

Utilization of Peppermint (*Mentha cordiforlia* Opiz.) Substitute for Antibiotics as a Feed Additive in Broiler Diets

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ. ดร. สุทิศา เข็มผะกา

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

ดร. วิทธวัช โมพี

นายเฉลิมชัย หอมตา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2556

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553 ขอขอบคุณฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่เพื่อใช้ในงานทดลอง และขอขอบคุณ คุณอุดมพร พุฒิพิลา ที่ได้ทำหน้าที่ผู้ช่วยวิจัย และจัดทำรายงานฉบับนี้ด้วย

สุทิศา เข็มผะกา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่ (*M. cordifolia)* และศึกษาผลของการเสริมสะระแหน่ (*M. cordifolia*) บดแห้งต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ ลักษณะซาก การต้านอนุมูลอิสระ การผลิตแอมโมเนีย และการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ศึกษาการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่ (*M. cordifolia*) สกัดด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน 4 วิธี ประกอบด้วย 1) การกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ 2) การสกัดด้วย 3เมทานอล:1เอทานอล 3) การสกัดด้วยน้ำ และ 4) การสกัดด้วยเอทานอล จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ คือ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella typhimurium* ผลการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion (DD) น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดทุกวิธีมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทุกชนิด แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าน้ำมันหอมระเหยทางการค้ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด สำหรับการทดสอบด้วยวิธีการหาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (minimal inhibitory concentration, MIC) และปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อจุลินทรีย์ (minimal bactericidal concentration, MBC) พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดทุกวิธีสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำและไอน้ำ มีค่า MIC และ MBC ต่ำสุดต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *S. aureus* และ *S. typhimurium* การทดลองที่ 2 ใช้ไก่เนื้อเพศผู้ อายุ 21 วัน จำนวน 45 ตัว เลี้ยงบนกรงขังเดี่ยว แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 9 ซ้ำ ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ อาหารทดลองแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่เสริมสะระแหน่บดแห้งที่ระดับ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% ตามลำดับ การเสริมสะระแหน่บดแห้งทุกระดับไม่ส่งผลกระทบต่อการใช้ประโยชน์ได้ของวัตถุแห้ง เถ้า สารอินทรีย์ เยื่อใย และโปรตีน ($p>0.05$) แต่มีผลดีในการลดการผลิตแอมโมเนียในมูล สำหรับคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งทุกระดับสามารถลดค่า TBARS ($p<0.05$) แต่ไม่มีผลต่อค่าอนุมูลอิสระ DPPH ในซีรัมของไก่เนื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p>0.05$) การทดลองที่ 3 ใช้ไก่เนื้อเพศผู้อายุ 1 วัน จำนวน 480 ตัว แบ่งการทดลองออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 4 ซ้ำๆ ละ 20 ตัว ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ อาหารทดลองประกอบด้วย กลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุม+ยาปฏิชีวนะคลอเตตราซัยคลิน 5 ppm และกลุ่มที่เสริมสะระแหน่บดแห้งที่ระดับ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% ตามลำดับ การเสริมสะระแหน่บดแห้งไม่ส่งผลกระทบต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ลักษณะซาก การผลิตแอมโมเนีย หรือการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ของไก่เนื้อ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งทุกระดับสามารถลดไขมันช่องท้องได้ ($p<0.05$) นอกจากนี้สะระแหน่ยังมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยการ

เสริมสะระแหน่บดแห้งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ DPPH และค่า TBARS ในซีรัมของไก่เนื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$)

สรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค แต่อย่างไรก็ตาม การเสริมสะระแหน่ (*M. cordifolia*) บดแห้งไม่มีผลต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ สมรรถนะการเจริญเติบโต ลักษณะซาก การผลิตแอมโมเนีย และการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ แต่พบว่ามีคุณสมบัติที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระ และลดการสะสมไขมันช่องท้องของไก่เนื้อ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ABSTRACT

The objective of this research was to investigate the antibacterial properties of essential oil from peppermint (*M. cordifolia*) and to evaluate the effect of dried peppermint (*M. cordifolia*) supplementation on growth performance, nutrient utilization, carcass traits, antioxidant activity, and intestinal microbial population changes of broilers. The study was divided into 3 experiments. Experiment 1, focused on the antibacterial activities of peppermint essential oil (*M. cordifolia*) using various extraction methods. Essential oil extractions consisted of 4 methods: 1) water and steam, 2) 3methanol:1ethanol, 3) hydro, and 4) ethanol extraction. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* were used in this investigation. The result was that under the disc diffusion (DD) test, the essential oil from all extraction methods showed effectiveness against all pathogenic bacteria. However, the commercial oil was found to have the highest effectiveness against tested pathogenic bacteria. In the case of the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) tests, all essential oil extraction methods provided antibacterial potential in which the essential oil from water and steam distillation showed the lowest MIC and MBC values for *E. coli, S. aureus* and *S. typhimurium*. In experiment 2, a total of 45 21-day-old male broilers were placed in individual cages and assigned into 5 dietary treatments with 9 replicates in Completely Randomized Design (CRD). Five dietary treatments consisted of control and 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0% dried peppermint, respectively. The addition of dried peppermint in diets had no significant effects on dry matter, ash, organic matter, fiber and protein utilization ($p>0.05$), but there was a beneficial effect on manure ammonia reduction ($p<0.05$). In case of antioxidant activity, dried peppermint at all levels of supplementation could reduce TBARS ($p<0.05$) values, but they had no significant effect on serum DPPH values compared with control ($p>0.05$). In experiment 3, a total of 480 one-day-old male broilers were randomly assigned to 6 dietary treatments with 4 replicates of 20 chicks each using the CRD experimental design. The experimental diets consisted of 6 treatments: control, control+chlortetracycline 5 ppm and supplemented with dried peppermint at levels of 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0%, respectively. The supplementation of dried peppermint had no significant effects on growth performance, carcass traits, ammonia production or microbial population changes of broilers. However, all levels of dried peppermint supplementation resulted in decreased abdominal

fat ($p<0.05$). In addition, dried peppermint showed an anti-oxidation property by DPPH radical values and serum TBARS compared with control ($p<0.05$).

In conclusion, peppermint (*M. cordifolia*) essential oil can provide effective antimicrobes against pathogenic bacteria. However, dried peppermint (*M. cordifolia*) supplementation had no significant effects on nutrient utilization, growth performance, carcass traits, ammonia production and microbial population changes, but it showed beneficial effects on antioxidant activity and lower abdominal fat deposition of broilers.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ .....ก
บทคัดย่อภาษาไทย .....ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....ง
สารบัญ .....ฉ
สารบัญตาราง .....ซ
สารบัญภาพ .....ญ
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... 2
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของการวิจัย..... 2
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง
2.1 ลักษณะทั่วไปของสะระแหน่.....4
2.2 สารธรรมชาติในสมุนไพร.....7
2.3 ความหมายของน้ำมันหอมระเหย (Volatile oils, Essential oils).....7
2.4 กลุ่มสารออกฤทธิ์ที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่.....7
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่.....8
2.6 กระบวนการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ในสะระแหน่.....11
2.7 กลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่..... 19
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย
3.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 28
3.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ การต้านอนุมูลอิสระ และการผลิตแอมโมเนียในมูลของไก่เนื้อ..... 32

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3 การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ลักษณะซาก การต้านอนุมูลอิสระ การผลิตแอมโมเนียและการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ.....37
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล.....42
3.5 สถานที่ทำการทดลอง.....42
3.6 ระยะเวลาทำการทดลอง.....42
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล
4.1 การทดลองที่ 1 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค..... 43
4.2 การทดลองที่ 2 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ การต้านอนุมูลอิสระ และการผลิตแอมโมเนียในมูลของไก่เนื้อ.....51
4.3 การทดลองที่ 3 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต การต้านอนุมูลอิสระ ลักษณะซาก การผลิตแอมโมเนียและการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ.....56
บทที่ 5 บทสรุป
5.1 สรุปผลการวิจัย 67
5.2 ข้อเสนอแนะ 67
บรรณานุกรม 69
ภาคผนวก 76
ประวัติผู้วิจัย..... 82

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ต่างประเทศ.....5
ตารางที่ 2.2 ชนิดและความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์หลักในสะระแหน่แต่ละสายพันธุ์.....17
ตารางที่ 2.3 คุณค่าทางโภชนะที่เป็นองค์ประกอบในใบสดของสะระแหน่สายพันธุ์ต่างประเทศ....18
ตารางที่ 2.4 ผลของการเสริมสะระแหน่บดแห้งต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ.....25
ตารางที่ 2.5 ผลของการเสริมสะระแหน่บดแห้งต่อลักษณะซากของไก่เนื้อ.....27
ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบทางเคมีของโภชนะในสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* (as fed basis)..33
ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของวัตถุดิบและโภชนะของสูตรอาหารทดลอง (การทดลองที่ 2).....34
ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของวัตถุดิบและโภชนะในสูตรอาหารทดลองไก่เนื้อระยะแรก อายุ 0-21 วัน (การทดลองที่ 3).....39
ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบของวัตถุดิบและโภชนะในสูตรอาหารทดลองไก่เนื้อระยะสุดท้าย อายุ 22-42 วัน (การทดลองที่ 3).....40
ตารางที่ 4.1 ผลผลิตน้ำมันหอมระเหย ปริมาณสารเมนทอล และลักษณะของน้ำมันหอมระเหย จากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ที่สกัดด้วยวิธีการต่างๆ (การทดลองที่ 1) 44
ตารางที่ 4.2 ชนิดและปริมาณสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ที่สกัดด้วยน้ำและไอน้ำ วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC-MS (การทดลองที่ 1).....45
ตารางที่ 4.3 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion (การทดลองที่ 1).....48
ตารางที่ 4.4 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เมื่อทดสอบด้วยวิธี Minimum inhibition concentration และ Minimum bactericidal concentration (การทดลองที่ 1).....50
ตารางที่ 4.5 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะในไก่เนื้ออายุ 28-31วัน (การทดลองที่ 2).....51
ตารางที่ 4.6 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการผลิตแอมโมเนียในมูลของไก่เนื้ออายุ 31 วัน (การทดลองที่ 2).....52
ตารางที่ 4.7 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการต้านอนุมูลอิสระในซีรัมของไก่เนื้ออายุ 31 วัน (การทดลองที่ 2).....54

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 4.8 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้ง ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ (การทดลองที่ 3).....57
ตารางที่ 4.9 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อลักษณะซากและอวัยวะภายในของไก่เนื้อ อายุ 0-42 วัน (การทดลองที่ 3).....60
ตารางที่ 4.10 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อน้ำหนักและความยาวลำไส้เล็กของไก่เนื้ออายุ 0-42 วัน (การทดลองที่ 3).....61
ตารางที่ 4.11 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการต้านอนุมูลอิสระในซีรัมของไก่เนื้อที่อายุ 21 และ 42 วัน.....63
ตารางที่ 4.12 ผลการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ส่วนซีกัมของไก่เนื้ออายุ 21 และ 42 วัน 65
ตารางที่ 4.13 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการผลิตแอมโมเนียในลำไส้ส่วนซีกัมของไก่เนื้ออายุ 21 และ 42 วัน.....66

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 ภาพถ่ายอิเล็กตรอนลักษณะขนแบบเกล็ดก้นปิด (P) ขนแบบตุ่ม (C) และขนไม่มีต่อม (NG) บริเวณผิวใบสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita* 13
ภาพที่ 2.2 ลักษณะขนมีต่อม (a, b, c) และขนไม่มีต่อม (d) ในใบสะระแหน่สายพันธุ์ *bbM. cordifolia* 13
ภาพที่ 2.3 ขนมีต่อมหลายเซลล์ ในใบของสะระแหน่สายพันธุ์ *M. spicata* (a) และ *M. arvensis* var piperascen (b) 14
ภาพที่ 2.4 ขนมีต่อมในใบสะระแหน่สายพันธุ์ *M. spicata* (a) และ *M. arvensis* var piperascen (b) และขนมีปลอกคอ (c) ในใบของสะระแหน่สายพันธุ์ *M. arvensis* var piperascen.....14
ภาพที่ 2.5 บริเวณเซลล์คัดหลั่งและเก็บสะสมสารโมโนเทอร์ปีนภายในขนแบบก้นปิด.....15
ภาพที่ 2.6 ภาพถ่ายภายใต้กล้องอิเล็กตรอนของช่องเก็บน้ำมัน (SC) เซลล์คัดหลั่ง (S) ก้านเซลล์ (ST) และ ฐานเซลล์ (B) ภายในต่อมขนแบบก้นปิดของสะระแหน่.....15
ภาพที่ 2.7 กระบวนการสังเคราะห์สารโมโนเทอร์ปีนในสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita*.....16
ภาพที่ 2.8 กลไกการทำงานของน้ำมันหอมระเหยในการทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์.....20
ภาพที่ 2.9 โครงสร้างผนังเซลล์ของจุลินทรีย์แกรมบวกและแกรมลบ.....20
ภาพที่ 2.10 กระบวนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ.....22
ภาพที่ 2.11 การเกิดปฏิกิริยาของ Thiobarbituric acid reactive substances.....23
ภาพที่ 2.11 ปฏิกิริยาการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ.....23
ภาพที่ 4.1 การเสริมสะระแหน่บดแห้งต่อดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพการผลิตโดยรวมของไก่เนื้อ.....59

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อของประเทศไทยมีอัตราการขยายตัวที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตปศุสัตว์ชนิดอื่นๆ แต่จากมาตรการยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะเสริมในอาหารเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต และป้องกันโรค พบว่าเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้ไก่เนื้อเพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ส่งผลให้ไก่มีสุขภาพอ่อนแอ และสมรรถนะการเจริญเติบโตลดลง ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อหาสารเสริมทางเลือกใหม่ทดแทนการใช้ปฏิชีวนะเป็นประเด็นที่นักวิจัยให้ความสำคัญในปัจจุบัน โดยสมุนไพรไทยเป็นสารเสริมอีกทางเลือกหนึ่งที่มีการศึกษาและวิจัย เพื่อนำมาใช้ในอาหารสัตว์ เนื่องจากมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ โดยรูปแบบที่ใช้เสริมมีทั้งในรูปบดแห้ง และน้ำมันหอมระเหย (volatile oils)

สะระแหน่ เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีศักยภาพใช้เป็นยารักษาโรคมาดั้งเดิม อยู่ในตระกูล Lamiceae สปีชีส์ *Mentha* L. มีสารออกฤทธิ์หลายชนิด ได้แก่ สารเมนทอล (menthol) เมนโทน (menthone) คาร์โวน (cavone) และเมทิลอะซิเตต (methyl acetate) และไพเพอริโทน (piperitone) เป็นต้น (Rajeswara Rao, 1999; Chowdhury et al., 2007; Chauhan et al., 2009; Kizil et al., 2010) ซึ่งสารออกฤทธิ์เหล่านี้มีคุณสมบัติหลายประการ เช่น ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ และเชื้อรา (Burt, 2004; Yadegarinia et al., 2006; Al-Bayati, 2009; Hajlaoui et al., 2010; Dzamic et al., 2010) ต้านอนุมูลอิสระ (Dorman et al., 2003; Gulluce et al., 2007; Mkaddem et al., 2009) กระตุ้นการหลั่งน้ำดี (Baliga and Rao, 2010) กระตุ้นสมรรถนะการเจริญเติบโต และลดการผลิตแอมโมเนียในมูลของไก่เนื้อ จากการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella enteritidis* และ *Candida albicans* (Tassou et al., 2000) และจากการศึกษาผลของการเสริมสะระแหน่บดแห้งในอาหารไก่เนื้อ พบว่าสามารถเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโต และน้ำหนักซากของไก่เนื้อได้ (Al-Ankari et al., 2004; Ocak et al., 2008; Toghyani et al., 2010) แต่อย่างไรก็ตามจากการรวบรวมเอกสาร พบว่าผลของการเสริมสะระแหน่บดแห้งต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อในแต่ละงานทดลองยังไม่ชัดเจน และให้ผลไม่สอดคล้องกัน ทั้งนี้เนื่องจากเป็นสะระแหน่ต่างสายพันธุ์ และส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ในต่างประเทศ สำหรับสายพันธุ์สะระแหน่ที่พบในประเทศไทยและเอเชียตะวันออก คือ สายพันธุ์ *M. cordifolia* Opiz. ยังมีข้อมูลการศึกษาค่อนข้างจำกัด ทั้งข้อมูลด้านปริมาณสารออกฤทธิ์ การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ การใช้

ประโยชน์ได้ของโภชนะ การเจริญเติบโต ลักษณะซาก การด้านอนุมูลอิสระ การผลิตแอมโมเนีย และการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ

ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่ สายพันธุ์ *M. cordifolia* ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และศึกษาผลการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ ลักษณะซาก การด้านอนุมูลอิสระ การผลิตแอมโมเนีย และการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ที่สกัดด้วยวิธีการต่างๆ ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *E. coli, S. aureus* และ *S. typhimurium*

2. เพื่อศึกษาผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ ลักษณะซาก การด้านอนุมูลอิสระ การผลิตแอมโมเนีย และการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* เพื่อใช้เป็นสารเสริมทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารไก่เนื้อ โดยศึกษาทั้งในรูปของน้ำมันหอมระเหย และในรูปบดแห้งต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ เชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *S. typhimurium* สมรรถนะการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ ลักษณะซาก การด้านอนุมูลอิสระ การผลิตแอมโมเนีย และการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ ซึ่งคาดว่าผลงานวิจัยดังกล่าวนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อ

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย

1. วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ด้วยวิธีการที่แตกต่างกันน่าจะมีผลต่อปริมาณน้ำมันหอมระเหย และศักยภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *E. coli, S. aureus* และ *S. typhimurium* ได้แตกต่างกัน

2. การเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งสามารถกระตุ้นสมรรถนะการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ การด้านอนุมูลอิสระ การผลิตแอมโมเนีย และการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่ที่เหมาะสม และมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ดีที่สุด รวมถึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชในตระกูลเดียวกัน

2. ทราบระดับที่เหมาะสมในการใช้สะระแหน่บดแห้งเสริมในอาหารไก่เนื้อ ที่จะส่งผลดีต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ สมรรถนะการเจริญเติบโต การต้านอนุมูลอิสระ การผลิตแอมโมเนีย และลดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้ของไก่เนื้อ สามารถผลิตเนื้อไก่ที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

3. ได้พืชสมุนไพรชนิดใหม่ที่มีศักยภาพสำหรับใช้ในอาหารไก่เนื้อ เพื่อแก้ปัญหาจากมาตรการยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะเสริมในอาหารสัตว์ อีกทั้งยังสามารถนำความรู้ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้เพื่อผลิตอาหารสัตว์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

4. สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้เป็นพื้นฐานสำหรับการวิจัย เพื่อพัฒนาหรือปรับใช้ในสัตว์ชนิดอื่น เช่น ไก่ไข่และสุกร เป็นต้น อีกทั้งยังสามารถนำไปปรับใช้ร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันโรคหรือกระตุ้นการเจริญเติบโตให้ได้ดียิ่งขึ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของสะระแหน่

สะระแหน่ (peppermint) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่เป็นแหล่งน้ำมันหอมระเหย อยู่ในวงศ์ Lamiaceae มีมากกว่า 25-30 สปีชีส์ ได้แก่ *M. longifolia, piperita, pulegium, arevensis, aquatica, suaveolens, anadensis* และ *routundifolia* (Gulluce et al., 2007; Hajlaoui et al., 2010; Baliga and Rao, 2010) ซึ่งสายพันธุ์สะระแหน่ที่ได้รับการรับรองจาก International Organization for Standardization (ISO) สำหรับสกัดเป็นน้ำมันหอมระเหยเชิงการค้าใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม ยา เครื่องสำอาง ยาสีฟัน และหมากฝรั่ง ได้แก่ สายพันธุ์ *M. piperita, M. spicata* และ *M. arevensis* (Gulluce et al., 2007; Chauhan et al., 2009; Kizil et al., 2010) โดยสะระแหน่แต่ละสายพันธุ์มีชนิดของสารออกฤทธิ์ที่คล้ายกัน แต่มีปริมาณที่แตกต่างกัน เนื่องมาจากอิทธิพลของพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม โดยสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita* เกิดจากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ *M. spicata* x *aquatic* สายพันธุ์ *M. spicata* เกิดจากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ *M. longifolia* x *rotuundifolia* (Kizil et al., 2010) ซึ่งสะระแหน่ที่เป็นสายพันธุ์ลูกผสมส่งผลให้มีน้ำมันหอมระเหยและสารออกฤทธิ์ในปริมาณสูง โดยปริมาณของสารออกฤทธิ์แต่ละสายพันธุ์ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.1

สำหรับสายพันธุ์สะระแหน่ที่ปลูกในประเทศไทย คือ สายพันธุ์ *M. cordifolia* Opiz. พืชไม้ล้มลุก ลำต้นเตี้ยมีสีแดงอมม่วง ใบกลมริมใบหยักโดยรอบ และกลิ่นหอม และ/หรือ ฉุน มีชื่อเรียกอื่นๆ ตามพื้นที่ปลูก เช่น หอมด่วน หอมเดือน (ภาคเหนือ) มักเงาะ สะแน่ (ภาคใต้) สะระแหน่สวน (ภาคกลาง) และขะแยะ (อีสาน) ซึ่งสารออกฤทธิ์ที่ให้กลิ่นหอม/ฉุน คือ สารเมนทอล เมนโทน เมทิลอะซิเตต พูลีโกน และ เมนโรฟูแรน (Baliga and Rao, 2010) แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารออกฤทธิ์จะมากกว่าหรือน้อยกว่าขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ แหล่งพื้นที่เพาะปลูก ลักษณะภูมิประเทศ ระยะเวลาการเก็บเกี่ยวผลผลิต ส่วนของพืชที่ใช้ วิธีการสกัด รวมถึงสารละลายที่ใช้สกัด เป็นต้น (Rizzo et al., 2008; Hajlaoui et al., 2010; Brenes and Roura, 2010; Baliga and Rao, 2010)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ต่างประเทศ

Compounds	Essential oil (%)		
	M. piperita[1/]	*M. spicata*[2/]	*M. arvensis*[3/]
α-Pinene	0.27	0.09	0.60
β-Pinene	-	0.03	0.30
β-Myrcene	-	0.17	1.20
Limonene	1.30	9.57	1.00
1,8-Cineole	3.62	1.93	-
Z, β-Ocimene	-	trace<0.01	trace<0.01
Linalool	-	0.37	0.20
Borneol	-	0.17	-
cis-Dihydrocavone	-	2.04	-
Dihydrocarveol	-	0.92	-
trans-Carveol	-	1.02	-
cis-Carveol	-	0.20	-
Cavone	-	76.65	-
iso-Dihydro carvyl acetate	-	0.14	-
cis-Carvyl acetate	-	0.14	-
β-Bourbonene	0.21	1.37	-
β-Caryophyllene	-	0.84	-
cis-Muurola-4(14), 5-diene	-	0.01	-
Germacrene D	-	0.37	0.10
Bicyclogermacrene	-	trace<0.01	-
Camphene	-	-	0.10
Menthone	-	-	9.60
Isomenthon	0.27	-	4.00
Neomenthol	6.73	-	1.20
Neoisomenthol	1.08		-

หมายเหตุ: - ตรวจไม่พบ [1/] Kizil et al. (2010), [2/] Chauhan et al. (2009), [3/] Rajeswara Rao (1999)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่ต่างประเทศ (ต่อ)

Compounds	Essential oil (%)		
	M. piperita[1/]	*M. spicata*[2/]	*M. arvensis*[3/]
Menthol	35.64	-	73.00
(+)-Menthol	38.06	-	-
L-(-)-Menthol	0.49	-	-
D-Isomenthone	0.61	-	-
Pulegone	-	-	1.30
Isomenthol acetate	3.38	-	-
Thymol	0.50	-	-
Piperitone	-	-	0.50
Geraniol	-	-	0.40
Menthyl acetate	-	-	4.00
Geranyl acetate	-	-	0.10
β-Eelemene	-	-	0.10
β-Bourbonene	0.21	-	-
β-Caryophyllene	-	-	0.40
γ-Cadinene	-	-	0.10
(E)-Nerolidol	-	-	0.10
trans-Sabinene	0.20	-	0.10
p-Cymene	0.50	-	0.10
Caryophyllene oxide	0.76	-	-
Spathulenol	0.11	-	-
Laevo-beta-pinene	0.44	-	-
β-Myrcene	0.09	-	-
α-Phellandrene	0.10	-	-

หมายเหตุ: - ตรวจไม่พบ [1/] Kizil et al. (2010), [2/] Chauhan et al. (2009), [3/] Rajeswara Rao (1999)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.2 สารธรรมชาติในสมุนไพร แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

2.2.1 สารปฐมภูมิ (primary metabolites) เป็นสารที่พบทั่วไปในพืชเป็นผลผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน เม็ดสี (pigments) และเกลืออนินทรีย์ (inorganic salt) เป็นต้น

2.2.2 สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) หรือสารธรรมชาติ (natural products) เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อนที่พืชสร้างขึ้นพบแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) โดยอาศัยการทำงานร่วมกับเอนไซม์ (enzyme) สารประกอบกลุ่มนี้ ได้แก่ แอลคาลอยด์ (alkaloids) แอนทราควิโนน (anthraquinones) และน้ำมันหอมระเหย (essential oils) เป็นต้น (วันชัย และคณะ, 2547)

2.3 ความหมายของน้ำมันหอมระเหย (Volatile oils, Essential oils)

น้ำมันหอมระเหยมีองค์ประกอบทางเคมีที่ซับซ้อนมีสารต่างๆ มากมาย น้ำมันหอมระเหยที่พืชสร้างขึ้นจะถูกเก็บไว้ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ใบ ดอก ลำต้น และเมล็ด แต่มีเพียง 1-2 ชนิดที่มีปริมาณมาก โดยน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้จากพืชสมุนไพร (steam distillation) มีค่าอยู่ในช่วง 0.01-10% ส่วนการสกัดน้ำมันหอมระเหยในตัวทำละลายจะให้สารสกัดในรูปสารหนืด (resinous substance) ซึ่งมีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์สำคัญสูงถึง 100 เท่าหรือมากกว่า (วันชัย และคณะ, 2547) จากการรายงานของ Alankar (2009) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. pipeita* และ *M. arvensis* ที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบไอน้ำ มีปริมาณเท่ากับ 0.1-1.0%

2.4 กลุ่มสารออกฤทธิ์ที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่

กลุ่มสารส่วนใหญ่ในน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* คือ กลุ่มของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน และอนุพันธ์ต่างๆ ซึ่งในโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยหมู่ไฮโดรเจนและคาร์บอน โดยสารประกอบเหล่านี้จะถูกออกซิไดซ์กลายเป็นกลุ่มสารลำดับสอง (secondary metabolite) ซึ่งสารออกฤทธิ์แต่ละชนิดจะมีกลิ่นจำเพาะ ซึ่งกลิ่นหอม และ/หรือ ฉุนในน้ำมันหอมระเหยถูกกำหนดโดยกลุ่มของสารออกฤทธิ์ ดังต่อไปนี้

- โมโนเทอร์ปีนส์ (monoterpenes) ประกอบด้วยคาร์บอน 10 อะตอม
- เซสควิเทอร์ปีนส์ (sesquiterpenes) ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม
- แอลกอฮอล์ (alcohol) แอลดีไฮด์ (aldehyde) คีโตน (ketone) และเอสเตอร์ (ester)
- ฟีนอล (phenol) อีเทอร์ (ether) และออกไซด์ (oxide) (วันชัย และคณะ, 2547)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่

ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของสารออกฤทธิ์ในน้ำมันน้ำหอมระเหย มีอิทธิพลมาจากปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม และพันธุกรรม ดังนี้ คือ

2.5.1 ส่วนของพืช และระยะการเก็บผลผลิต

น้ำมันหอมระเหยในสะระแหน่ที่สร้างขึ้นส่วนใหญ่เก็บไว้บริเวณส่วนใบ ส่วนลำต้นพบปริมาณค่อนข้างต่ำ จากการศึกษาการสะสมและการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ในสะระแหน่สายพันธุ์ *M. spicata* พบว่าการสังเคราะห์สารโมโนเทอร์ปีนจะเกิดขึ้นใต้เนื้อเยื่อของใบ เรียกบริเวณนี้ว่า ขนมีต่อม (glandular trichomes) โดยการเจริญเติบโตของขนมีต่อม จะส่งผลโดยตรงต่อความเข้มข้นของสารโมโนเทอร์ปีนในใบ และผันแปรตามการพัฒนาของใบ ซึ่งสารโมโนเทอร์ปีนจะเริ่มมีการสะสมก่อนใบมีความยาว 5 มิลลิเมตร ดังนั้นความเข้มข้นของสารโมโนเทอร์ปีนต่อกรัมของเนื้อเยื่อจะมีมากในใบอ่อน และลดลงตามการพัฒนาของใบ (Gershenzon et al., 1989) สอดคล้องกับการศึกษาของ Zheljaikov et al. (2009) ได้ศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ในสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita* พบว่ามีปริมาณสารเมนโทน และเมนโทรฟูแรนสูงในช่วงแตกยอดอ่อนมากกว่าช่วงที่ออกดอก แต่จากการศึกษาของ Rohloff et al. (2005) พบว่าวันเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมต่อการเพิ่มผลผลิตของน้ำมันหอมระเหยในสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita* อยู่ในช่วงออกดอก โดยผลผลิตของน้ำมันหอมระเหยจะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ดอกเริ่มบาน (early bloom) ถึงบานเต็มที่ (full bloom) และดอกบานช่วงสุดท้าย (late bloom) มีปริมาณเท่ากับ 2.95, 4.13 และ 4.20 ลิตรต่อน้ำหนักของใบตามลำดับ และการอบแห้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่ามีสารเมนทอล และเมนโทนปริมาณสูง มีค่าเท่ากับ 43-54 และ 12-30% ตามลำดับ

2.5.2 พื้นที่เพาะปลูก

ปริมาณผลผลิตและชนิดของสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่ผันแปรไปตามสายพันธุ์ และแหล่งที่เพาะปลูก Gracindo et al. (2006) ศึกษาหาปริมาณน้ำมันหอมระเหย และสารออกฤทธิ์ในสะระแหน่ 21 สายพันธุ์ในประเทศบราซิล พบว่าปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้อยู่ในช่วง 0.47-4.17% สารออกฤทธิ์สำคัญ ได้แก่ สารเมนทอล1, 8-ซินีออล (1, 8-cineole) ลิมโมนีน (limonene) ลินาโลออล (linalool) ลินาลิลอะซิเตต (linalyl acetate) คาร์โวนเมนโทน เมทิลอะซิเตต และไพเพอริทีโนนออกไซด์ (piperitenone oxide) ซึ่งสารออกฤทธิ์เหล่านี้มีปริมาณแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ เช่น สะระแหน่สายพันธุ์ *M. suavelons* มีสารออกฤทธิ์หลัก คือ สารไพเพอริโทนออกไซด์ 79.0% สายพันธุ์ *M. villosa* และ *M. spicata* มีสารคาร์โวน 72.1 และ 70.9% ตามลำดับ สายพันธุ์ *M. arvensis* มีสารลินาโลออล 78.5% และสายพันธุ์ *M. canadesis* มีสาร

เมนทอล 65% โดย Shahi et al. (1999) ได้ทำการศึกษาผลผลิตใบและน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่ที่ปลูกในประเทศอินเดียที่เมือง Batote และ Jammu พบว่าผลผลิตใบและปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีปริมาณสารออกฤทธิ์แตกต่างกัน เช่น สะระแหน่ที่ปลูกในเมือง Jammu มีสารเมนทอล และเมทิลอะซิเตตปริมาณ 64 และ 9.2% ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าสะระแหน่ที่ปลูกในเมือง Batote

2.5.3 วิธีการตากแห้งใบสะระแหน่

วิธีการทำแห้งใบสะระแหน่ที่แตกต่างกัน มีผลต่อส่วนประกอบทางเคมีและผลผลิตน้ำมันหอมระเหย Asekun et al. (2007) ได้ศึกษาวิธีตากแห้งใบสะระแหน่ สายพันธุ์ *M. longifolia* 3 วิธีการที่แตกต่างกัน คือ การผึ่งลม ตากแดด และอบแห้ง พบว่าเมื่อสกัดน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่ที่ตากแห้งด้วยวิธีผึ่งลม และตากแดด สารออกฤทธิ์ที่พบมาก คือสารเมนโทน ปริมาณ 47.9 และ 38.3% ตามลำดับ ส่วนวิธีการอบแห้งพบสารลิมโมนีนมากสุด ปริมาณ 48.0% โดยการอบแห้งเป็นวิธีการที่สามารถทำลายองค์ประกอบของสารเมนโทน และพูลีโกนได้ ซึ่งการทำลายองค์ประกอบของสารพูลีโกนถือว่าเป็นผลดี เพราะสารพูลีโกนระดับสูงจะส่งผลเสียต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของตับ ในหนูที่ได้รับสารพูลีโกนปริมาณสูง พบว่ามีผลในการทำลายเซลล์ cytochrome P450 (Asekun et al., 2007) อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณน้ำมันหอมระเหย โดยการอบแห้งที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิที่ต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาสกัดจะได้น้ำมันหอมระเหยคุณภาพดี Rohloff et al. (2005) ได้ศึกษาอุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้งที่ 30, 50 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 และ 70 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยต่ำ แต่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถลดการสูญเสียน้ำมันหอมระเหยได้ จากการรวบรวมข้อมูลการอบแห้งพืชสมุนไพรที่สะสมน้ำมันหอมระเหย พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 45-50 องศาเซลเซียส ซึ่งช่วงอุณหภูมิดังกล่าวมีความเหมาะสมต่อการรักษาคุณภาพสีของใบพืช และสารออกฤทธิ์ ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงเลือกใช้อุณหภูมิอบแห้งสะระแหน่ที่ 45 องศาเซลเซียส

2.5.4 วิธีการสกัดหรือการกลั่น (Extraction, Distillation)

หลักการพิจารณาสำหรับการกลั่นน้ำมันหอมระเหย คือ 1) ความไวของน้ำมันหอมระเหยต่ออุณหภูมิที่ใช้กลั่น 2) การระเหยของน้ำมันหอมระเหยจากผิวของโครงสร้างพืช 3) ความสามารถในการละลายน้ำของน้ำมันหอมระเหย และ 4) วิธีการสกัดหรือการกลั่น (Tandon, 2008) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อคุณภาพและปริมาณสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหย จากการรวบรวมเอกสาร พบว่าวิธีการที่ใช้สกัดน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่มีหลายวิธี ได้แก่ การ

กลั่นด้วยน้ำ (hydro distillation) (Shahi et al., 1999; Rohloff et al., 2005; Asekun et al., 2007; Gracindo et al., 2006; Eteghad et al., 2009) การกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ (water and steam distillation) (Rajeswara Rao, 1999; Sartoratto et al., 2004; Tassou et al., 2000) การกลั่นด้วยไอน้ำ (direct steam distillation) (Tandon, 2008) และการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluid extraction) (Ammann et al., 1999)

2.5.4.1 การสกัดด้วยน้ำ (Hydro extraction)

เป็นวิธีการดั้งเดิม ปฏิบัติง่าย และมีต้นทุนต่ำ เพียงแต่ต้องควบคุมน้ำให้มีปริมาณเพียงพอตลอดระยะเวลาการกลั่น แต่มีข้อเสีย คือ กรณีที่ต้องกลั่นพืชในปริมาณมากความร้อนที่เข้าสู่หม้อกลั่นจะไม่สม่ำเสมอตลอดทั้งหม้อกลั่น รวมทั้งใช้เวลาการกลั่นที่ยาวนานซึ่งอาจทำให้พืชที่อยู่ด้านล่างใกล้กับเตาเกิดการไหม้ น้ำมันมีสีเข้ม และความร้อนที่มากเกินไปอาจจะทำลายพันธะของส่วนประกอบน้ำมันบางชนิด เช่น สารประกอบเอสเทอร์ (Tandon, 2008; อรัญญา และคณะ, 2548)

2.5.4.2 การสกัดด้วยน้ำและไอน้ำ (Water and steam extraction)

เป็นวิธีการที่นำมาใช้เพื่อขจัดข้อบกพร่องของการสกัดด้วยน้ำ โดยจะใช้ตะแกรงรองใบพืชให้อยู่เหนือน้ำ โดยให้ไอน้ำร้อนนำพาเอาน้ำมันที่อยู่ในโครงสร้างของใบออกมาพร้อมกับการระเหยของน้ำ เมื่อผ่านอุปกรณ์ควบแน่นไอน้ำกลายเป็นหยดน้ำในลักษณะที่มีน้ำมันหอมระเหยผสมอยู่ด้วย โดยใช้อุณหภูมิความร้อน 100 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาการสกัด 6-8 ชั่วโมง ข้อดี มีต้นทุนต่ำเหมาะสำหรับบุคคลทั่วไปสามารถทำได้เอง ใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิตน้ำมันหอมระเหยในเชิงการค้าเริ่มแรกในประเทศอินเดีย

2.5.4.3 การสกัดด้วยไอน้ำ (Direct steam extraction)

เป็นวิธีการที่ปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพดีกว่าการสกัดด้วยน้ำและไอน้ำ โดยแยกถังต้มไอน้ำ และถังสกัดออกจากกัน โดยใบพืชจะถูกวางไว้บนตะแกรงในถังสกัด และให้ความร้อนจากไอน้ำจากถังต้มภายนอกนำไอน้ำผ่านเข้าถังกลั่น ประสิทธิภาพดีกว่าการสกัดด้วยน้ำ และไอน้ำ เนื่องจากการสกัดด้วยน้ำและไอน้ำจะใช้ความดันบรรยากาศ อุณหภูมิสูงสุดที่ 100 องศาเซลเซียสเท่านั้น แต่การสกัดด้วยไอน้ำจะใช้ความดันร่วมด้วยที่ 50 psi ซึ่งสามารถให้ความร้อนได้สูงกว่าและไม่จำกัดแหล่งกำเนิดความดัน เพราะถังต้มกับถังกลั่นแยกกัน สามารถสกัดน้ำมันได้สมบูรณ์และรวดเร็ว ใช้ระยะเวลาเพียง 3 ชั่วโมง แต่ต้นทุนสูงเหมาะสำหรับการกลั่นขนาดใหญ่ บรรจุพืช 1-3 ตันต่อหนึ่งถัง (Tandon, 2008)

2.5.4.4 การสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical fluid extraction)

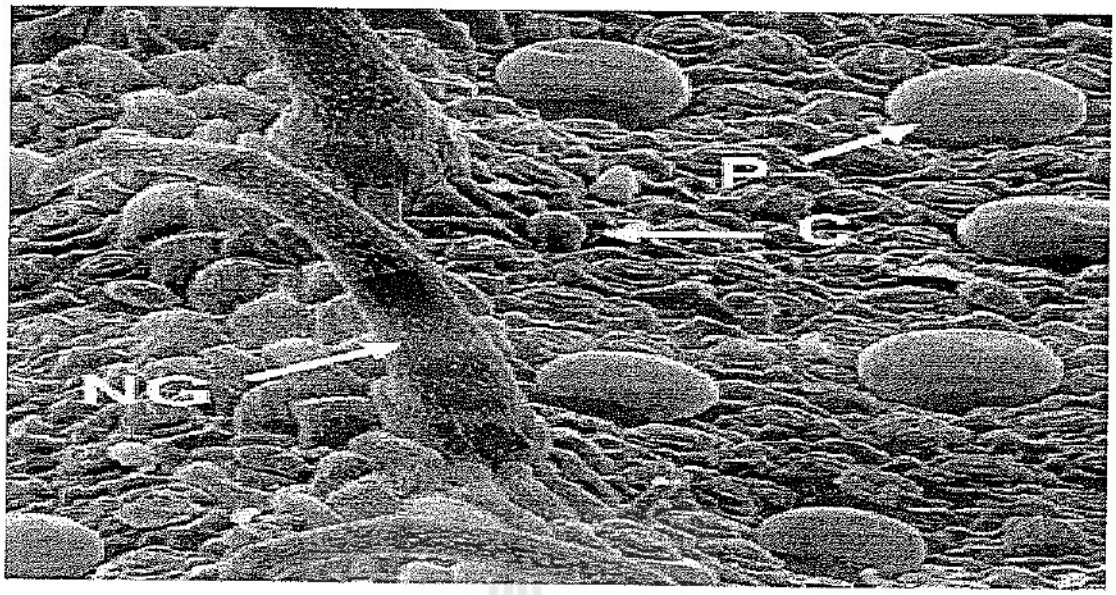
เป็นวิธีการเตรียมสารสกัดจากสมุนไพรโดยใช้ตัวทำละลายยิ่งยวด โดยอาศัยหลักการเมื่อสารอยู่ในอุณหภูมิและความดันที่เป็นจุดวิกฤติยิ่งยวด (critical point) จะมีคุณสมบัติในการซึมผ่านของแข็งได้เหมือนแก๊ส และสามารถละลายสารได้เหมือนของเหลว จึงสามารถประยุกต์สำหรับการสกัดสารได้เป็นอย่างดี ซึ่งเป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถสกัดน้ำมันหอมระเหยได้ในปริมาณมาก และใช้เวลาน้อยกว่า ตัวทำละลายที่นิยมใช้ คือ คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ซึ่งเป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายและสิ่งแวดล้อม เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมที่เป็นที่นิยม (การสกัดด้วยไอน้ำ) การสกัดแบบดั้งเดิมจะได้ปริมาณและจำนวนของน้ำมันหอมระเหยน้อยกว่า เนื่องจากการสูญเสียสารออกฤทธิ์สำคัญจากความร้อนของไอน้ำ และใช้เวลามากกว่า (อรัญญา และคณะ, 2548)

จากการรวบรวมเอกสาร พบว่าวิธีการสกัด และสารละลายที่ใช้สกัดมีผลต่อปริมาณและคุณภาพของสารออกฤทธิ์สำคัญในสะระแหน่ ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงเลือกใช้วิธีการสกัด ดังนี้ คือ 1) การสกัดด้วยน้ำและไอน้ำ 2) การสกัดด้วย 3เมทานอล:1เอทานอล 3) การสกัดด้วยน้ำ และ 4) การสกัดด้วยเอทานอล เหตุผลของการเลือกทั้ง 4 วิธีการนี้ คือ พิจารณาจากวิธีการ และชนิดของสารละลายที่ใช้สกัด สามารถให้น้ำมันหอมระเหยและมีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ในปริมาณที่สูง และมีต้นทุนการสกัดไม่สูง สามารถปฏิบัติได้เองในห้องปฏิบัติการ

2.6 กระบวนการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ในสะระแหน่

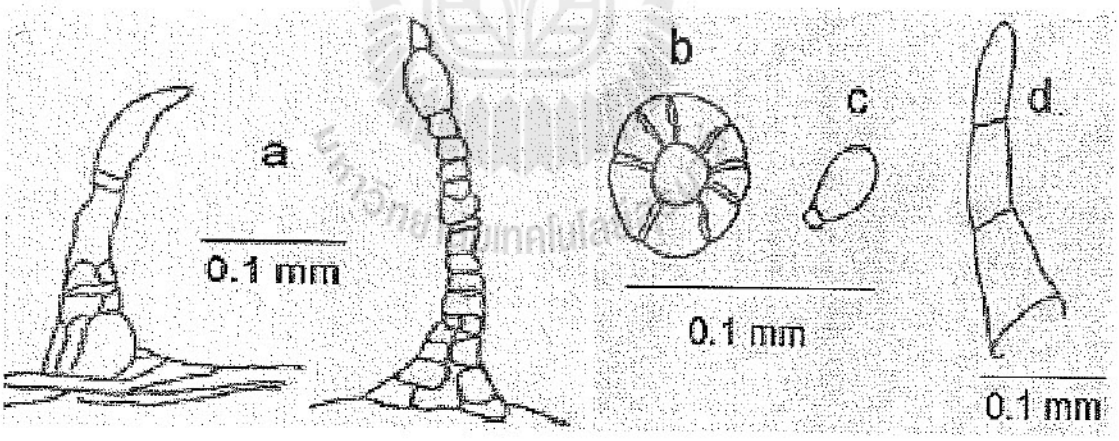
สารออกฤทธิ์ของสะระแหน่ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มโมโนเทอร์ปีน เกิดจากการสังเคราะห์แบบชีวเคมี โดยการควบคุมของเอ็นไซม์ ซึ่งสารตั้งต้นที่ใช้สังเคราะห์สารออกฤทธิ์มีหลายชนิด เช่น ซูโครส อะซิเตต และเมวาโลเนท (mevalonate) (Gershenzon et al., 1989) จากการศึกษาของ Croteau et al. (2005) ได้ศึกษาหาตำแหน่งที่สังเคราะห์น้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าตำแหน่งที่สังเคราะห์น้ำมันหอมระเหยอยู่บริเวณในเนื้อเยื่อส่วนหน้าของใบ ประกอบด้วย 1) ต่อมขนแบบก้นปิด (peltate glandular trichomes) มีรูปร่างเหมือนรูปโล่ เป็นบริเวณผลิต สะสมสารเมนทอล และสารโมโนเทอร์ปีนชนิดต่างๆ 2) ขนแบบตุ่ม (capitate glandular trichomes) 3) ขนที่ไม่มีต่อม (non-glandular trichomes) เป็นต่อมขนที่ไม่มีการผลิตสารโมโนเทอร์ปีน ได้แสดงในรูปภาพที่ 2.1 จากการทดลองของ Sitthithaworn et al. (2009) ได้ศึกษาสัณฐานวิทยาของสะระแหน่สายพันธุ์ไทย *M. cordifolia* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ามีเนื้อเยื่อเรียงเป็นชั้นเดียว (uniserate epidermis) หลายชนิดได้แก่ ชั้นวงกลม (cuticle layer) ชั้นขนมีต่อม ประกอบด้วยขนที่มีลักษณะแบบตุ่ม เกล็ดแบบก้นปิด และขนที่ไม่มีต่อม (non-glandular trichomes) ได้แสดงในภาพที่ 2.2 ซึ่งลักษณะของขนมีต่อมแบบ

หลายเซลล์ (peltate multiple glandular trichomes) ในใบของสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* มีลักษณะคล้ายคลึงกับสะระแหน่สายพันธุ์ *M. spicata* และ *M. arvensis* ได้แสดงในภาพที่ 2.3 และขนมีต่อมของสะระแหน่สายพันธุ์ *M. spicata* และ *M. arvensis* ได้แสดงในภาพที่ 2.4 ส่วนประกอบในขนแบบก้นปิด ประกอบด้วย ช่องเก็บน้ำมันหอมระเหย เซลล์คัดหลั่ง ก้านเซลล์ และฐานเซลล์ ได้แสดงไว้ในภาพที่ 2.5 โดยกระบวนการสังเคราะห์แบบชีวเคมีของสารโมโนเทอร์ปีน ได้แสดงไว้ในภาพที่ 2.6 ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์สารโมโนเทอร์ปีนในสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita* สารออกฤทธิ์หลัก คือ สารเมนทอล โดยสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ คือ สารไอโซเพ็นเทนิลไดฟอสเฟต (isopentenyl diphosphate, IPP) และสารไดเมทิลแอลลิลไดฟอสเฟต (di-methylalyl diphosphate, DMAPP) ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ในโครงสร้างสารไอโซพีนอยด์ (isoprenoid) และเปลี่ยนเป็นสารเจอร์รานิลไพโรฟอสเฟต (geranyl pyrophosphate) โดยทุกขั้นตอนของการสังเคราะห์จะอยู่ภายใต้การทำงานร่วมกันของเอ็นไซม์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อของใบสะระแหน่ และยังมีสารโมโนเทอร์ปีนชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการดังกล่าว ได้แก่ สารลิมูนีน เมนโทน พูลีโกน และเมนโทรฟูแรน อนุพันธุ์อื่นๆ เป็นต้น ซึ่งพบว่าสารเมนทอล และเมทิลอะซิเตล เป็นสารที่ให้กลิ่นฉุน และกลิ่นสดชื่นแรงกว่าสารเมนโทน พูลีกอน และเมนโทรฟูแรน (Baliga and Rao, 2010) เช่นเดียวกันกับการสังเคราะห์สารโมโนเทอร์ปีนในสะระแหน่สายพันธุ์ *M. spicata* สารตั้งต้นของกระบวนการสังเคราะห์ คือ สารเจอร์รานิลไพโรฟอสเฟต ผลผลิตสารออกฤทธิ์หลักที่ได้ คือ สารคาร์โวน ซึ่งความแตกต่างของสารออกฤทธิ์ขึ้นอยู่กับการทำงานของเอ็นไซม์ในสะระแหน่แต่ละสายพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามการสะสมของสารโมโนเทอร์ปีนยังขึ้นอยู่กับอายุของพืช โดยสารเมนโทนจะพบมากในใบสะระแหน่ (*M. piperita*) ที่อายุยังน้อย แต่สารเมนทอล และเมทิลอะซิเตทจะพบในใบแก่ของสะระแหน่ (Turner et al., 2000) สอดคล้องกับการศึกษาของ Gershenzon et al. (1989) พบว่าการสะสมสารโมโนเทอร์ปีนจะเริ่มสะสมตั้งแต่ใบอ่อนมีความยาว 5 มิลลิเมตร และจากการศึกษาของ Mucciarelli1 et al. (2007) พบสารเมนโมน และนีโอเมนทอล (neomenthol) มีปริมาณสูงในใบสะระแหน่ที่มีอายุการปลูก 14 วัน ในขณะที่สารเมนโทรฟูแรนมีปริมาณสูงเมื่อมีอายุปลูกได้ 28 วัน



ภาพที่ 2.1 ภาพถ่ายอิเล็กตรอนลักษณะขนแบบเกล็ดก้นปิด (P) ขนแบบตุ่ม (C) และขนไม่มีต่อม (NG) บริเวณผิวใบสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita*

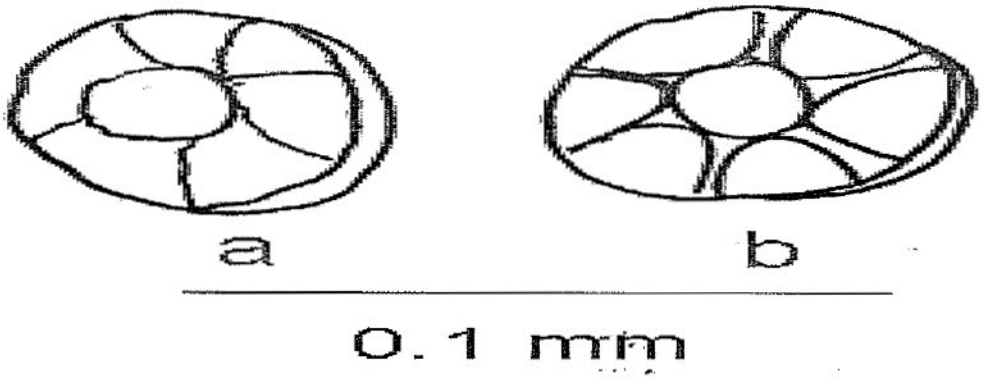
ที่มา: Croteau et al. (2005)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะขนมีต่อม (a, b, c) และขนไม่มีต่อม (d) ในใบสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia*

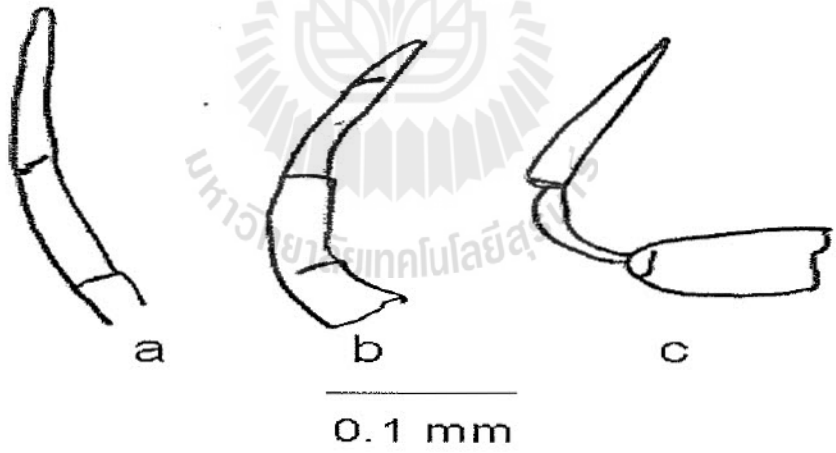
ที่มา: Sitthithaworn et al. (2009)

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



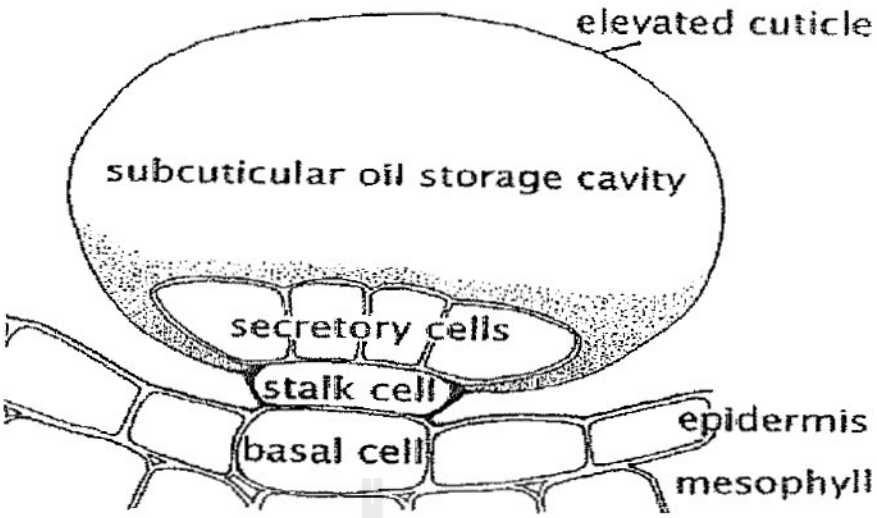
ภาพที่ 2.3 ขนมีต่อมหลายเซลล์ ในใบของสะระแหน่สายพันธุ์ *M. spicata* (a) และ *M. arvensis* var piperascen (b)

ที่มา: Sitthithaworn et al. (2009)



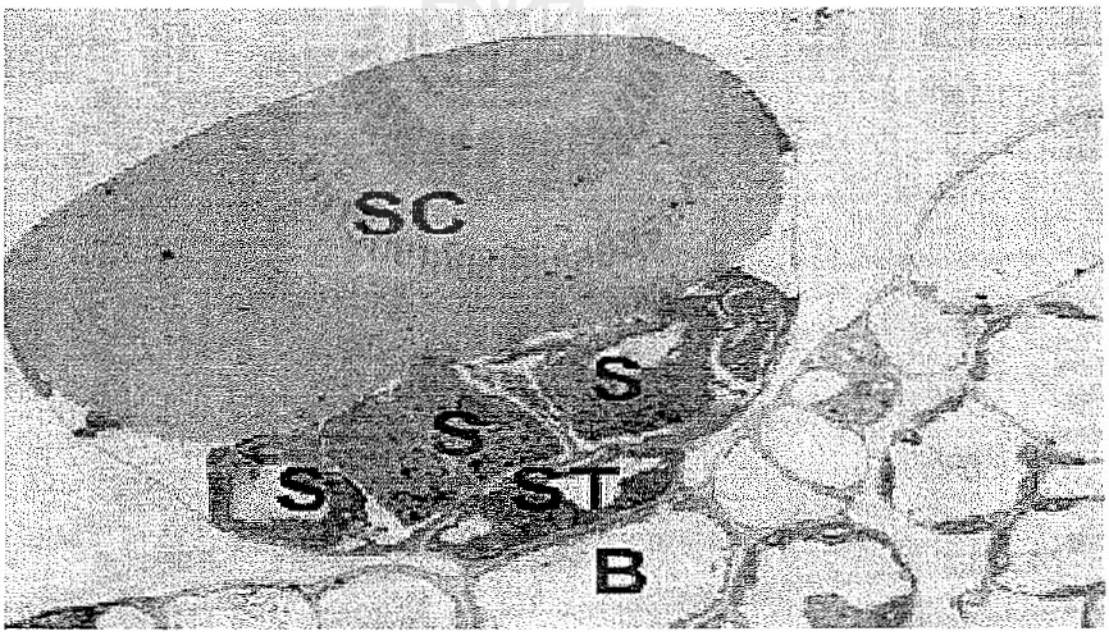
ภาพที่ 2.4 ขนมีต่อมในใบสะระแหน่สายพันธุ์ *M. spicata* (a) และ *M. arvensis* var piperascen (b) และขนมีปลอกคอ (c) ในใบของสะระแหน่สายพันธุ์ *M. arvensis* var piperascen

ที่มา: Sitthithaworn et al. (2009)



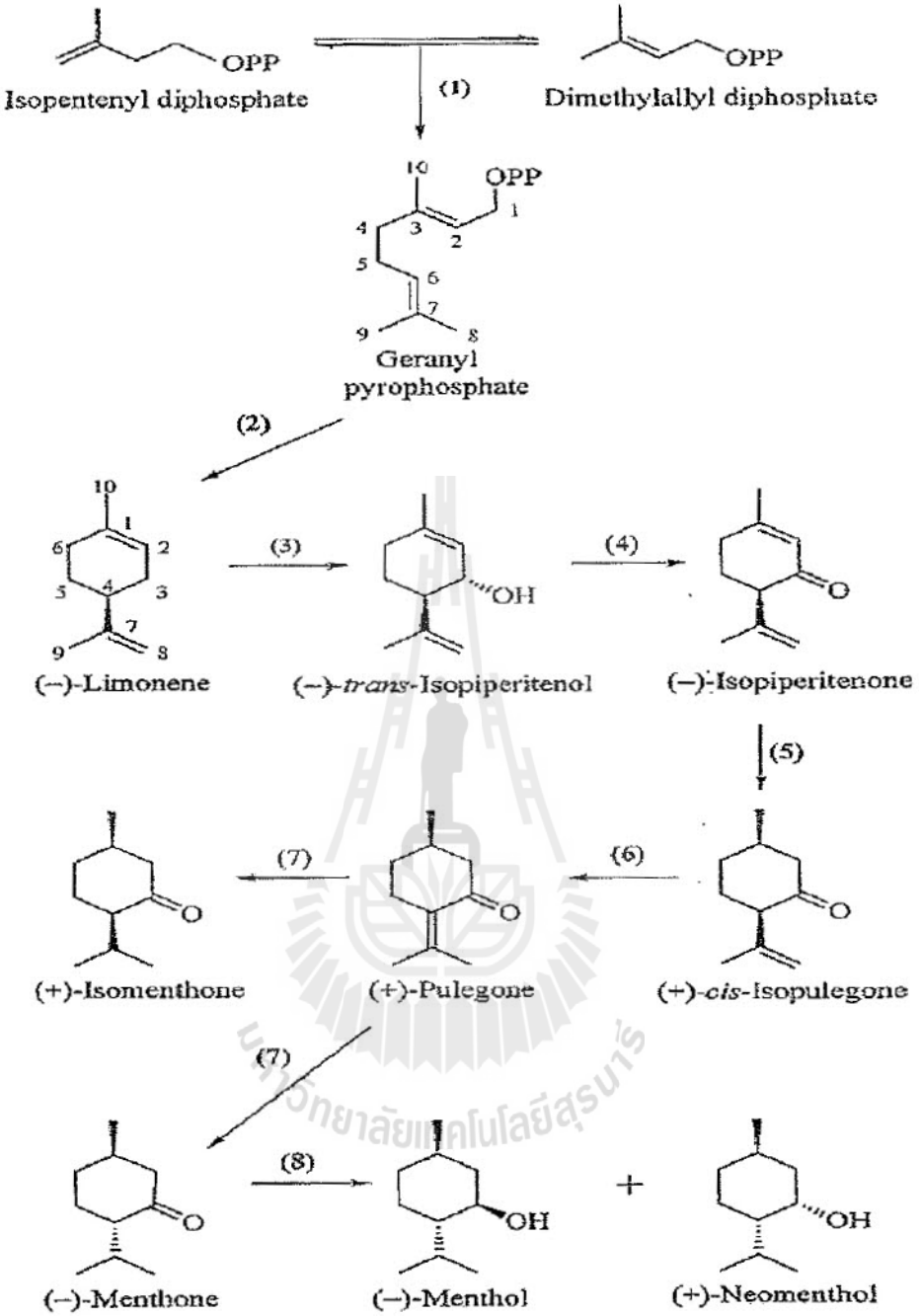
ภาพที่ 2.5 บริเวณเซลล์คัดหลั่งและเก็บสะสมสารโมโนเทอร์ปีนภายในขนแบบก้นปิด

ที่มา: Turner et al. (2000)



ภาพที่ 2.6 ภาพถ่ายภายใต้กล้องอิเล็กตรอนของช่องเก็บน้ำมัน (SC) เซลล์คัดหลั่ง (S) ก้านเซลล์ (ST) และ ฐานเซลล์ (B) ภายในต่อมขนแบบก้นปิดของสะระแหน่

ที่มา: Croteau et al. (2005)



ภาพที่ 2.7 กระบวนการสังเคราะห์สารโมโนเทอร์ปีนในสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita*

ที่มา: Turner et al. (2000)

หมายเหตุ: 1: geranyl diphophate synthase, 2: 4s-(-) - limonene synthase, 3: cytochrome P450 (-)-limonene-3-hydroxylase, 4:(-)-Trans-isopiperitenol dehydrogenase, 5:(-)-isopiperitenol dehydrogenase, 6:(+)-cis-isopulegone isomerase, 7: (+)-pulegone reductase, 8: (-)-menthone reductase

จากการรวบรวมข้อมูลชนิดของสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่ (ตารางที่ 2.2) โดยส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์จากต่างประเทศ แต่สายพันธุ์ที่พบในไทย (*M. cordifolia*) ยังมีข้อมูลค่อนข้างจำกัด ทั้งนี้สะระแหน่ต่างสายพันธุ์กัน อาจมีสารออกฤทธิ์หลักชนิดเดียวกันได้ ซึ่งสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita* และ *M. arvensis* มีสารออกฤทธิ์หลัก คือ เมนทอล 35.64 และ 73% ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ *M. spicata* มีสารออกฤทธิ์หลัก คือ คาร์โวน 76.65%

ตารางที่ 2.2 ชนิดและความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์หลักในสะระแหน่แต่ละสายพันธุ์

References	Species	Major components	Major components (%)
Rajeswara Rao (1999)	*M. arvensis*	menthol	73.00
Chanhan et al. (2009)	*M. spicata*	Cavone	76.65
Mkaddem et al. (2009)	*M. viridis*	Cavone	50.47
Hajlaoui et al. (2009)	*M. pulenium*	pulegone	61.11
Kizil et al. (2010)	*M. piperita*	menthol	35.64

ปัจจัยด้านพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม นอกจากจะมีผลต่อชนิดและปริมาณของน้ำมันหอมระเหยแล้ว ยังพบว่าปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อปริมาณสารอาหารชนิดต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบในสะระแหน่ด้วยเช่นกัน จากการวิเคราะห์สารอาหารในใบสะระแหน่สด 100 กรัม (ตารางที่ 2.3) พบว่าสะระแหน่มีสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกายครบถ้วน ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน แร่ธาตุ และเยื่อใย นอกจากนี้สะระแหน่ยังพบปริมาณแร่ธาตุที่เป็นพิษที่ต่ำกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนดโดย World Health Organization (WHO) (2005) เช่น แร่ธาตุแคดเมียม (cadmium) โครเมียม (chromium) และทองแดง (copper) โดยมีในใบพืชสดไม่เกิน 0.3, 2 และ 20 mg/kg ตามลำดับ (Kizil et al., 2010)

ตารางที่ 2.3 คุณค่าทางโภชนะที่เป็นองค์ประกอบในใบสดของสะระแหน่สายพันธุ์ต่างประเทศ

	Nutrient composition (g/100 g)		
Elements	*M. piperita*	*M. spicata*	*M. arvensis*
Energy, kcal	70.00	44.00	48.00
Carbohydrate, g	14.79	8.41	5.80
Protein, g	3.75	3.29	4.80
Total fat, g	0.94	0.73	0.60
Fiber, g	8.00	6.80	2.00
Folates, µg	114.00	105.00	114.00
Niacin, mg	1.71	0.95	1.00
Pantothenic acid, mg	0.34	-[1/]	-
Pyridoxine, mg	0.13	0.16	-
Riboflavin, mg	0.27	0.18	0.26
Thiamin, mg	0.08	0.08	0.05
Vitamin A, IU	4248.00	4045.00	-
Vitamin C, mg	31.80	13.30	27.00
Sodium, mg	31.00	30.00	-
Potassium, mg	569.00	458.00	-
Carotene, µg	-	-	1620.00
Calcium, mg	243.00	199.00	200.00
Copper, mg	3.29	0.240	0.18
Iron, mg	5.08	11.87	15.60
Magnesium, mg	80.00	63.00	60.00
Manganese, mg	1.176	1.118	0.57
Zinc, mg	1.11	1.09	0.44
Chromium, mg	-		0.01
Phosphorus, mg	-	-	62.00
Phytin phosphorus, mg	-	-	4.00
Oxalic acid, mg	-	-	33.00
Sulfur, mg	-	-	84.00
Chlorine, mg	-	-	34.00

หมายเหตุ: [1/]- ตรวจไม่พบ ข้อมูลได้จากเว็ปไซต์ www. nutrition-and-you.com อ้างอิงข้อมูลมาจาก USDA National nutrient data base

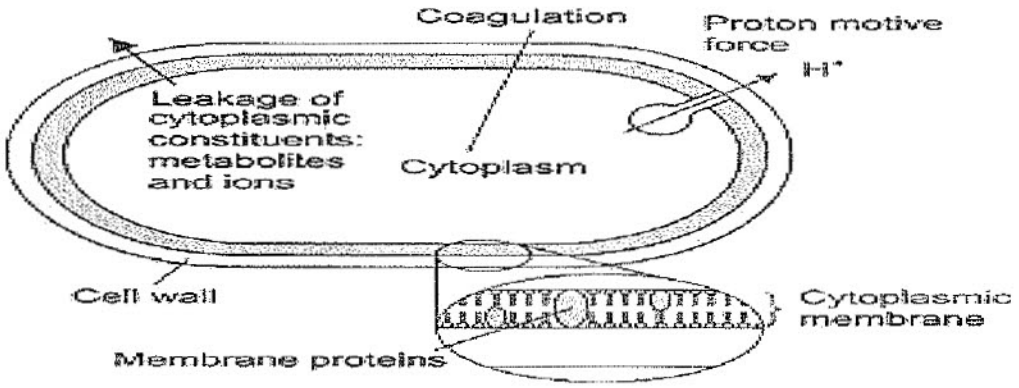
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.7 กลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่

2.7.1 ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (Antibacterial activity)

การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารมาได้หลายๆ ทาง เช่น น้ำ อากาศ อาหาร อุจจาระคน และสัตว์ ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีการปนเปื้อนในอาหารที่สำคัญ ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* spp. เป็นต้น จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถก่อโรค และโรคที่เกิดขึ้นยังสามารถติดต่อมาสู่คนและสัตว์ได้ด้วย เชื้อ *E. coli* เป็นจุลินทรีย์แกรมลบ สามารถก่อโรคในระบบทางเดินอาหารทั้งในคนและสัตว์ เชื้อ *S. aureus* เป็นจุลินทรีย์แกรมบวก สร้างสารพิษเอนเทอโรท็อกซิน (enterotoxin) ทำให้อาหารเป็นพิษ พบได้ตามผิวหนังและโพรงจมูก รวมถึงสิ่งแวดล้อม อาการเป็นพิษของเชื้อนี้ เรียกว่า ซัลโมเนลโลซีส (salmonellosis) (Dunkley et al., 2009) สายพันธุ์ก่อโรคที่สำคัญ ได้แก่ *S. tyiphi, S. paratyphi, S. enteritidis* และ *S. typhimurium* ซึ่งก่อให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์ ไข้พาราไทฟอยด์ และโรคทางเดินอาหารของคนและสัตว์

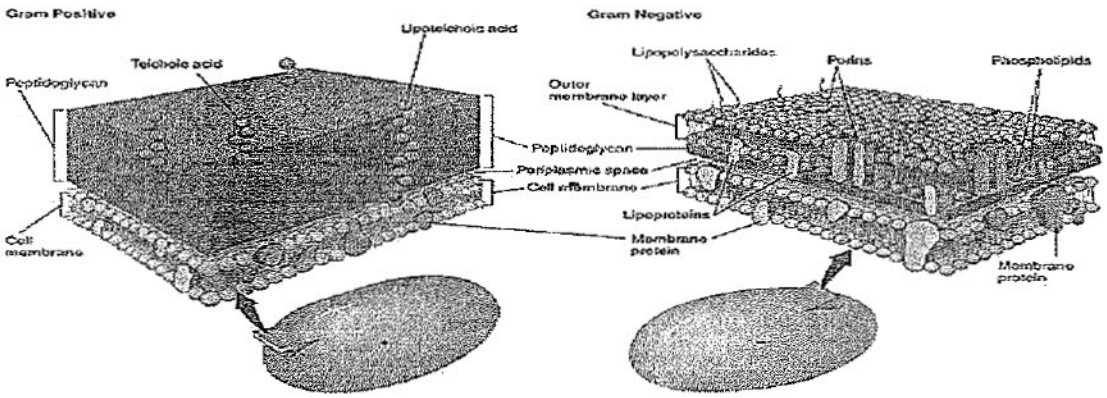
จากการรวบรวมเอกสารงานวิจัย พบว่าสะระแหน่มีสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ โดยน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita* สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แกรมลบ เช่น *E. coli*, *S. enteritidis* และ *S. aureus* (Tassou.et al., 2000; Saeed et al., 2006) Mohsenzadeh (2007) ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita* ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในหลอดทดลอง พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* โดยน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (broad spectrum) ถึงแม้ว่ากลไกในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ยังไม่เด่นชัด แต่กลไกหลักๆ คือ การทำลายผนังเซลล์จุลินทรีย์ (Ouwehand et al., 2010) โดยน้ำมันหอมระเหยมีองค์ประกอบทางเคมีที่มีคุณสมบัติละลายได้ดีทั้งในไขมัน และแอลกอฮอล์ โดยจะหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophilic) จับกับผนังเซลล์จุลินทรีย์ หลังจากนั้นสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กจะแทรกซึมเข้าสู่เซลล์ ทำให้โครงสร้างเซลล์เสียสภาพ เกิดการรั่วไหลของประจุโปรตอน และสารเคมีต่างๆ ในเซลล์ เช่น การตกตะกอนโปรตีน และดีเอ็นเอ ทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด (นวลจันทร์ และคณะ, 2548) ได้แสดงไว้ในภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.8 กลไกการทำงานของน้ำมันหอมระเหยในการทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์

ที่มา: Burt (2004)

โครงสร้างผนังเซลล์จุลินทรีย์แกรมบวกและแกรมลบ ได้แสดงไว้ในภาพที่ 2.9 โดยโครงสร้างผนังเซลล์จุลินทรีย์แกรมบวกส่วนใหญ่ ประกอบด้วยชั้นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) (90% ของผนังเซลล์) มีจำนวนชั้นของไลพิดน้อย และไม่มีผนังเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ส่วนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์แกรมลบมีโครงสร้างที่ซับซ้อนมากกว่า โดยชั้นแรกเป็นส่วนของชั้นผนังเซลล์ด้านนอก ประกอบด้วยฟอสโฟไลพิด และไลโปโฟลีแซคคาไรด์ จัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างแบบไฮโดรฟิลิค (hydrophilic) และถัดมาคือชั้นของไลโปโปรตีน และชั้นเปปติโดไกลแคน ด้วยความซับซ้อนของผนังเซลล์จุลินทรีย์แกรมลบทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายได้ยาก แต่ด้วยอนุภาคของน้ำมันหอมระเหยที่มีขนาดเล็ก จึงสามารถแทรกซึมผ่านผนังเซลล์ และสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้



ภาพที่ 2.9 โครงสร้างผนังเซลล์ของจุลินทรีย์แกรมบวกและแกรมลบ

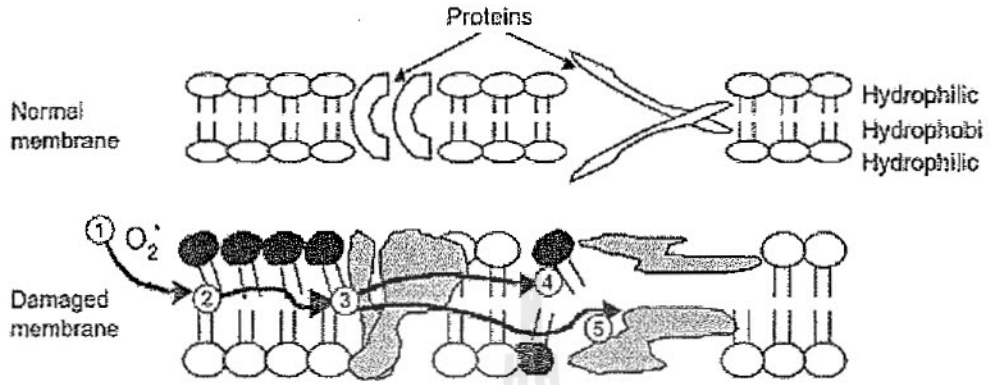
ที่มา: http://52070145.exteen.com

2.7.2 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

การเลี้ยงไก่เนื้อเชิงการค้าในปัจจุบันมีปัจจัยต่างๆ มากมายที่ทำให้ไก่เกิดความเครียด ซึ่งสภาวะที่สัตว์เครียด สัตว์จะต้องการพลังงานสูงขึ้นเพื่อนำไปใช้ในการลดความเครียด เมื่อพลังงานที่ถูกสร้างขึ้นยิ่งสูง ยิ่งส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระมากขึ้น การสร้างพลังงานจะใช้ออกซิเจนจากไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนเพื่อสร้างพลังงาน (ATP) อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นในกระบวนการสร้างพลังงานจะถูกจับกับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลออกซิเจนที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา เรียกว่า reactive oxygen species (ROS) (วัลลภ และคณะ, 2548) สารอนุมูลอิสระเหล่านี้ เช่น superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$), peroxyl radical ($ROO^{\bullet}$) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามอนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นเองภายในร่างกายไม่ว่าจะเป็นกระบวนการสร้างพลังงาน กระบวนการหายใจ การเจริญเติบโตของเซลล์ ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการฆ่าเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาว และระบบส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ (signal transduction) (นันท์นภัส, 2551)

สารอนุมูลอิสระ (free radical) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ อยู่ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุด โมเลกุลจะไม่เสถียร และเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารอื่นๆ เพื่อรับอิเล็กตรอนเพื่อทำให้โมเลกุลมีความเสถียร ส่วนโมเลกุลที่สูญเสียอิเลคตรอนไปจะเกิดสภาพที่ไม่เสถียรขึ้นอีก ทำให้ต้องดึงอิเลคตรอนจากโมเลกุลข้างเคียงต่อไป ทำให้เกิดเป็นปฏิกิริยาแบบลูกโซ่ (ภาพที่ 2.10) ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบลูกโซ่ของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว อนุมูลอิสระ 1 อนุมูล สามารถทำให้เกิดออกซิเดชันของไขมันเป็นหลายร้อยโมเลกุลก่อนที่จะสิ้นสุดปฏิกิริยา เนื่องจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันสามารถเกิดได้ง่ายกับกรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งส่วนใหญ่เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างผนังเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลง ส่งผลเสียต่อการทำงานของเอนไซม์และรีเซพเตอร์ที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ โดยผลผลิตที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) ได้แก่ สารไฮโดรคาร์บอน เช่น อีเทน อีทีน เพนเทน สารคีโตน และสารอัลดีไฮด์ เป็นต้น ซึ่งสารอัลดีไฮด์ที่สำคัญ คือ มาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde) อย่างไรแล้วปริมาณของอนุมูลอิสระในร่างกายจะถูกควบคุมโดยสารต้านออกซิเดชัน แต่หากร่างกายมีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินไปจนทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidation stress) สารชีวโมเลกุลในเซลล์ เช่น สารดีเอ็นเอ โปรตีน และไขมัน จะถูกทำลาย เซลล์ได้รับความเสียหาย มีผลกระทบต่อการทำงานของร่างกาย ก่อให้เกิดโรคต่างๆ ในมนุษย์ เช่น โรคระบบหลอดเลือดและหัวใจ โรคมะเร็ง และอัลไซเมอร์ เป็นต้น (วัลลภ และคณะ, 2548) สำหรับสัตว์ส่งผลให้สัตว์อ่อนแอ ระบบภูมิคุ้มกันโรคทำงานบกพร่อง ง่ายต่อการเกิดโรค เช่น โรคบวมน้ำ (edema disease) หรือโรคท้องมาน (ascites syndrome) (Gramzow and Holthausen, 2002) แต่อย่างไรก็ตามร่างกายยังมีกลไกการสร้าง และกำจัดอนุมูลอิสระให้อยู่ในสภาวะสมดุลได้ โดยอาศัยสารต้าน

อนุมูลอิสระ ซึ่งมีอยู่ 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ไม่ใช่เอ็นไซม์ ได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี สารบีตาแคโรทีน และกลุ่มที่เป็นเอ็นไซม์ได้แก่ กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเทส (superoxide dismutase) และคะตาเลส (catalase) (นวลจันทร์ และคณะ, 2548)



ภาพที่ 2.10 กระบวนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ

ที่มา: Gramzow and Holthausen (2002)

สารกำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging) หรือสารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่ทำหน้าที่ยับยั้ง หรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย ซึ่งกลไกการต้านอนุมูลอิสระ คือ เป็นสารที่ให้หรือรับอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระ ทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่สิ้นสุดลง โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะไม่เกิดปฏิกิริยาต่อไป เป็นสารที่มีความคงตัวจึงไม่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นอีก โดยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ แบ่งออกเป็น 2 กลไก คือ ฤทธิ์ป้องกันและฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งฤทธิ์ป้องกันอนุมูลอิสระนี้ออกฤทธิ์ไม่ให้เกิดอนุมูลตั้งแต่เริ่มต้น ได้แก่ กลุ่มที่เป็นเอ็นไซม์ เช่น กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมูเทส ส่วนฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระจะออกฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ขั้นเริ่มต้น (chain initiation) และทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ในขั้นเติมจำนวนอนุมูลอิสระ (chain propagation) สารกลุ่มนี้ คือ วิตามินอี วิตามินซี ยูบิควิโนน แคโนทีนอยด์ ฟีนอล และฟลาโวนอยด์ (วัลลภ และคณะ, 2548) ที่อยู่ในผัก ผลไม้ และพืชสมุนไพรหลายชนิดที่เป็นแหล่งของน้ำมันหอมระเหย เช่น กานพลู ตะไคร้ ขมิ้น และสะระแหน่ เป็นต้น (นวลจันทร์ และคณะ, 2548) จากการรวบรวมเอกสาร พบว่าสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่ มีส่วนประกอบของสารประกอบฟีนอล ซึ่งทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระระหว่างการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ในขั้นตอนแรก และขั้นตอนของการเพิ่มจำนวนของอนุมูลอิสระในการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกไซด์ของไขมัน แต่อย่างไรก็ตามความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระนั้นขึ้นอยู่กับจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) ซึ่งวิธีการหลักๆ ที่นิยมที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูล มี 2 วิธีการ คือ 1) thiobarbituric acid reactive substances

(TBARS) ซึ่งจะบ่งบอกถึงปริมาณการเกิดการปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ผลผลิตที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน คือ สารมาลอนไดอัลดีไฮด์ โดยเมื่อเติมกรดไทโอบาร์บิทูริก (thiobarbituric acid) ในสภาวะกรด สาร MDA จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริก ได้เป็นสารมีสีชมพู เรียกว่า TBARS เมื่อเติมสารสกัดทดสอบที่มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ความเข้มข้นของสารสีชมพูจะจางลง ดังแสดงในภาพที่ 2.11 2) จากการวัดค่าความคงตัวของสารอนุมูลอิสระ 2, 2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยอาศัยหลักการที่สารต้านอนุมูลอิสระสามารถเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไฮโดรเจนให้กับสารอนุมูลอิสระ DPPH ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสีม่วงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ได้แสดงไว้ในภาพที่ 2.12

TBA + MDA ⟶ TBARS (สารสีชมพู)

ภาพที่ 2.11 การเกิดปฏิกิริยาของ Thiobarbituric acid reactive substances

DPPH + RH ⟶ DPPHH + $R^{\bullet}$

(สารสีม่วง) (สารสีเหลือง)

ภาพที่ 2.12 ปฏิกิริยาการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา: Ancerewicz et al. (1998)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.7.3 ผลของการเสริมสะระแหน่บดแห้งต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต และลักษณะซากของไก่เนื้อ

ผลการเสริมสะระแหน่บดแห้งต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.4 Nobakht et al. (2011) รายงานว่าการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita*บดแห้งในอาหารไก่เนื้อที่ระดับ 0.25, 1.0, 1.5 และ 2.0% สามารถเพิ่มน้ำหนักตัว และประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวของไก่เนื้อ ที่อายุ 42 วัน ($p<0.05$) สอดคล้องกับการทดลองของ Al-Ankari et al. (2004) ศึกษาการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. longifolia* บดแห้งในอาหารไก่เนื้อที่ระดับ 0.25, 1.0, 1.5 และ 2.0% พบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งที่ระดับ 1.5% สามารถเพิ่มน้ำหนักตัว และอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันของไก่เนื้อที่อายุ 21 และ 28 วัน และประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวของไก่เนื้อที่อายุ 35 วัน ($p<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ocak et al. (2008) ศึกษาการเสริมสะระแหน่ (*M. piperita*) และไทม์บดแห้ง พบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งที่ระดับ 0.2% สามารถเพิ่มน้ำหนักตัวในช่วงอายุ 21 และ 35 วัน แต่ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตด้านอื่นๆ ของไก่เนื้อที่อายุ 42 วัน สำหรับผลของสะระแหน่ต่อลักษณะซาก ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.5 จากรายงานของ Nobakht et al. (2011) พบว่าสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita* บดแห้งทุกระดับไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ซาก แต่พบว่าสามารถเพิ่มน้ำหนักเนื้ออกของไก่เนื้อที่อายุ 42 วัน ($p<0.05$) และ Al-kassie et al. (2009) พบว่าสะระแหน่สายพันธุ์ *M. pulegium* บดแห้งทุกระดับสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ซาก โดยเฉพาะการเสริมที่ระดับ 0.5% สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ซากและลดน้ำหนักของตับได้ จากข้อมูลเอกสารงานวิจัย พบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งสามารถเพิ่มน้ำหนักตัว และประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวของไก่เนื้อ แต่อย่างไรก็ตามการเสริมสะระแหน่ในอาหารให้ผลดีในบางช่วงอายุเท่านั้น ซึ่งผลดังกล่าวยังไม่ชัดเจนและสอดคล้องกันเมื่อเสริมตลอดช่วงอายุการเลี้ยง (0-42 วัน) อาจเนื่องจากสะระแหน่ที่ใช้มีความแตกต่างกันด้านสายพันธุ์ และไม่มีการกำหนดระดับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ในแต่ละระดับที่เสริมสะระแหน่บดแห้ง สำหรับเป็นมาตรฐานของการกำหนดระดับของสารออกฤทธิ์ในการศึกษาครั้งต่อไป

ตารางที่ 2.4 ผลของการเสริมสะระแหน่บดแห้งต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ

Reference	Treatments	Age (days)	BW gain (g/bird)	ADG (g/d)	FI (g/bird/d)	FCR
Al-Ankari et al. (2004)	Control	0-7	116	11	-	-
	0.25% Peppermint		117	12	-	-
	1.00% Peppermint		119	12	-	-
	1.50% Peppermint		116	11	-	-
	2.00% Peppermint		113	11	-	-
	Control	0-14	281	18	-	-
	0.25% Peppermint		282	18	-	-
	1.00% Peppermint		287	18	-	-
	1.50% Peppermint		292	18	-	-
	2.00% Peppermint		278	17	-	-
	Control	0-21	509^{ab}	22^{ab}	-	-
	0.25% Peppermint		509^{ab}	22^{ab}	-	-
	1.00% Peppermint		508^{ab}	22^{ab}	-	-
	1.50% Peppermint		521^{a}	23^{a}	-	-
	2.00% Peppermint		484^{b}	21^{b}	-	-
	Control	0-28	880	30^{b}	-	-
	0.25% Peppermint		889	30^{b}	-	-
	1.00% Peppermint		934	32^{ab}	-	-
	1.50% Peppermint		964	33^{a}	-	-
	2.00% Peppermint		866	30^{c}	-	-
	Control	0-35	1,290^{b}	36^{c}	85^{bc}	2.38^{ab}
	0.25% Peppermint		1,364^{b}	38^{b}	85^{bc}	2.23^{bc}
	1.00% Peppermint		1,362^{b}	38^{b}	87^{b}	2.29^{b}
	1.50% Peppermint		1,489^{a}	41^{a}	83^{c}	2.00^{c}
	2.00% Peppermint		1,316^{ab}	37^{bc}	89^{a}	2.44^{a}

หมายเหตุ: $^{a, b, c}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) - ไม่มีข้อมูลแสดง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.4 ผลของการเสริมสะระแหน่บดแห้งต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ (ต่อ)

References	Treatments	Age (days)	BW gain (g/bird)	FI (g/bird)	FCR
Ocak et al. (2008)	Control	7–21	503[a]	761	1.51
	0.2% Peppermint		540[b]	869	1.62
	0.2% Thyme		519[ab]	823	1.58
	SEM[1/]		4.54	28.97	0.133
	Control	7-35	1,299[a]	2,306	1.70
	0.2% Peppermint		1,366[b]	2,476	1.82
	0.2% Thyme		1,329[ab]	2,355	1.76
	SEM[1/]		11.06	38.68	0.076
	Control	7-42	1,875	3,485	1.86
	0.2% Peppermint		1,895	3,540	1.87
	0.2% Thyme		1,898	3,388	1.78
	SEM[1/]		16.07	40.23	0.057
Nobakht et al. (2011)	Control	0-42[2/]	38.82[b]	75.54	1.95[a]
	0.25% Peppermint		46.24[a]	79.24	1.71[b]
	1.00% Peppermint		43.74[a]	76.84	1.76[b]
	1.50% Peppermint		45.53[a]	80.06	1.76[b]
	2.00% Peppermint		43.77[a]	75.67	1.73[b]
	SEM[1/]		1.09	1.63	0.02

หมายเหตุ: [a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), [1/]SEM=standard error of mean, [2/](g/bird/d)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.5 ผลของการเสริมสะระแหน่บดแห้งต่อลักษณะซากของไก่เนื้อ

References	Treatment	Carcass trait (%)						
		Carcass	Thigh	Breast	Gizzard	Liver	Heart	Fat[3/]
Al-kassie et al. (2009)	Control	[2/]72.1±1.94[c]	-	-	2.7±0.06	3.2±1.11[a]	0.63±0.05	-
	0.25%	74.2±1.82[b]	-	-	2.8±0.06	2.8±0.09[b]	0.58±0.04	-
	0.50%	76.8±1.62[a]	-	-	2.7±0.07	2.9±0.09[b]	0.62±0.03	-
	1.00%	75.4±1.91[ab]	-	-	2.8±0.05	2.6±0.07[b]	0.66±0.04	-
	1.50%	74.7±2.17[b]	-	-	2.7±0.05	2.7±0.08[b]	0.67±0.05	-
Nobakht et al. (2011)	Control	70.56	26.54[ab]	29.04[b]	3.92	3.74	-	3.65
	0.25%	70.82	25.89[bc]	33.16[a]	3.34	3.14	-	2.89
	1.00%	72.04	25.43[c]	33.29[a]	3.29	2.93	-	3.74
	1.50%	70.79	26.96[ab]	31.74[a]	3.88	3.28	-	3.25
	2.00%	72.32	27.24[a]	31.61[a]	3.79	3.42	-	2.96
	SEM[1/]	0.84	0.34	0.68	0.19	0.21	-	0.28

หมายเหตุ: [a, b, c] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), [1/]SEM= standard error of mean, [2/]Mean±sd, [3/]ไขมันช่องท้อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 การศึกษาคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ การต้านอนุมูลอิสระ และการผลิตแอมโมเนียในมูลของไก่เนื้อ

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ลักษณะซาก การต้านอนุมูลอิสระ การผลิตแอมโมเนีย และการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ

3.1 การทดลองที่ 1: การศึกษาคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

เป็นการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิด คือ *E. coli, S. aureus* และ *S. typhimurium* ใช้น้ำมันหอมระเหยที่สกัดโดยวิธีการต่างๆ คือ 1) การสกัดด้วยน้ำและไอน้ำ (water and steam extraction) 2) การสกัดด้วย 3เมทานอล:1เอทานอล (3methanol:1ethanol extraction) 3) การสกัดด้วยน้ำ (hydro extraction) และ 4) การสกัดด้วยเอทานอล (ethanol extraction) นอกจากนี้ยังทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคกับน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่ที่ขายในทางการค้าด้วย

3.1.1 การเตรียมสะระแหน่

ใช้สะระแหน่ไทยสายพันธุ์ *M. cordifolia* ที่ได้จากตลาดสุรนคร และสวนของเกษตรกรในจังหวัดนครราชสีมา ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์-มิถุนายน 2553 สะระแหน่มีอายุการเก็บเกี่ยวอย่างน้อย 1 เดือน โดยมีระยะการตัดแต่ละครั้งห่างกันประมาณ 2-3 สัปดาห์ ซึ่งตัดส่วนที่อยู่เหนือดินทั้งหมด ประกอบด้วยส่วนของใบ และลำต้น ล้างให้สะอาดก่อนทำการสกัดน้ำมันหอมระเหย

3.1.2 การสกัดน้ำมันหอมระเหย

วิธีสกัดน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่ทั้ง 4 วิธี คือ 1) การสกัดด้วยน้ำและไอน้ำ 2) การสกัดด้วย 3เมทานอล:1เอทานอล 3) การสกัดด้วยน้ำ และ 4) การสกัดด้วยเอทานอล แต่ละวิธีใช้เวลาในการสกัดอย่างน้อย 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส น้ำมันที่ได้จากการสกัดจะนำไประเหยน้ำ หรือสารละลายออก ด้วยเครื่อง rotary evaporator เก็บน้ำมันที่ได้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารออกฤทธิ์ต่อไป

3.1.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia*

นำน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่ที่สกัดได้จากทั้ง 4 วิธีการ วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารเมนทอล ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทรกราฟฟี (gas chromatography) (Hewlett-Packard Model 6850, USA) ด้วยเทคนิค flame ionization detectors (FID) ด้วยคอลัมน์ HP-Innowax (ยาว 30 ไมโครเมตร ID ยาว 320 ไมโครเมตร หนา 0.25 ไมโครเมตร) และใช้โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้ ตั้งอุณหภูมิ oven เริ่มต้นที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 220 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียส/นาที เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ injector 250 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ detector 280 องศาเซลเซียส อัตราส่วนการปล่อย 50:1 ใช้ก๊าซฮีเลียม (helium) เป็น carrier gas ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตร/นาที ปริมาณตัวอย่างที่ฉีด 1 ไมโครลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐานเมนทอลที่ความเข้มข้น 1% ในสารละลายเอทานอล ดัดแปลงวิธีการจาก Gulluce et al. (2007) การแยกสารประกอบเมนทอลในน้ำมันหอมระเหยทำการเปรียบเทียบ retention time ของพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ระหว่างสารตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐานสารเมนทอล สัดส่วนของสารประกอบเมนทอล จะทำการคำนวณ และแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีแก๊สโครมาโทรกราฟฟีแมสเปกโตรมิทรี (gas chromatography - mass spectrometry) (Hewlett-Packard Model 5890-Hewlett-Packard 5972) เพื่อวิเคราะห์จำนวนและชนิดของสารออกฤทธิ์ ด้วยเทคนิค electron ionization (EI) ใช้คอลัมน์ HP-Innowax (ยาว 30 ไมโครเมตร ID ยาว 320 ไมโครเมตร หนา 0.25 ไมโครเมตร) และใช้โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้ อุณหภูมิ Oven เริ่มต้นที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 260 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 3 องศาเซลเซียส/นาที เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ inlet 270 องศาเซลเซียส เครื่อง scan 25-550 amu อัตราส่วนการปล่อยสาร 35:1 ปริมาณสารที่ฉีด 1 ไมโครลิตร ดัดแปลงวิธีการจาก Gulluce et al. (2007)

3.1.4 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิดที่ใช้ทดสอบ ประกอบด้วยเชื้อ *S. aureus* TISIR 517 และ *S. typhimurium* TISIR 292 ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จุลินทรีย์เชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้จากห้องปฏิบัติการอาหาร อาคารเครื่องมือ 3 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยกล้าเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะบรรจุอยู่ในหลอดบรรจุเชื้อ ทำการเพาะเชื้อโดยถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดจากหลอดเชื้อ ลงในอาหารชนิดเหลว (nutrient broth) จากนั้นนำไปบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการแยกโคโลนีแบบเดี่ยว นำเชื้อมา 1 ลูป ถ่ายเชื้อลงในหลอดโดยการลากหรือขีด (streak) ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดเอียง (slant culture) Nutrient agar (NA), Mac-CONKEY agar (MCK agar) และ Xylose-Lysine Deoxycholate agar (XLD agar) ตามลำดับ นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากได้เชื้อบริสุทธิ์ทำการหามวล (cell mass) ของจุลินทรีย์โดยการวัดความขุ่นของเชื้อ (turbidity) โดยนำเชื้อมา 1 ลูป จากหลอดอาหารชนิดเอียงถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวของเชื้อแต่ละชนิด จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ครบเวลานำไปวัดความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ที่คลื่นความยาว 625 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าที่ได้กับสารละลายมาตรฐาน 0.5 McFarland (ปริมาณเชื้อ 10^8 cfu /มิลลิลิตร) เพื่อใช้สำหรับใช้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (antibacterial test) ต่อไป

วิธีทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สามารถทำได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยมีวิธีหลักปฏิบัติอยู่ 3 รูปแบบ คือ 1) disc diffusion (DD) และ 2) minimum inhibitory concentrations (MIC) 3) minimum bactericidal concentration (MBC) ดัดแปลงตามวิธีของ Eteghad et al. (2009)

3.1.5 Disc diffusion (DD)

เป็นการตรวจกรองฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยเบื้องต้น บอกผลในเชิงคุณภาพว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางจากบริเวณโซนใสของการยับยั้ง (clear zone inhibition) ทำการทดสอบน้ำมันหอมระเหยเพียงความเข้มข้นเดียวโดยมีวิธีการดังนี้ เมื่อวัดความขุ่นของเชื้อเพื่อให้ได้จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับการทดสอบที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 cfu /มิลลิลิตร หลังจากนั้นดูดเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *S. typhimurium* ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดบนอาหารแล้วใช้แท่งแก้วรูปตัว L เกลี่ยให้เชื้อกระจายบนจานเพาะเลี้ยง (spread plate) ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MCK, NA และ XLD agar ตามลำดับ หลังจากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ในแต่ละวิธี ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษตาปลาที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รอจนน้ำมันหอมระเหยซึมผ่านกระดาษก่อนคว่ำจานเพาะเลี้ยง

เชื้อ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบันทึกค่าจากการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

3.1.6 Minimum inhibitory concentrations (MIC)

เป็นวิธีการหาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยการเจือจางน้ำมันหอมระเหยด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ให้มีความเข้มข้นลดลงทุก 2 เท่า ไปเรื่อยๆ ดังนี้ น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำและไอน้ำ ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ระดับ 100-6.25 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร การสกัดด้วยสารละลาย 3เมทานอล:1เอทานอล ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ระดับ 250-7.8125 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร การสกัดด้วยน้ำ และเอทานอล ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ระดับ 1,000-125 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร สำหรับน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์เชิงการค้า (*M. piperita*) ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ระดับ 250-7.8125 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร เป็นกลุ่มควบคุมปริมาตรสุดท้ายที่อยู่ในหลอดเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นดูดเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *S. typhimurium* ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดใส่ในทุกหลอด และเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกในหลอดที่มีความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยต่ำสุดที่ไม่สามารถมองเห็นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

3.1.7 Minimum bactericidal concentration (MBC)

เป็นวิธีการหาความเข้มข้นต่ำสุดจากน้ำมันหอมระเหยที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบต่อเนื่องจากค่า MIC ในหัวข้อ 3.1.6 ดูดสารละลายของเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *S. typhimurium* ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MCK, NA และ XLD agar ตามลำดับ โดยใช้แท่งแก้วรูปตัว L เขี่ยเชื้อให้กระจายทั่วจานอาหารเพาะเลี้ยง นำไปบ่มไว้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

3.2 การทดลองที่ 2: การศึกษาผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ การต้านอนุมูลอิสระ และการผลิตแอมโมเนียในมูลของไก่เนื้อ

เพื่อศึกษาผลการเสริมสะระแหน่บดแห้งที่ระดับต่างๆ ต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ การต้านอนุมูลอิสระ และการผลิตแอมโมเนียในมูลของไก่เนื้อ จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในเบื้องต้น (การทดลองที่ 1) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค แต่พบว่าปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้มีปริมาณค่อนข้างต่ำ อีกทั้งการสกัดอาจมีผลในการเพิ่มต้นทุนการผลิต ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ปรับเปลี่ยนเสริมในรูปสะระแหน่บดแห้ง แทนการเสริมในรูปของน้ำมันหอมระเหย โดยหากได้ผลดีน่าจะสามารถใช้เป็นความรู้พื้นฐานเพื่อนำไปต่อยอดประยุกต์ใช้ในรูปแบบอื่นๆ ต่อไปได้ แต่อย่างไรก็ตามการเสริมสะระแหน่ในรูปบดแห้งอาจเป็นการเพิ่มปริมาณเยื่อใยในสูตรอาหาร ซึ่งส่งผลกระทบต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ ในขณะเดียวกันเยื่อใยดังกล่าวอาจสามารถลดการผลิตแอมโมเนียในมูล ซึ่งส่งผลดีต่อสภาพแวดล้อม ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการวัดแอมโมเนียในมูลด้วย

3.2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้ไก่เนื้อเพศผู้ สายพันธุ์การค้าอาร์เบอร์ เอเคอร์ (Arbor Acers) อายุ 1 วัน เลี้ยงจนถึงอายุ 15 วัน ชั่งน้ำหนักทุกตัวและหาค่าเฉลี่ยของฝูง จากนั้นสุ่มไก่จำนวน 45 ตัว ขึ้นกรงแบบขังเดี่ยว ทำการเลี้ยงบนกรงจนถึงอายุ 20 วัน เพื่อให้ไก่ได้ปรับตัวให้ชินกับสภาพแวดล้อมบนกรง เมื่ออายุ 21 วัน นับเป็นวันที่ 1 ของการทดลอง น้ำหนักไก่เฉลี่ย 652±63 กรัม ทำการจัดกลุ่มทดลองออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 9 ซ้ำ ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ซึ่งไก่ในแต่ละกลุ่มทดลองมีน้ำหนักตัวใกล้เคียงกัน ไก่ได้รับอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 10 วัน และทำการเก็บมูลในช่วง 4 วันสุดท้ายของการทดลอง (วันที่ 28-31) ซึ่งในระหว่างการทดลองไก่ได้รับน้ำ และอาหารอย่างเต็มที่ (*ad libitum*)

3.2.2 การเตรียมอาหารทดลอง

สะระแหน่ที่ใช้ในการทดลองได้จากตลาดสุรนคร จังหวัดนครราชสีมา ในเดือนกุมภาพันธ์-มีนาคม 2554 นำสะระแหน่มาล้างทำความสะอาด และอบแห้งในตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำสะระแหน่ที่ผ่านการอบแห้งแล้วมาบดให้มีขนาด 1.0 มิลลิเมตร และเก็บที่ไว้อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาคุณภาพสีของใบพืช สารออกฤทธิ์ และป้องกันการเกิดเชื้อรา ก่อนนำไปประกอบสูตรอาหารทดลองได้ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีตามวิธีการของ AOAC (1990) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.1 จากผลการวิเคราะห์

พบว่าสะระแหน่โปรตีนค่าสูงถึง 25% แต่ทั้งนี้ไม่ได้นำเอาค่าดังกล่าวมาคิดในการประกอบสูตรอาหารทดลอง เนื่องจากไม่สามารถจำแนกได้ว่าโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในสะระแหน่สามารถใช้ประโยชน์ได้จริงเป็นสัดส่วนเท่าใด โดยกลุ่มอาหารทดลองที่ใช้แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ประกอบด้วย

สูตรที่ 1: สูตรอาหารควบคุม

สูตรที่ 2: อาหารควบคุมเสริมสะระแหน่บดแห้งในระดับที่ 0.5%

สูตรที่ 3: อาหารควบคุมเสริมสะระแหน่บดแห้งในระดับที่ 1.0%

สูตรที่ 4: อาหารควบคุมเสริมสะระแหน่บดแห้งในระดับที่ 1.5%

สูตรที่ 5: อาหารควบคุมเสริมสะระแหน่บดแห้งในระดับที่ 2.0%

อาหารทั้งหมดคำนวณให้มีระดับของโปรตีน และพลังงานเท่ากัน ตามคำแนะนำของ NRC (1994) โดยส่วนผสมของวัตถุดิบอาหารสัตว์ และโภชนะในอาหารแสดงไว้ในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบทางเคมีของโภชนะในสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* (as fed basis)

Nutrients	%
Dry matter	92.12
Crude protein	25.00[1/]
Crude fiber	14.60
Ether extract	2.40
Ash	11.00

หมายเหตุ [1/] ค่าโปรตีนในสะระแหน่ไม่ได้นำมาคำนวณสูตรอาหารทดลอง เนื่องจากโปรตีนดังกล่าวอาจไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้จริง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของวัตถุดิบและโภชนะของสูตรอาหารทดลอง (การทดลองที่ 2)

		M. cordifolia supplementation (%)			
Ingredients (%)	Control	0.5	1.0	1.5	2.0
Corn	47.70	49.31	48.91	48.52	48.11
Soybean meal	30.58	30.64	30.71	30.77	30.85
Cassava starch	2.00	1.50	1.00	0.50	0.00
Fish meal	5.50	5.50	5.50	5.50	5.50
Full-fat soybean	5.59	5.59	5.59	5.59	5.59
Soybean oil	3.58	3.91	4.24	4.57	4.90
M. cordifolia Opiz.	0.00	0.50	1.00	1.50	2.00
NaCl	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36
DL-Methionine	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29
$CaCO_3$	1.15	1.15	1.14	1.14	1.41
Ca_2PO_4	0.75	0.75	0.76	0.76	0.76
premix[1/]	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Total	100	100	100	100	100
Calculated composition (%)					
ME, kcal/ kg	3,100	3,100	3,100	3,100	3,100
Met + Cys	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Lysine	1.13	1.13	1.13	1.13	1.14
Available P	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
Analyzed composition (%)					
Dry matter	90.03	90.51	90.59	90.64	90.93
Crude protein	21.53	21.19	21.68	21.62	22.16
Fiber	3.00	3.64	4.12	4.93	4.30
Ether extract	4.85	5.10	5.12	5.42	5.02
Calcium	0.9	1.0	1.1	1.1	1.2
Total P	0.7	0.8	0.8	0.9	0.9

หมายเหตุ: [1/]ในอาหาร 1 กิโลกรัมประกอบด้วย Vitamin A, 15,000 IU; Vitamin D_3, 3,000 IU; Vitamin E, 25 IU; Vitamin K_3, 5 mg; Vitamin B_1, 2.5 mg; Vitamin B_2, 2.7 mg Vitamin B_6, 4.5 mg; Vitamin B_{12}, 25 µg; Pantothenic acid, 35 mg; Folic acid, 0.5 mg; Biotin, 25 µg; Nicotinic acid, 35 mg; Choline chloride, 250 mg; Mn, 60 mg; Zn, 45 mg; Fe, 80 mg; Cu, 1.6 mg; I, 0.4 mg; Se, 0.15 mg.

3.2.3 การเก็บข้อมูล

3.2.3.1 การใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ

ทำการเก็บมูลทั้งหมด (total collection) ที่ไก่ขับออกมาในรอบหนึ่งวัน โดยเก็บมูลวันละ 1 ครั้ง เวลา 7.00 น. ในช่วง 4 วันสุดท้ายของการทดลอง เก็บมูลจากถาดพลาสติกที่รองไว้ใต้กรงพร้อมกับสเปรย์มูลที่ได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5% เพื่อป้องการการสูญเสียไนโตรเจน จากนั้นนำมูลของไก่แต่ละตัวที่ได้ในแต่ละวันไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นำมาบดใส่ถุงและเก็บเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในห้องปฏิบัติการต่อไป

ปัจจัยที่ศึกษาคำนวณจากสูตร

การย่อยได้ของสิ่งแห้ง = {(น้ำหนักอาหารที่กิน - น้ำหนักมูล)/ น้ำหนักอาหารที่กิน} x 100

% การย่อยได้ของโภชนะ = {((น้ำหนักอาหารที่กิน x % โภชนะในอาหาร) - (น้ำหนักมูล x % โภชนะในมูล))/ (น้ำหนักอาหารที่กิน x % โภชนะในอาหาร)} x 100

หมายเหตุ: น้ำหนักอาหารและมูลอยู่ในรูปน้ำหนักแห้ง

3.2.3.2 การผลิตแอมโมเนีย

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ไก่อายุ 31 วัน) ทำการเก็บมูลสดของไก่ทุกตัว ประมาณ 10 - 20 กรัม เพื่อนำไปวิเคราะห์หาแอมโมเนีย ตามวิธีการของ Willis et al. (1996)

3.2.3.3 การต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการเจาะเลือดไก่ทุกตัวบริเวณปีก (wing vein) ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 23 ความยาว 1/2 นิ้ว ในหลอดไม่ใส่สารป้องกันการแข็งตัว นำเลือดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บซีรัมไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการต่อไป

3.2.3.4 วิธีการวัดค่า Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)

นำตัวอย่างซีรัมที่ได้จากหัวข้อ 3.2.3.3 เพื่อวัดค่าการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน โดยวัดจากค่าความเข้มข้นของ thiobarbituric acid reactives ในซีรัม ตามวิธีการของนวลจันทร์ และคณะ (2548) ซึ่งดัดแปลงมาจาก Asakawa and Matsushita (1980) และ Uchiyama and Mihara (1978) และ Pakdeechote et al. (2011) โดยวิธีการวิเคราะห์ใช้ซีรัมจำนวน 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) 2.2% กับ EDTA 0.5 มิลลิลิตร และ sodium dodecylsulfate (SDS) 0.8% จากนั้นให้ทำปฏิกิริยา thiobarbituric acid (TBA) 0.2% ในน้ำเดือดเป็นเวลา 60 นาที ทิ้งไว้ในเย็นในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่

4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสข้างบนปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 plate well นำไปวัดค่าความเข้มข้นของ thiobarbituric acid reactives ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ผลผลิตที่เกิดจากปฏิกิริยานี้ ที่นิยมวัดคือ MDA โดยอ่านค่าความเข้มข้นของสาร MDA จากกราฟมาตรฐานของสารละลาย 1,1,3,3 tetraethoxypropane ค่าความเข้มข้นที่ได้จะแสดงในรูป nmol MDA/ml โดยใช้ molar coefficient ของ MDA เท่ากับ $1.56 \times 10^5 M^{-1}cm^{-1}$ อ้างอิงจาก Arshad et al. (2011) และ Bhutia et al. (2006)

$$\text{MDA (nmol/ml)} = \frac{((A_{sample} - A_{blank}) \times \text{Total sample volume})}{0.000156 \times 1000 \text{ (ml)}}$$

หมายเหตุ: A_{sample} คือ ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง A_{blank} คือค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย TBA

3.2.3.5 วิธีการวัดค่า 2, 2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

ตัวอย่างซีรัมที่ได้จากหัวข้อ 3.2.3.3 เพื่อตัดสินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ตามวิธีการของ Ancerawicz et al. (1998) และ Tepe et al. (2005) ซึ่งสามารถเคลื่อนย้ายไฮโดรเจนอะตอมให้กับสารอนุมูลอิสระ 2, 2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยใช้ซีรัม 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH 0.04 มิลลิโมลาร์ เตรียมในสารละลายเมทานอล โดยใช้ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที สารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ซึ่งสามารถวัดค่าการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH ตามสมการข้างล่างนี้ และนำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย 4-Methyl-2,6-di-t-butyl-phenol (BHT) เพื่อหาความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ แสดงในค่า EC_{50} (EC_{50}= concentration to decrease concentration of test free radical 50%) ค่า EC_{50} ต่ำ แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี ตามวิธีการของ Teixeira et al. (2012)

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{blank} - A_{sample}) / A_{blank})] \times 100$$

หมายเหตุ: A_{blank} คือค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH A_{sample} คือค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH + ตัวอย่าง

3.3 การทดลองที่ 3: การศึกษาผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ลักษณะซาก การต้านอนุมูลอิสระ การผลิตแอมโมเนีย และการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อขยายผลของสะระแหน่บดแห้งในการนำไปเสริมในอาหารไก่เนื้อ ตลอดช่วงอายุการเลี้ยง (0-42 วัน) โดยศึกษาผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ลักษณะซาก การต้านอนุมูลอิสระ การผลิตแอมโมเนีย และการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ โดยมีการเสริมสะระแหน่บดแห้งเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 คือ ที่ระดับ 0.5-2% เนื่องจากพบว่าที่ระดับการเสริมดังกล่าวไม่มีผลกระทบต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ นอกจากนี้ยังได้ทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เสริมยาปฏิชีวนะด้วย

3.3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้ไก่เนื้อเพศผู้ สายพันธุ์การค้าอาร์เบอร์ เอเคอร์ (Arbor Acer) อายุ 1 วัน น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 50±2 กรัม จำนวน 480 ตัว ทำการแบ่งไก่ออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 4 ซ้ำๆ ละ 20 ตัว ใช้แผนการทดลองแบบ CRD ไก่แต่ละหน่วยทดลองมีน้ำหนักใกล้เคียงกัน ปล่อยเลี้ยงบนพื้นคอกใช้แกลบเป็นวัสดุรองพื้น กกไก่โดยใช้หลอดไฟให้ความอบอุ่นเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ไก่ได้รับอาหารและน้ำแบบเต็มที่ (*ad libitum*) รวมทั้งได้รับวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลและโรคหลอดลมอักเสบติดต่อที่อายุ 7 วัน และวัคซีนป้องกันโรคกัมโบโรที่อายุ 14 วัน

3.3.2 การเตรียมอาหารทดลอง

การเตรียมสะระแหน่ และหาองค์ประกอบของโภชนะในสะระแหน่ ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อที่ 3.2.2 ในการทดลองที่ 2 โดยกลุ่มอาหารทดลองแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ประกอบด้วย

สูตรที่ 1: อาหารควบคุม

สูตรที่ 2: อาหารควบคุมเสริม chlortetracycline ที่ระดับ 5 ppm

สูตรที่ 3: อาหารควบคุมเสริมสะระแหน่บดแห้งในระดับที่ 0.5%

สูตรที่ 4: อาหารควบคุมเสริมสะระแหน่บดแห้งในระดับที่ 1.0%

สูตรที่ 5: อาหารควบคุมเสริมสะระแหน่บดแห้งในระดับที่ 1.5%

สูตรที่ 6: อาหารควบคุมเสริมสะระแหน่บดแห้งในระดับที่ 2.0%

อาหารทดลองทุกสูตรคำนวณให้มีระดับโภชนะเพียงพอกับความต้องการของไก่ในแต่ละช่วงอายุ (0-21 และ 22-42 วัน) ตามคำแนะนำของ NRC (1994) องค์ประกอบของโภชนะในอาหารทดลอง ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.3 และ 3.4

3.3.3 การเก็บข้อมูล

3.3.3.1 สมรรถนะการเจริญเติบโต

ทำการบันทึกน้ำหนักตัว และปริมาณอาหารที่กินของไก่เนื้อทุกสัปดาห์ เพื่อนำค่าดังกล่าวไปคำนวณหาประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (FCR) รวมถึงบันทึกอัตราการตายทุกครั้งที่มีไก่ตาย และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ตาย ดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพการผลิตไก่เนื้อโดยรวม (Gonzales et al., 2003)

1. เปอร์เซ็นต์ตาย (%)

$$= \frac{\text{จำนวนไก่ตาย (ตัว)} - \text{จำนวนไก่ทั้งหมด (ตัว)}}{\text{จำนวนไก่ทั้งหมด (ตัว)}} \times 100$$

2. ดัชนีประสิทธิภาพการผลิตไก่เนื้อโดยรวม (production index, PI)

$$= \frac{\text{เปอร์เซ็นต์เลี้ยงรอด (\%)} \times \text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กก.)}}{\text{อายุ (วัน)} \times \text{ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ}} \times 100$$

3.3.3.2 การเก็บตัวอย่างเมื่อไก่ที่อายุ 21 และ 42 วัน

โดยสุ่มไก่ที่มีน้ำหนักใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยของฝูง 2 ตัว/ซ้ำ ไม่ต้องอดอาหาร จากนั้นเจาะเลือด ซึ่งวิธีการทำเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.2.3.3 (การทดลองที่ 2) เพื่อวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ และเก็บลำไส้ส่วนซีกัม เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ

3.3.3.3 การต้านอนุมูลอิสระ

3.3.3.3.1 วิธีการวัดค่า Thiobarbituric acid reactive substance

นำตัวอย่างซีรัมของไก่เนื้อที่อายุ 21 และ 42 วัน มาทำการวิเคราะห์ ซึ่งมีวิธีการทำเช่นเดียวกันกับ 3.2.3.3 ในการทดลองที่ 2

3.3.3.3.2 วิธีการวัดค่า 2, 2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

นำตัวอย่างซีรัมของไก่เนื้อที่อายุ 21 และ 42 วัน มาทำการวิเคราะห์ ซึ่งมีวิธีการทำเช่นเดียวกันกับ 3.2.3.4 ในการทดลองที่ 2

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของวัตถุดิบและโภชนะในสูตรอาหารทดลองไก่เนื้อระยะแรก อายุ 0-21 วัน (การทดลองที่ 3)

			M. cordifolia supplementation (%)			
Ingredients (%)	Control	CTC	0.5	1.0	1.5	2.0
Corn	49.70	49.70	49.31	48.91	48.52	48.11
Soybean meal	30.58	30.58	30.64	30.71	30.77	31.85
Cassava starch	2.00	2.00	1.50	1.00	0.50	0.00
Fish meal	5.50	5.50	5.50	5.50	5.50	5.50
Full-fat soybean	5.59	5.59	5.59	5.59	5.59	5.59
Soybean oil	3.58	3.58	3.91	4.24	4.57	4.90
M. cordifolia	0.00	0.00	0.50	1.00	1.50	2.00
CTC[1/]	0.00	0.005	0.00	0.00	0.00	0.00
NaCl	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36
DL-Methionine	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29
$CaCO_3$	1.15	1.15	1.15	1.14	1.14	1.14
Ca_2PO_4	0.75	0.75	0.75	0.76	0.76	0.76
Premix[2/]	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Total	100	100	100	100	100	100
Calculated composition (%)						
ME, kcal/kg	3,100	3,100	3,100	3,100	3,100	3,100
Met + Cys	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Lysine	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	1.14
Available P	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
Analyzed composition (%)						
Dry matter	90.03	90.60	90.51	90.51	90.64	90.93
Crude protein	22.20	22.28	22.10	22.53	22.99	22.31
Fiber	3.87	3.88	3.92	4.00	4.01	4.04
Ether extract	5.38	6.17	6.13	6.83	7.67	7.62
Calcium	0.9	0.9	1.1	1.1	1.1	1.1
Total P	0.7	0.7	0.8	0.8	0.9	0.9

หมายเหตุ: [1/]CTC=Chlortetracycline [2/] ในอาหาร 1 กิโลกรัมประกอบด้วย Vitamin A, 15,000 IU; Vitamin D_3, 3,000 IU; Vitamin E, 25 IU; VitaminK_3, 5 mg; Vitamin B_1, 2.5 mg; Vitamin B_2, 2.7 mg Vitamin B_6, 4.5 mg; Vitamin B_{12}, 25 µg; Pantothenic acid, 35 mg; Folic acid, 0.5 mg; Biotin, 25 µg; Nicotinic acid, 35 mg; Choline chloride, 250 mg; Mn, 60 mg; Zn, 45 mg; Fe, 80 mg; Cu, 1.6 mg; I, 0.4 mg; Se, 0.15 mg

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบของวัตถุดิบและโภชนะในสูตรอาหารทดลองไก่เนื้อระยะสุดท้าย อายุ 22-42 วัน (การทดลองที่ 3)

			M. cordifolia supplementation (%)			
Ingredients (%)	Control	CTC	0.5	1.0	1.5	2.0
Corn	52.17	52.17	52.32	51.93	51.51	51.11
Soybean meal	32.71	32.71	32.77	32.83	32.90	32.97
Cassava starch	2.00	2.00	1.50	1.00	0.50	0.00
Fish meal	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Full-fat soybean	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Soybean oil	4.05	4.05	4.38	4.71	5.05	5.38
M. cordifolia	0.00	0.00	0.50	1.00	1.50	2.00
CTC[1/]	0.00	0.005	0.00	0.00	0.00	0.00
NaCl	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
DL-Methionine	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
L-Lysine	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
$CaCO_3$	1.43	1.43	1.43	1.43	1.43	1.43
Ca_2PO_4	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05
Premix[2/]	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Total	100	100	100	100	100	100
Calculated composition (%)						
ME, kcal/kg	3,100	3,100	3,100	3,100	3,100	3,100
Met + Cys	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72
Lysine	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Available P	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
Analyzed composition (%)						
Dry matter	90.83	90.06	90.40	90.20	90.37	90.37
Crude protein	20.93	20.15	20.46	20.44	20.41	20.04
Fiber	3.76	3.70	3.80	3.85	3.90	4.00
Ether extract	6.61	6.64	7.92	7.33	6.54	7.71
Calcium	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1	1.2
Total P	0.6	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8

หมายเหตุ: [1/]CTC=Chlortetracycline [2/] ในอาหาร 1 กิโลกรัมประกอบด้วย Vitamin A, 15,000 IU; Vitamin D_3, 3,000 IU; Vitamin E, 25 IU; Vitamin K_3, 5 mg; Vitamin B_1, 2.5 mg; Vitamin B_2, 2.7 mg Vitamin B_6, 4.5 mg; Vitamin B_{12}, 25 µg; Pantothenic acid, 35 mg; Folic acid, 0.5 mg; Biotin, 25 µg; Nicotinic acid, 35 mg; Choline chloride, 250 mg; Mn, 60 mg; Zn, 45 mg; Fe, 80 mg; Cu, 1.6 mg; I, 0.4 mg; Se, 0.15 mg.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3.3.4 การศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ส่วนซีกัม

ไก่เนื้อที่ได้จากหัวข้อ 3.3.3.2 ในการทดลองที่ 3 ทำการสลบเพื่อเก็บตัวอย่าง digesta บริเวณลำไส้ส่วนซีกัมข้างซ้าย สำหรับศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ โดยเก็บ digesta ที่ได้ไว้ในขวดปลอดเชื้อ หลังจากนั้นนำ digesta มาทำการเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.85% เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในแต่ละเชื้อ และเลือกระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมมา 2 ระดับ เพื่อนำไปใช้ในการตรวจนับเชื้อ *E. coli*, *Lactobacilus* spp. และ *Salmonella* spp. คือ ระดับความเข้มข้น 10^{-5}-10^{-6}, 10^{-5}-10^{-6} และ 10-10^{-2} เท่า ตามลำดับ ซึ่งอาหารที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกเฉพาะ (selective medium) เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ต้องการให้เจริญได้เท่านั้น โดยนำตัวอย่างเชื้อมาตรวจนับเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ ดังต่อไปนี้ เชื้อ *E. coli* เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mac-CONKEY-Agar (MCK agar) เชื้อ *Lactobacillus* spp. เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacillus MRS Broth (MRS Broth) และเชื้อ *Salmonella* spp. เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose-Lysine Deoxycholate Agar (XLD agar)

3.3.3.5 ปริมาณแอมโมเนีย

นำ digesta จากลำไส้บริเวณซีกัมข้างขวา จากหัวข้อ 3.3.4.3 ในการทดลองที่ 3 ใส่ในขวดปลอดเชื้อปิดฝาให้มิดชิด นำไปไล่ออกซิเจนออก และเก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับรอการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียต่อไป ตามวิธีการของ Willis et al. (1996)

3.3.3.6 ลักษณะซาก

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (อายุ 42 วัน) สุ่มไก่ที่มีน้ำหนักที่ใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยของฝูง 2 ตัว/ซ้ำ อดอาหารเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักมีชีวิต จากนั้นฆ่าโดยทำการเชือดบริเวณเส้นเลือดใหญ่ที่คอ (jugular vein) นำซากไก่ไปถอนขนด้วยเครื่องถอนขนอัตโนมัติ และเอาอวัยวะภายในออก บันทึกน้ำหนักของอวัยวะภายใน ได้แก่ กึ๋น ตับ หัวใจ ม้าม ไขมันเกาะอวัยวะ (visceral fat) ไขมันช่องท้อง (abdominal fat) และต่อมเบอร์ซ่า รวมถึงชั่งน้ำหนัก และวัดความยาวของลำไส้ส่วนดูโอดีนัม (duodenum) เจจูนัม (jejunum) และไอเลียม (ileum) หลังจากนั้นนำซากแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกลักษณะซากหลังแช่เย็น รวมทั้งทำการตัดแยกชิ้นส่วนซาก ตัดแยกกล้ามเนื้ออกและกล้ามเนื้อสะโพก ข้อมูลที่ได้นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ซาก และอวัยวะภายใน การคำนวณน้ำหนักของซากส่วนต่าง ๆ จะคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักมีชีวิต ดังสมการข้างล่าง

เปอร์เซ็นต์ซาก (%) = (น้ำหนักของซาก/น้ำหนักไก่มีชีวิต) x 100

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองที่ 1 นำข้อมูลที่ได้จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการ disc diffusion, MIC และ MBC หาค่าเฉลี่ย

การทดลองที่ 2 นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี Analysis of variance (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ CRD และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีทเมนต์ ด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test

การทดลองที่ 3 ข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี Analysis of variance (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีทเมนต์ ด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์ ที่ระดับต่างๆ ด้วยวิธี Orthogonal contrast โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (1996)

3.5 สถานที่ทำการทดลอง

งานสัตว์ปีก และงานพืช ฟาร์มมหาวิทยาลัย และอาคารเครื่องมือ 3 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.6 ระยะเวลาทำการทดลอง

การทดลองที่ 1 เริ่มทำการทดลองช่วงเดือนกุมภาพันธุ์ - มิถุนายน 2553

การทดลองที่ 2 เริ่มทำการทดลอง 6 มีนาคม - 6 เมษายน 2554

การทดลองที่3 เริ่มทำการทดลอง 2 เดือนมิถุนายน - 14 กรกฎาคม 2554

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1: ผลของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

4.1.1 ปริมาณและชนิดของสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia*

ผลผลิตน้ำมันหอมระเหย ปริมาณสารเมนทอล และลักษณะของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ที่สกัดด้วยวิธีการต่างๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.1 โดยพบว่าปริมาณสารเมนทอลในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยวิธี 3เมทานอล:1เอทานอล สกัดด้วยน้ำ และสกัดด้วยเอทานอล มีค่าเท่ากับ 0.1, 0.5 และ 0.3% ตามลำดับ แต่ไม่พบสารเมนทอลจากวิธีการสกัดด้วยน้ำและไอน้ำ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยจากวิธีการสกัดดังกล่าวไปตรวจหาสารออกฤทธิ์ด้วยเครื่อง GC-MS พบว่ามีสารออกฤทธิ์ทั้งหมด 44 ชนิด ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.2 โดยสารออกฤทธิ์ที่พบปริมาณมาก คือ สารคาร์วีออล (carveol I) 13.76% เบนซีนเมทานอล (benzenemethanol) 8.11% เบต้าบอโบนีน (β-bourbonene) 5.74% ไฟทอล (phytol) 4.92% ไพเพอริทีโนน (piperitenone) 3.54% ยูจีนอล (eugenol) 3.55% และไพเพอริทีโนนออกไซด์ 3.14% เป็นต้น ซึ่งสารออกฤทธิ์หลักๆ ในสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* มีความแตกต่างจากสะระแหน่สายพันธุ์อื่นๆ โดยพบว่าสะระแหน่สายพันธุ์ *M. spicata* (spear mint) มีสารคาร์โวนเป็นสารออกฤทธิ์หลัก 45-70% (Chauhau et al., 2009; Chowdhury et al., 2007) สะระแหน่สายพันธุ์ *M. pulenium* มีสารพูลีโกนเป็นสารออกฤทธิ์หลัก 61.11% (Hajlaoui et al., 2008) และสายพันธุ์ *M. piperita* มีสารเมนทอลเป็นสารออกฤทธิ์หลัก 73% (Rajeswara Rao, 1999) นอกจากนี้ยังพบว่าสารเมนทอลเป็นสารออกฤทธิ์หลักในสะระแหน่สายพันธุ์ *M. longlifolia* และ *M. rotunifolia* เช่นกัน (Hajlaoui et al., 2008; Sokovic et al., 2009; Hajlaoui et al., 2010) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์สะระแหน่ที่แตกต่างกันส่งผลต่อชนิดของสารออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาของ Lupien et al. (1995) พบว่าจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์และเปลี่ยนเป็นสารเมนทอลในสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita* เกิดขึ้นโดยกระบวนทางชีวเคมี โดยการเติมหมู่ไฮดรอกซิลให้กับโครงสร้างสารในคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (C3 allytic hydroxylation) แตกต่างกับสะระแหน่สายพันธุ์ *M. spicata* จุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์และเปลี่ยนเป็นสารคาร์โวน คือ การเติมหมู่ไฮดรอกซิลให้กับโครงสร้างของสารในคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 (C6 allytic hydroxylation) โดยทุกกระบวนการสังเคราะห์สารโมโนเทอร์ปีนในสะระแหน่เกิดจากการทำงานร่วมกันของเอ็นไซม์ต่างๆ ซึ่งมีลักษณะเป็นแกรนูล กระจายตัวอยู่

บริเวณเนื้อเยื่อของใบ แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ น้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยน้ำและไอน้ำไม่พบสารเมนทอล รวมทั้งยังมีปริมาณผลผลิตน้ำมันหอมระเหยต่ำ มีค่าเท่ากับ 0.01% จากการศึกษาพบว่าการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita*, *M. arvensis* และ *M. spicata* มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 0.1-1.5 และ 1-2% ตามลำดับ จะเห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* มีปริมาณที่ค่อนข้างน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับสะระแหน่สายพันธุ์อื่นๆ ชี้ให้เห็นว่าวิธีการสกัด และสายพันธุ์มีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ และผลผลิตน้ำมันหอมระเหย ซึ่งรวมถึงปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ พื้นที่เพาะปลูก ลักษณะทางภูมิอากาศ ฤดูการเก็บเกี่ยว ส่วนของพืชที่ใช้ และสารละลายที่ใช้สกัด (วันชัย และคณะ, 2547; Lee et al., 2004; Rizzo et al., 2008; Brenes and Roura, 2010)

ตารางที่ 4.1 ผลผลิตน้ำมันหอมระเหย ปริมาณสารเมนทอล และลักษณะของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ที่สกัดด้วยวิธีการต่างๆ (การทดลองที่ 1)

Extraction methods	Yield (%)	Menthol (%)	Oil characteristics
Water and steam	0.01	-	yellowish brown
3methanol:1ethanol	0.01	0.1	yellowish green, strict[1/]
Hydro	1.33	0.5	brown
Ethanol	1.00	0.3	brown

หมายเหตุ: [1/]เมื่อใช้สารละลายสองชนิดผสมกัน สารสกัดที่ได้มีลักษณะเหนียวหนืด และมีสีเขียวเข้ม
- ตรวจไม่พบสารเมนทอล

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.2 ชนิดและปริมาณสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ที่สกัดด้วยน้ำและไอน้ำ วิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่อง GC-MS (การทดลองที่ 1)

Compounds	Retention time (min)	% Oil components
t-Murolol	47.24	0.53
Hexadecanoic acid	48.42	1.10
11-Hexadecanoic acid	49.14	0.31
β-Damascenone	35.44	0.43
Naphthalene	35.76	1.45
14-Norcadin-5-en-4-one	49.81	0.39
Heptadecanoic acid	51.45	2.86
4-Bromo-2-chlorphenol	51.73	0.46
Octa Decanoic acid	54.30	0.63
9,12,15-Octadecatrienoic acid	57.89	0.45
l-Limonene	10.49	1.96
1,8-Cineole	10.73	0.71
Phytol	58.79	4.92
Eicosanoic acid	59.43	0.47
11-Eicosanoic acid	60.32	0.84
13-Docosenoic acid	65.37	0.88
3-Octanol	19.00	0.77
Benzene	20.73	1.48
Dihydroedulan II	22.74	0.76
z-3-Hexenyl pentanoate	23.05	0.40
β-Bourbonene	23.99	5.74
4-Acetyl-1-metylcyclohexene	25.38	0.16
Linalool	25.54	0.84
3-Cyclohexene-1-ol	27.41	2.29
Dihydrocarvone	28.15	0.17
EPI-Bicyclosesquiphellandrene	30.02	0.63

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.2 ชนิดและปริมาณของสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ที่สกัดด้วยน้ำและไอน้ำ วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC-MS (การทดลองที่ 1) (ต่อ)

Compounds	Retention time (min)	Oil components (%)
delta-Cadinene	33.23	3.18
Ethanone	33.77	0.42
trans-β-Farnesene	30.46	2.24
Germacrene D	31.69	2.96
2-Cyclohexen-1-one	34.99	1.96
Thymol	47.55	1.33
Carveol I	36.24	13.76
Benzenemethanol	36.71	8.19
cis-Carveol	37.21	2.53
Piperitenone	38.81	3.54
Piperitenone oxide	40.02	3.14
4-Vinyl-2-methoxy-phenol	47.70	0.41
Eugenol	46.83	3.55

4.1.2 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion (DD)

ผลของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เมื่อทดสอบด้วยวิธี DD ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.3 พบว่าการสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีใช้น้ำ และไอน้ำ สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ ซึ่งการยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *S. aureus* และ *S. typhimurium* โดยวัดจากเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสของการยับยั้ง มีค่าเท่ากับ 9.67±0.35, 11.67±0.66 และ 18.0±1.15 มิลลิเมตร ตามลำดับ การสกัดด้วยสารละลาย 3เมทานอล:1เอทานอล ค่ามีเท่ากับ 9.00±0.05, 8.3±0.35, 19.0±0.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ในขณะเดียวกันการสกัดด้วยน้ำ และเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* ได้เพียงชนิดเดียว ซึ่งเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใสของการยับยั้ง มีค่าเท่ากับ 8.67±0.66 และ 8.67±0.35 มิลลิเมตร ตามลำดับ ชี้ให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordiifolia* มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แบบกว้าง สามารถยับยั้งได้ทั้งเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวก และแกรมลบ อย่างไรก็ตามหากเปรียบเทียบผลดังกล่าวกับน้ำมันหอมระเหยทางการค้า ซึ่งเป็นน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita* พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้สูง

กว่าสายพันธุ์ *M. cordiifolia* จากการรวบรวมเอกสารงานวิจัยพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *M. piperita*, *M. spicata, M. aquatica, M. longifolia* และ *M. rotundifolia* มีฤทธิ์แบบกว้างสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อราได้ โดย Al-Bayati (2009) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita* สามารถยังยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* และ *C. albicans* สอดคล้องกับการทดลองของ Kizil et al. (2010) พบว่าสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita* และ *M. spicata* สามารถยับยั้งเชื้อ *E.coli*, *S. aureus*, *Streptococcus* pyogenes และ *C. albicans* และจากการทดลองของ Sharafi et al. (2010) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita* สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus faecalis* และ *Klebsiella pneumoniae* จากผลการทดลองนี้พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยน้ำและไอน้ำมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก วิธีการสกัดด้วยน้ำและไอน้ำนั้น จะใช้ไอน้ำเป็นตัวพาน้ำมันหอมระเหยออกจากโครงสร้างพืช โดยอุณหภูมิของไอน้ำที่สัมผัสกับใบพืชมีอุณหภูมิไม่สูงเกินไป จึงสามารถลดการระเหยของสารออกฤทธิ์ ทำให้น้ำมันหอมระเหยที่ได้มีคุณภาพดี สำหรับการสกัดด้วย 3เมทานอล:1เอทานอล และการสกัดด้วยเอทานอล สารสกัดที่ได้มีสีเขียวและมีลักษณะเหนียวหนืด ทั้งนี้อาจเพราะสารละลายดังกล่าวสามารถสกัดสีเว็กซ์ (wax) ที่อยู่ในโครงสร้างของพืช และสารประกอบมีขั้วทั้งหมด ดังนั้นถึงแม้วิธีการดังกล่าวจะสกัดน้ำมันหอมระเหยได้ปริมาณมาก แต่พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคต่ำ ส่วนวิธีการสกัดด้วยน้ำ วิธีการนี้ใบพืชจะสัมผัสกับน้ำโดยตรง โดยอุณหภูมิของน้ำใช้ที่คือ 100 องศาเซลเซียส อาจมีผลต่อในการทำลายพันธะและเพิ่มการระเหยของสารออกฤทธิ์ ทั้งนี้เพราะน้ำมันหอมระเหยมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ทำให้ระเหยได้ง่าย ซึ่งชี้ให้เห็นได้ว่าวิธีการสกัดและสารละลายที่ใช้สกัด มีผลต่อชนิดของสารออกฤทธิ์และปริมาณผลผลิตน้ำมันหอมระเหย รวมถึงผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้แตกต่างกันด้วย

ตารางที่ 4.3 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion (การทดลองที่ 1)

	Disc diffusion (Mean inhibition of zone, mm)		
Extraction methods	*E. coli*	*S. aureus*	*S. typhimurium*
Water and steam	9.67±0.35[1/]	11.67±0.66	18.0±1.15
3Methanol:1ethanol	9.00±0.05	8.3±0.35	19.0±0.00
Hydro	8.67±0.35	-	-
Ethanol	8.67±0.66	-	-
Commercial oil[2/]	29.00±0.57	19.3±0.69	20.3±0.88

หมายเหตุ: [1/]Mean ± SD, [2/]*M. piperita,* - ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ

4.1.3 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เมื่อทดสอบด้วยวิธี Minimum inhibitory concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentration (MBC)

ค่า MIC คือปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหย ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับค่า MBC คือปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหย ที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจากตารางที่ 4.4 พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากวิธีการสกัดด้วยน้ำและไอน้ำ มีค่า MIC และ MBC ต่ำสุดต่อการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *S. typhimurium* เท่ากับ 25, 25 และ 50 และ 50, 100 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยเชิงการค้า ซึ่งมีค่า MIC และ MBC ต่ำสุดต่อเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *S. typhimurium* เท่ากับ 31.25, 31.25, และ 31.25 มิลลิกรัม/มิลลิเมตร และ 62.5, 250 และ 125 มิลลิกรัม/มิลลิเมตร ตามลำดับ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยน้ำและไอน้ำมีประสิทธิภาพสูงกว่าน้ำมันหอมระเหยเชิงการค้า Hajlaoui et al. (2010) ศึกษาสะระแหน่สายพันธุ์ *M. longifolia* พบว่ามีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.19-1.56 มิลลิกรัม/มิลลิเมตร ต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli, S. aureus และ S. typhimurium* จากการรายงานของ Hajlaoui et al. (2008) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก *M. longifolia* ซึ่งมีองค์ประกอบของสารเมนทอล 32.51% เมนโทน 20.7-28.8% และพูลีโกน 7.8-17.8% มีค่า MIC เท่ากับ 0.195-3 x 10^3 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร สามารถยับยั้งจุลินทรีย์และเชื้อราได้ สอดคล้องกับ Mimica-Dukic et al. (2003) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita, M. aquatica* และ *M. longifolia* สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และฆ่าเชื้อรา *Micrococcus flavus* โดยมีค่า MIC ต่ำสุดเท่ากับ 4 ไมโครลิตร/มิลลิเมตร และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (minimal fungicidal concentration, MFC) เท่ากับ 4 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร โดย

สะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita, M. longifolia* และ *M. aquatica* มีสารออกฤทธิ์หลัก คือ สารเมนโทน ไอโซเมนโทน (isomenthone) และคาร์โวน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าปัจจัยด้านชนิดและความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ในสะระแหน่แต่ละสายพันธุ์มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ดังนั้นจะเห็นได้สารออกฤทธิ์ชนิดอื่นๆ สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้เช่นเดียวกับสารเมนทอล แต่อย่างไรก็ตามน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordiifolia* ที่สกัดด้วยน้ำและไอน้ำสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคดีที่สุด จากผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบด้วยวิธีการ DD, MIC และ MBC ให้ผลไม่สอดคล้องกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธีการ DD พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่ที่สกัดด้วยน้ำและไอน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ต่ำกว่าน้ำมันหอมระเหยเชิงการค้า แต่ทดสอบด้วยวิธีการ MIC และ MBC พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดวิธีดังกล่าวค่ามี MIC และ MBC ต่ำสุดในการยับยั้งและฆ่าทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยเชิงการค้า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยน้ำและไอน้ำ มีลักษณะคล้ายน้ำมัน และหนืดเล็กน้อย แต่น้ำมันหอมระเหยเชิงการค้านั้นมีลักษณะเป็นน้ำมันบริสุทธิ์สามารถระเหยได้ง่าย ซึ่งกระบวนการสกัดน้ำมันหอมระเหยในเชิงการค้าน่าจะมีเทคนิควิธีการที่ทันสมัย ส่งผลทำให้น้ำมันหอมระเหยที่ได้มีความบริสุทธิ์ คุณภาพดี และความมีเข้มข้นของสารออกฤทธิ์สำคัญสูง แต่อย่างไรก็ตามด้วยลักษณะการเป็นน้ำมันหอมระเหยบริสุทธิ์มีความสามารถในการระเหยได้สูง อัตราการระเหยเกิดได้เร็วเมื่อสัมผัสกับออกซิเจน และความร้อนจากสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.4 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เมื่อทดสอบด้วยวิธี Minimum inhibition concentration และ Minimum bactericidal concentration (การทดลองที่ 1)

Extraction methods	Broth dilution test	Microorganisms /Dilution (mg/ml)		
		E. coli	*S. aureus*	*S. typhimurium*
Water and steam	MIC	25	25	50
	MBC	50	100	100
3Methanol:1ethanol	MIC	62.5	125	31.25
	MBC	125	250	500
Hydro	MIC	1,000	1,000	1,000
	MBC	>1,000	>1,000	>1,000
Ethanol	MIC	500	500	500
	MBC	1,000	>1,000	>1,000
Commercial oil[1]	MIC	31.25	31.25	31.25
	MBC	62.5	250	125

หมายเหตุ: [1] *M. piperita*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 การทดลองที่ 2: ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ การต้านอนุมูลอิสระ และการผลิตแอมโมเนียในมูลของไก่เนื้อ

4.2.1 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ และการผลิตแอมโมเนียในมูลของไก่เนื้ออายุ 28-31 วัน

ผลของการเสริมสะระแหน่บดแห้งในอาหารที่ระดับ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% ต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ แสดงไว้ในตารางที่ 4.5 พบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งทุกระดับไม่มีผลกระทบต่อการใช้ประโยชน์ได้ของวัตถุแห้ง เถ้า สารอินทรีย์ โปรตีน และเยื่อใย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p>0.05$) ชี้ให้เห็นว่าเยื่อใยที่เป็นองค์ประกอบในสะระแหน่ไม่ส่งผลในการขัดขวางการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ ถึงแม้ว่าเยื่อใยที่เป็นองค์ประกอบในสะระแหน่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเยื่อใยที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble fiber) ซึ่งไม่สามารถย่อยได้โดยเอ็นไซม์จากสัตว์ โดยระดับของเยื่อใยในสูตรอาหารที่สูงเกินไป จะส่งผลกระทบต่อการย่อยและใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ หรือเป็นสารต้านการใช้โภชนะ (Jozefiak et al., 2004) แต่อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยในสูตรอาหารทดลอง พบว่าอาหารทดลองที่เสริมสะระแหน่บดแห้งทุกสูตร (0.5-2%) มีเยื่อใยในระดับที่ต่ำกว่า 5%

ผลของการเสริมสะระแหน่บดแห้งต่อปริมาณแอมโมเนียในมูลของไก่เนื้อ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.6 โดยการเสริมสะระแหน่บดแห้งในอาหารทุกระดับ สามารถลดปริมาณแอมโมเนียในมูลของไก่เนื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) ได้ จากการรวบรวมเอกสาร พบว่า การเสริมเยื่อใยในอาหารเป็นอีกวิธีการหนึ่งในลดการผลิตแอมโมเนียของไก่เนื้อ Roberts et al. (2007) ศึกษาการเสริมเยื่อใยจาก DDGS ที่ได้จากข้าวโพด 10.0% ผลพลอยได้จากการสกัดแป้งสาลี (wheat middling) 7.3% และเปลือกถั่วเหลือง (soybean hulls) 4.8% ในอาหารไก่ไข่ พบว่าเยื่อใยจากแหล่งดังกล่าวข้างต้น สามารถลดการผลิตแอมโมเนียในมูลของไก่ไข่ได้ Metzler and Mosenthin (2008) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเยื่อใยและประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของสุกร พบว่าเยื่อใยมีผลในการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของลำไส้ และกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ เช่น *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacteria* จากการใช้เทคนิคทางพันธุกรรมตรวจสอบสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กบริเวณไอเลียม จุลินทรีย์กลุ่มหลักๆ ที่พบ คือ *Lactobacillus* spp. และ *Pediococcus* spp. ดังนั้นเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ในตระกูลของ *Lactobacillus* spp เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักๆ ที่หมักย่อยเยื่อใย โดยผลผลิตที่เกิดขึ้น คือ กรดไขมันระเหยได้ (short chain fatty acids, SCFA) แอมโมเนีย คาร์บอนไดอ็อกไซด์ และมีเทน ซึ่งความเป็นกรดของ SCFA

จะช่วยลด pH ในลำไส้ และดักจับแอมโมเนีย ทำให้การผลิตแอมโมเนียสู่สิ่งแวดล้อมลดลง (Roberts et al., 2006) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Salmonella* spp. และ *E. coli* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ผลิตแอมโมเนีย โดย SCFA จะทำลายผนังเซลล์จุลินทรีย์ก่อโรค โดยการเคลื่อนย้ายประจุโปรตรอนเข้าสู่เซลล์ ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ก่อโรคตาย แต่ในขณะเดียวกันไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ เช่น *Lactobacillus* spp. (Jozefiak et al., 2004; Dunkley et al., 2009)

การลดการผลิตแอมโมเนียในไก่ที่ได้รับการเสริมสะระแหน่ นอกจากจะเป็นผลจากการหมักย่อยของเยื่อใยแล้ว ยังอาจเป็นผลจากสารประกอบฟีโนลิคในสะระแหน่ ซึ่งสารประกอบดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นกรด ส่งผลให้ลำไส้มีสภาวะเป็นกรดมากขึ้น ซึ่งสภาพการเป็นกรดจะช่วยดักจับแอมโมเนียที่ผลิตในบริเวณลำไส้ส่วนซีกัม และเปลี่ยนรูปแอมโมเนียให้อยู่ในสภาพที่เป็นกลาง คือ เปลี่ยนจากแอมโมเนีย (NH_3) เป็นแอมโมเนียม (NH_4^+) เป็นผลให้แอมโมเนียลดลง

ตารางที่ 4.5 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะในไก่เนื้ออายุ 28-31วัน (การทดลองที่ 2)

Treatments	Nutrient utilization (%)				
	DM	OM	Ash	CF	CP[2/]
Control	73.92	76.82	29.85	72.75	59.83
0.5% Peppermint	70.97	74.92	22.84	72.01	55.99
1.0% Peppermint	72.18	75.82	28.06	77.04	58.00
1.5% Peppermint	70.16	74.02	20.85	72.93	57.11
2.0% Peppermint	72.16	76.79	28.47	75.72	58.13
Pooled SEM[1/]	2.90	2.57	13.61	3.88	10.17
P-value	0.127	0.154	0.620	0.146	0.968

หมายเหตุ: [1/]SEM = standard error mean (n=9), [2/]CP = Crude protein utilization

ตารางที่ 4.6 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการผลิตแอมโมเนียในมูลของไก่เนื้ออายุ 31 วัน (การทดลองที่ 2)

Treatments	Excreta (g/100g of DM)
Control	7.79[a]
0.5% Peppermint	4.70[b]
1.0% Peppermint	5.89[b]
1.5% Peppermint	5.75[b]
2.0% Peppermint	4.56[b]
Pooled SEM[1/]	1.27
P-value	0.001

หมายเหตุ: [a, b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), [1/]SEM = standard error of the mean (n=9)

4.2.2 ผลของการเสริมสะระแหน่บดแห้งสายพันธุ์ *M. cordifolia* ต่อการต้านอนุมูลอิสระในซีรัมของไก่เนื้ออายุ 31 วัน

พารามิเตอร์ที่ชี้วัดคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสะระแหน่บดแห้ง วัดได้จากการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในรูปของค่า TBARS และคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งค่าการลดอนุมูลอิสระ DPPH แสดงในรูป EC_{50} (EC_{50}= concentration to decrease concentration of test free radical 50%) จากรายงานของไชยวรรณ และคณะ (2553) พบว่าถ้าค่า EC_{50} มีค่าต่ำกว่า 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี ผลการเสริมสะระแหน่บดแห้งในอาหารที่ระดับต่างๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.7 โดยพบว่าสะระแหน่บดแห้งทุกระดับสามารถลดค่า TBARS ในซีรัมของไก่เนื้อที่อายุ 31 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) แต่ไม่มีผลต่อค่า DPPH ($p>0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในระหว่างทำการทดลองไก่เนื้อถูกเลี้ยงบนกรงแบบขังเดี่ยว ไก่ไม่มีอิสระในการแสดงพฤติกรรมทางกายภาพ หรือการกินอาหาร ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ไก่เกิดความเครียดอยู่ตลอดเวลา ความเครียดจะกระตุ้นให้ร่างกายผลิตสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การเสริมสะระแหน่ให้ผลเด่นชัดในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน จากการรวบรวมเอกสารงานวิจัย พบว่าสะระแหน่มีสารประกอบฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีคุณสมบัติลดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้ กลไกการทำงานของสารประกอบเหล่านี้ คือ ลดการเกิดปฏิกิริยาระหว่างออกซิเจน อนุมูลเปอร์ออกซี และลดคีเลตของเหล็กในเอ็นไซม์ไลพอกซิจิเนส (lipoxygenase enzyme) ซึ่งกลไกนี้จะช่วยป้องกันปฏิกิริยาเหนี่ยวนำเริ่มต้นของปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันโดยเอ็นไซม์ไลพอกซิ

จิเนส เป็นเอ็นไซม์ที่เร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันชนิดไม่อิ่มตัว โมเลกุลของเอ็นไซม์จะมีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ โดยจะทำการดึงไฮโดรเจนออก และเติมออกซิเจนให้กับกรดไขมัน ทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide) ซึ่งสามารถเกิดเป็นอนุมูลอิสระของไขมันต่อไป (เจนจิรา และประสงค์, 2554) แต่การเสริมสะระแหน่ไม่มีผลต่อค่า DPPH เนื่องจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นร่างกายสามารถกำจัด และควบคุมให้อยู่ในสภาวะสมดุลได้ รวมทั้งการทดลองเป็นแค่ช่วงสั้นๆ เพียง 10 วัน จึงทำให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระให้ผลไม่ชัดเจน เพราะความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารฟีโนลิกขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างด้วย (Chrpova et al., 2010) จากการรายงานของ Tachakittirungrod et al. (2007) ได้ศึกษาปริมาณฟีโนลิกในสารสกัดจากสมุนไพรไทย 24 ชนิด ซึ่งสกัดด้วยสารละลายเอทานอล พบว่าปริมาณฟีโนลิกที่อยู่ในใบและลำต้นของสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifoila* มีค่าเท่ากับ 1.84± 0.030 และ 0.364 ±0.006 มิลลิโมล/มิลลิกรัม ตามลำดับ Sharafi et al. (2010) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita* มีปริมาณสารฟีโนลิก เท่ากับ 89.43±0.58 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH มีค่าเท่ากับ 63.82±0.05% จากการรายงานของ Mimica-Dukic et al. (2003) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita, M. aquatica* และ *M. longifolia* สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.53 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และจากการรายงานของ Gulluce et al. (2007) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. longifolia* มีค่า IC_{50} เท่ากับ 57.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งผลการทดลองส่วนใหญ่ที่ได้จากการรวบรวมเอกสารข้างต้น เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของน้ำมันหอมระเหย แต่การทดลองในครั้งนี้เป็นการศึกษาในรูปของสะระแหน่บดแห้ง ซึ่งมีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ค่อนข้างต่ำ จึงเป็นผลทำให้ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระได้ต่ำด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.7 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการต้านอนุมูลอิสระในซีรัมของไก่เนื้ออายุ 31 วัน (การทดลองที่ 2)

Treatments	TBARS (nmol/ml)	DPPH (EC_{50}, µg/ml)
Control	2.49[a]	54.51[ab]
0.5% Peppermint	1.58[b]	51.12[ab]
1.0% Peppermint	1.06[b]	61.73[a]
1.5% Peppermint	1.19[b]	60.55[ab]
2.0% Peppermint	1.12[b]	35.94[b]
Pooled SEM[1/]	0.84	17.57
P-value	0.004	0.069

หมายเหตุ: [a, b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), [1/]SEM = standard error of the mean (n=9)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.3 การทดลองที่ 3: ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต การต้านอนุมูลอิสระ ลักษณะซาก การผลิตแอมโมเนีย และการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ

4.3.1 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้ออายุ 0-42 วัน

ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งในอาหารที่ระดับ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.8 จากการทดลองพบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งทุกระดับในอาหารไก่เนื้ออายุ 0-7 วัน ไม่มีผลกระทบต่อน้ำหนักตัว และประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (FCR) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p>0.05$) โดยการเสริมสะระแหน่บดแห้งที่ระดับ 1.5% สามารถกระตุ้นการกินอาหารได้ แต่ปริมาณการกินอาหารลดลงเมื่อเสริมที่ระดับ 2.0% ส่วนในช่วงอายุ 14-28 วัน พบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งทุกระดับไม่ส่งผลกระทบต่อน้ำหนักตัว ปริมาณอาหารที่กิน และประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว โดยที่อายุ 0-35 วัน พบว่าการเสริมสะระแหน่ที่ระดับ 1.5% และกลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะในอาหาร สามารถเพิ่มน้ำหนักตัว ส่วนปริมาณอาหารที่กิน และประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวมีค่าไม่แตกต่างกันทุกกลุ่มการทดลอง

เมื่อพิจารณาตลอดช่วงอายุการเลี้ยงไก่เนื้อ (0-42 วัน) พบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งทุกระดับไม่ส่งผลกระทบต่อน้ำหนักตัว ปริมาณอาหารที่กิน และประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว และอัตราการตาย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p>0.05$) สอดคล้องกับการทดลองของ Al-ankari et al. (2004) ได้ศึกษาผลการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita* บดแห้งในอาหารที่ระดับ 0.25, 1.0, 1.5 และ 2.0% พบว่าการเสริมที่ระดับ 1.5% สามารถเพิ่มน้ำหนักตัว และอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันของไก่เนื้อที่อายุ 21 และ 28 วัน และมีประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวที่ดีเมื่ออายุ 35 วัน ($p<0.05$) Ocak et al. (2008) ศึกษาผลของการเสริมสะระแหน่ (*M. piperita*) และไทม์บดแห้ง พบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งที่ระดับ 0.2% สามารถเพิ่มน้ำหนักตัวในช่วงอายุ 21 และ 35 วัน แต่ไม่ส่งผลต่อน้ำหนักตัว และประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวของไก่เนื้ออายุ 42 วัน จากการรวบรวมเอกสาร และการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่าการเสริมสะระแหน่ในรูปบดแห้งในอาหารไก่เนื้อไม่มีผลในการกระตุ้นสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อตลอดช่วงอายุการเลี้ยง โดยให้ผลดีต่อน้ำหนักตัวเพียงบางช่วงอายุเท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากความแตกต่างของสายพันธุ์สะระแหน่ และปริมาณสารออกฤทธิ์ อีกทั้งการใช้สะระแหน่บดแห้งยังมีปัจจัยอื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้องที่จะก่อให้เกิดความแปรปรวนขึ้นได้ เช่น ปริมาณ

สารออกฤทธิ์ รูปแบบของการใช้ สายพันธุ์ ระยะเวลาที่ตัด กระบวนการตากแห้ง และส่วนของพืชที่ใช้ อายุพืช เป็นต้น (วันชัย, 2547; Brenes and Roura, 2010)

ตารางที่ 4.8 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้ง ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ (การทดลองที่ 3)

Treatments[2/]	Age (days)	BW gain (g/bird)	FI (g/bird)	FCR	Mortality (%)
Control	0-7	95.6	105.0^{ab}	1.10	-
Chlortetracycline		96.9	98.9^{abc}	1.03	-
0.5% Peppermint		89.3	98.3^{abc}	1.10	-
1.0% Peppermint		85.2	92.9^{bc}	1.10	-
1.5% Peppermint		89.3	106.4^{a}	1.21	-
2.0% Peppermint		84.4	86.8^{c}	1.03	-
Pooled SEM[1/]		7.61	7.89	0.11	-
P-value		0.151	0.021	0.269	-
Control	0-14	367.3	458.1	1.25	-
Chlortetracycline		330.7	412.5	1.25	-
0.5% Peppermint		350.1	439.7	1.26	-
1.0% Peppermint		345.7	442.3	1.28	-
1.5% Peppermint		347.9	471.1	1.37	-
2.0% Peppermint		345.7	429.9	1.24	-
Pooled SEM[1/]		17.61	29.8	0.09	-
P-value		0.169	0.142	0.368	-
Control	0-21	715.4	947.2	1.33	
Chlortetracycline		727.1	861.5	1.19	-
0.5% Peppermint		724.3	900.0	1.24	-
1.0% Peppermint		696.4	869.6	1.25	-
1.5% Peppermint		733.1	957.8	1.31	-
2.0% Peppermint		699.9	847.8	1.21	-
Pooled SEM[1/]		34.23	58.22	0.08	-
P-value		0.583	0.068	0.134	-

หมายเหตุ: $^{a, b, c}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), [1/]SEM = standard error of mean (n=4), [2/]วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์แต่ละระดับด้วยวิธี orthogonal contrast พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จึงไม่แสดงข้อมูล

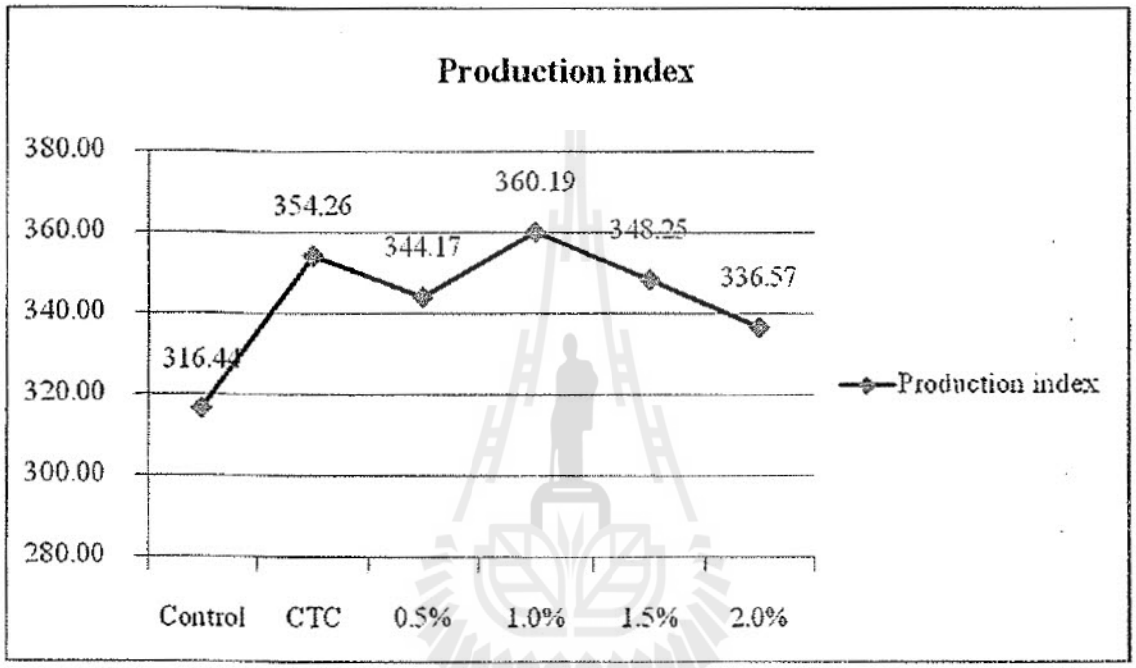
ตารางที่ 4.8 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ (การทดลองที่ 3) (ต่อ)

Treatments[2/]	Age (days)	BW gain (g/bird)	FI (g/bird)	FCR	Mortality (%)
Control	0-28	1,302.3	1,954.0^{ab}	1.50	-
Chlortetracycline		1,274.1	1,885.1^{ab}	1.49	-
0.5% Peppermint		1,298.3	1,939.6^{ab}	1.49	-
1.0% Peppermint		1,254.0	1,830.6^{b}	1.46	-
1.5% Peppermint		1,334.4	2,024.8^{a}	1.52	-
2.0% Peppermint		1,247.0	1,823.6^{b}	1.46	-
Pooled SEM[1/]		52.38	90.05	0.07	-
P-value		0.214	0.039	0.842	-
Control	0-35	1,835.2^{ab}	2,939.0	1.61	-
Chlortetracycline		1,870.0^{a}	2,850.2	1.53	-
0.5% Peppermint		1,811.8^{abc}	3,028.0	1.67	-
1.0% Peppermint		1,720.6^{bc}	2,796.3	1.63	-
1.5% Peppermint		1,904.9^{a}	3,089.8	1.62	-
2.0% Peppermint		1,703.1^{c}	2,803.4	1.65	-
Pooled SEM[1/]		79.47	179.95	0.11	-
P-value		0.011	0.155	0.678	-
Control	0-42	2,380.9	4,072.9	1.71	5.00
Chlortetracycline		2,546.2	3,962.8	1.56	8.75
0.5% Peppermint		2,466.8	4,158.6	1.69	1.25
1.0% Peppermint		2,418.3	3,837.6	1.59	1.25
1.5% Peppermint		2,579.4	4,250.3	1.65	6.25
2.0% Peppermint		2,386.8	3,872.0	1.63	3.75
Pooled SEM[1/]		193.80	221.82	0.11	43.37
P-value		0.615	0.104	0.415	0.164

หมายเหตุ: $^{a, b, c}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), [1/]SEM = standard error of mean (n=4), [2/]วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์แต่ละระดับด้วยวิธี orthogonal contrast พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จึงไม่แสดงข้อมูล

4.3.2 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพการผลิตโดยรวมของไก่เนื้ออายุ 0-42 วัน

ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งในอาหารที่ระดับ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% ต่อค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพการผลิตโดยรวมของไก่เนื้อ (production index, PI) ได้แสดงไว้ในภาพที่ 2.13 พบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งทุกระดับ และกลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะสามารถเพิ่มค่า PI ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$)



ภาพที่ 4.1 การเสริมสะระแหน่บดแห้งต่อดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพการผลิตโดยรวมของไก่เนื้อ

4.3.3 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อลักษณะซาก และอวัยวะภายในของไก่เนื้ออายุ 0-42 วัน

ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งในอาหารที่ระดับ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% ต่อลักษณะซาก และอวัยวะภายในของไก่เนื้อที่อายุ 0-42 วัน ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.9 พบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งทุกระดับไม่มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักซาก กล้ามเนื้ออก สะโพก และอวัยวะภายใน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p>0.05$) แต่สามารถลดไขมันช่องท้องของไก่เนื้อที่อายุ 42 วันได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เสริมยาปฏิชีวนะ ($p<0.05$) ซึ่งเป็นผลโดยตรงจากสมรรถนะการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกันเมื่อเสริมสะระแหน่บดแห้งในอาหาร แต่การเสริมสะระแหน่ให้ผลที่ผลเด่นชัดต่อการลดไขมันช่องท้อง ซึ่งเป็นผลจากเยื่อใยที่เป็นองค์ประกอบในสะระแหน่ โดยเยื่อใยสามารถจับตัวกับน้ำดี ลดการย่อยและดูดซึมของไขมัน และไขมันที่ไม่ถูกย่อย

จะถูกขับออกมาทางมูล เมื่อร่างกายย่อยไขมันครั้งต่อไปต้องดึงคอเลสเตอรอลมาสังเคราะห์ให้เป็นน้ำดีขึ้นมาใหม่ ซึ่งในน้ำดีมีส่วนประกอบของคอเลสเตอรอลด้วย ทำให้คอเลสเตอรอลในเลือดลดลง และช่วยลดการสะสมของไขมันในร่างกายได้ นอกจากนี้ Crowell (1999) รายงานว่าน้ำมันหอมมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ hydroxy-3-methylglutaryl conenzyme coenzyme A (HMG-CoA) reductase ซึ่งเอ็นไซม์ดังกล่าวทำหน้าสำคัญในการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล ซึ่งอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ไขมันในซากของไก่เนื้อลดลง

ผลของการเสริมสะระแหน่บดแห้งในอาหารต่อน้ำหนักและความยาวลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม เจจูนัม และไอเลียม ของไก่เนื้ออายุ 0-42 วัน ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.10 พบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งทุกระดับไม่มีผลในการเพิ่มน้ำหนักของลำไส้เล็ก ส่วนดูโอดีนัม เจจูนัม และไอเลียม และความยาวของลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม และไอเลียม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p>0.05$) แต่พบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งที่ระดับ 0.5% มีแนวโน้มที่ดีต่อการเพิ่มความยาวของลำไส้ส่วนเจจูนัม ซึ่งลำไส้ส่วนนี้เป็นบริเวณที่ทำหน้าที่ย่อย และดูดซึมสารอาหาร โดยความยาวที่เพิ่มขึ้นน่าจะช่วยเพิ่มพื้นที่ย่อยและดูดซึมสารอาหารได้ Khempakaet al. (2009) รายงานเยื่อใยจากกากมันสำปะหลังซึ่งส่วนใหญ่เป็นชนิดไม่ละลายน้ำมีผลต่อการพัฒนาลำไส้ของไก่เนื้อ

ตารางที่ 4.9 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อลักษณะซากและอวัยวะภายในของไก่เนื้ออายุ 0-42 วัน (การทดลองที่ 3)

	Carcass trait (%)						
Treatments	Carcass	Breast	Thigh	Edible inner organs[2/]	Spleen	Bursa	Fat[3/]
Control	68.93	22.45	15.88	5.09	0.27	3.8	1.39[ab]
Chlortetracycline	69.55	22.69	15.70	5.33	0.29	3.00	1.78[a]
0.5% Peppermint	69.11	22.93	14.51	5.96	0.29	2.60	1.17[b]
1.0% Peppermint	69.03	22.00	14.07	5.35	0.27	2.99	1.33[b]
1.5% Peppermint	70.79	23.47	14.79	5.41	0.29	3.55	1.25[b]
2.0% Peppermint	69.05	21.97	15.33	5.21	0.28	2.66	1.12[b]
Pooled SEM[1/]	1.09	1.50	1.11	0.511	0.12	1.85	0.27
P-value	0.186	0.691	0.390	0.280	1.000	0.917	0.032

หมายเหตุ: [a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), [1/]SEM= standard error of mean (n=4) [2/]ตับ+หัวใจ+กึ๋น [3/]ไขมันช่องท้อง

ตารางที่ 4.10 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อน้ำหนักและความยาวลำไส้เล็กของไก่เนื้ออายุ 0-42 วัน (การทดลองที่ 3)

	Weight (% body weight)			Length (cm/100 g of body weight)		
Treatments	Duodenum	Jejunum	Ileum	Duodenum	Jejunum	Ileum
Control	0.71	1.60	1.42	1.71	4.99^{ab}	4.91
Chlortetracycline	0.62	1.58	1.15	1.80	4.90^{ab}	4.75
0.5% Peppermint	0.73	1.72	1.37	1.80	5.36^{a}	5.38
1.0% Peppermint	0.64	1.35	1.24	1.56	4.53^{b}	4.57
1.5% Peppermint	0.74	1.50	1.34	1.82	4.58^{b}	4.82
2.0% Peppermint	0.69	1.54	1.29	1.86	5.03^{ab}	4.58
Pooled SEM[1/]	0.09	0.09	0.14	0.13	0.32	0.47
P-value	0.421	0.091	0.153	0.145	0.016	0.195

หมายเหตุ: $^{a, b}$ ตัวอักษรในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

[1/]SEM= standard error of mean (n=4)

4.3.4 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการต้านอนุมูลอิสระของไก่เนื้ออายุ 21 และ 42 วัน

ผลของการเสริมสะระแหน่บดแห้งในอาหารที่ระดับ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% ต่อการต้านอนุมูลอิสระของไก่เนื้ออายุ 21 และ 42 วัน ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.11 โดยพารามิเตอร์ที่ชี้วัดการต้านอนุมูลอิสระ 2 วิธีการ คือ วัดด้วยวิธี TBARS เป็นวิธีการวัดระดับการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ในขณะที่ค่า DPPH เป็นการวัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระจากสารต้านอนุมูลอิสระ ทั้งสองค่านี้ยิ่งต่ำยิ่งบ่งบอกถึงการต้านอนุมูลอิสระได้ดี จากการทดลองพบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งทุกระดับไม่มีผลลดค่า TBARS ในซีรัมของไก่เนื้ออายุ 21 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p>0.05$) แต่พบว่าเมื่อเสริมสะระแหน่บดแห้งในระดับที่สูงขึ้นตลอดช่วงอายุการเลี้ยง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเสริมสะระแหน่ที่ระดับ 2.0% สามารถลดค่า TBARS ในซีรัมของไก่เนื้ออายุ 42 วันได้ สำหรับคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งทุกระดับไม่ลดค่า DPPH ในซีรัมของไก่เนื้ออายุ 21 วัน แต่มีผลต่อการลดค่า DPPH ในซีรัมไก่เนื้ออายุ 42 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) จากผลการทดลองนี้ จะเห็นได้ว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งไม่มีผลในการลดค่า TBARS และ DPPH ในซีรัมของไก่เนื้อที่อายุ 21 วัน เนื่องจากสภาพแวดล้อมในช่วงดังกล่าว หรือตัวสัตว์เองถูกเลี้ยงภายใต้โรงเรือนแบบปิด มีการควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อไก่ในช่วงอายุต่างๆ ส่งผลให้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจาก

ความเครียดหรือปัจจัยอื่นๆ ยังอยู่ในระดับต่ำ ที่เพียงพอต่อความสามารถของร่างกายสัตว์ในการผลิตสารเพื่อกำจัดสารอนุมูลอิสระให้อยู่ในสภาวะสมดุลได้ แต่อย่างไรก็ตามการเสริมสะระแหน่ทุกระดับสามารถลดค่า DPPH ได้ และเมื่อเสริมในระดับที่สูงขึ้น คือ 2% สามารถลดค่า TBARS ในซีรัมของไก่เนื้อที่อายุ 42 วันได้ด้วย ทั้งนี้เนื่องจากไก่ในช่วงอายุดังกล่าว มีอัตราการเจริญเติบโตสูง โดยเฉพาะไก่เนื้อเพศผู้ซึ่งมีอัตราเมทาบอลิซึมสูงยิ่งทำให้เกิดความเครียดได้ง่าย โดยความเครียดจะไปกระตุ้นให้มีการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติซอล และมีผลในการเพิ่มการเผาผลาญของอาหาร ทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระมากขึ้น คุณสมบัติในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสะระแหน่เป็นผลจากสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และโพลีฟีนอล (polyphenols) ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน สารประกอบเหล่านี้เป็นสารที่สามารถให้อะตอมไฮโดรเจนแก่สารอนุมูลอิสระในระยะเหนี่ยวนำการเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระกับออกซิเจน (initiation) หรือในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของสารอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาแบบลูกโซ่ (propagation) ของไขมันไม่อิ่มตัว ส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ เมื่อผนังเซลล์สูญเสียหน้าที่จะส่งผลเสียต่อสารชีวโมเลกุลอื่นๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และสารพันธุกรรมในร่างกาย เป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคความจำเสื่อม เป็นต้น (เจนจิรา และประสงค์, 2554) Olennikov and Tankhaeva (2010) รายงานว่าสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita* มีสารฟลาโวนอยด์และฟีโนลิก เท่ากับ 3.02-6.32 และ 2.70-5.52% ตามลำดับ สารเหล่านี้ยิ่งมีปริมาณสูงยิ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดย Tachakittirungrod et al. (2007) และ Baliga and Rao (2010) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita, M. longifolia* และ *M. aquatic* สามารถขจัดอนุมูลอิสระได้ โดย Baliga and Rao (2010) ซึ่งได้ศึกษาสารประกอบโพลีฟีโนลิก (polyphenolic) ในน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. piperita* ที่สกัดด้วยน้ำ สารฟีโนลิกที่พบได้แก่สาร eriocitin, luteolin-7-o-rutinoside, diosmin, hesperidin, narirutin, isorhoifolin, rosmarinic และ caffric acid ซึ่งสาร eriocitrin, luteolin-7-o-rutinoside และ rosmarinic มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้สูงกว่าสารประกอบ diosmin, hesperidin, narirutin, isorhoifolin และ caffric acid จากผลการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* สารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สาร 1, 8-ซินีออล ไดไฮโดรคาร์โวน (dihydrocavone) ลิโมนีน ไฟทอล (thytol) ลินาโลออล ไทมอล (thymol) คาร์วีออล พิเพอร์ริทีโนน และยูจีนอล เป็นต้น ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่สามารถให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อะตอมของอนุมูลอิสระ ทำให้ผลการต้านอนุมูลอิสระให้ผลที่ชัดเจนมากขึ้น สารเหล่านี้นอกจากจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วย

ตารางที่ 4.11 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการต้านอนุมูลอิสระในซีรัมของไก่เนื้อที่อายุ 21 และ 42 วัน

Treatments	Age (days)	TBARS (nmol/ml)	DPPH (EC_{50}, µg/ml)
Control	21	0.96	28.36
Chlortetracycline		1.00	29.39
0.5% Peppermint		0.88	20.62
1.0% Peppermint		0.80	24.23
1.5% Peppermint		0.96	21.65
2.0% Peppermint		1.24	24.23
Pooled SEM[1/]		0.35	19.50
P-value		0.616	0.950
Control	42	1.28[a]	64.62[a]
Chlortetracycline		1.08[a]	68.75[a]
0.5% Peppermint		1.28[a]	17.53[b]
1.0% Peppermint		1.08[a]	11.34[b]
1.5% Peppermint		0.72[ab]	16.49[b]
2.0% Peppermint		0.24[b]	14.80[b]
Pooled SEM[1/]		0.47	14.80
P-value		0.044	0.001

หมายเหตุ: [a, b, c] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), [1/]SEM= standard error of the mean (n=4)

4.3.5 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ และการผลิตแอมโมเนียของไก่เนื้อที่อายุ 21 และ 42 วัน

ผลการเสริมสะระแหน่บดแห้งในอาหารที่ระดับ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% ต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ส่วนซีกัมของไก่เนื้อที่อายุ 21 และ 42 วัน ได้แสดงในตารางที่ 4.12 พบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งทุกระดับไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเชื้อ *E. coli* และ *Lactobacillus* spp.ในลำไส้ส่วนซีกัมของไก่เนื้อทั้งสองช่วงอายุ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p>0.05$) อีกทั้งในช่วงอายุดังกล่าวตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp. โดย Jozefiak et al. (2004)

รายงานว่าจุลินทรีย์กลุ่มหลักๆ ที่พบในลำไส้ส่วนซีกัมของไก่เนื้อระยะแรก ได้แก่ *Enterobacteriacae* spp., *Enterococcus* sp. และ *Lactobacillus* spp. หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ ตรวจพบจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacteroides* spp. และ *Eubacterium* spp. ดังนั้นชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับอาหาร อายุ และสุขภาพของสัตว์ ในการทดลองนี้ตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp. อาจเนื่องมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar มีโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เกิดขึ้นบนอาหารได้ด้วย และระดับการเจือจางที่ต่ำเกินไป (10, 10^{-2}) จึงส่งผลให้โคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญซ้อนทับโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* spp. ทำให้ผลการตรวจนับผิดพลาด ในการศึกษาการตรวจนับเชื้อ *Salmonella* spp. ในครั้งต่อไป ต้องแก้ไขโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* spp. มากที่สุด รวมทั้งเพิ่มระดับการเจือจางเชื้อ (10^{-3}, 10^{-4})

ผลของการเสริมสะระแหน่บดแห้งต่อปริมาณแอมโมเนียในลำไส้ส่วนซีกัมของไก่เนื้อ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.13 โดยพบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งไม่มีผลต่อปริมาณแอมโมเนียในลำไส้ส่วนซีกัม ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับข้อมูลด้านเชื้อจุลินทรีย์ที่พบว่าสะระแหน่บดแห้งไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ส่วนซีกัม โดยปกติแอมโมเนียที่เกิดขึ้นในลำไส้ส่วนซีกัมเป็นผลผลิตที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *E. coli* และ *Salmonella* spp. เป็นต้น (Jozefiak et al., 2004) โดยอาศัยเอ็นไซม์ยูรีเอส (urease) จากจุลินทรีย์เหล่านี้ ในการย่อยสารประกอบไนโตรเจนจากอาหารโปรตีนที่ไม่ถูกย่อย (undigested protein) เนื้อเยื่อบุผนังลำไส้ที่หลุดลอก รวมถึงจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ แต่จากการทดลองที่ 2 พบว่าสะระแหน่สามารถลดการผลิตแอมโมเนียในมูลได้ แต่ไม่มีผลต่อการผลิตแอมโมเนียใน digesta ของลำไส้ส่วนซีกัม ทั้งนี้อาจเกิดจากเมื่อมูลถูกขับออกนอกร่างกาย น่าจะมีปัจจัยอื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย เช่น ความชื้น อุณหภูมิ และความเป็นกรดด่าง (pH) ซึ่งค่า pH ที่เป็นด่างจะส่งเสริมให้แอมโมเนียระเหยได้เร็วขึ้น ทำให้การเสริมสะระแหน่บดแห้งให้ผลชัดเจนในการลดปริมาณแอมโมเนีย แต่ digesta ในลำไส้ส่วนซีกัมถูกควบคุมด้วยสภาพความเป็นกรด อาจทั้งจากกรดไขมันที่ระเหย และ/หรือ สารประกอบฟีโนลิกทำให้ผลการลดแอมโมเนียไม่ชัดเจน

ตารางที่ 4.12 ผลการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ส่วนซีกัมของไก่เนื้ออายุ 21 และ 42 วัน

		Microbial populations (log CFU/g)		
Treatments	Age (days)	*E. coli*	*Lactobacillus* spp.	*Salmonella* spp.
Control	21	6.82	7.03	-
Chlortetracycline		7.02	7.39	-
0.5% Peppermint		7.33	7.21	-
1.0% Peppermint		7.21	6.85	-
1.5% Peppermint		6.88	7.22	-
2.0% Peppermint		6.70	6.85	-
Pooled SEM[1/]		0.704	0.485	-
P-value		0.933	0539	-
Control	42	6.80	7.52	-
Chlortetracycline		6.86	7.23	-
0.5% Peppermint		7.13	7.41	-
1.0% Peppermint		7.21	7.51	-
1.5% Peppermint		6.82	7.48	-
2.0% Peppermint		7.01	7.64	-
Pooled SEM[1/]		0.323	0.214	-
P-value		0.268	0.210	-

หมายเหตุ: [1/]SEM= standard error of the mean (n=4), - ตรวจไม่พบเชื้อ

ตารางที่ 4.13 ผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งต่อการผลิตแอมโมเนียในลำไส้ส่วนซีกัมของไก่เนื้ออายุ 21 และ 42 วัน

Treatments	Age (days)	Fresh digesta (g/100g)
Control	21	0.13
Chlortetracycline		0.18
0.5% Peppermint		0.19
1.0% Peppermint		0.19
1.5% Peppermint		0.16
2.0% Peppermint		0.15
Pooled SEM[1/]		0.04
P-value		0.370
Control	42	0.24
Chlortetracycline		0.24
0.5% Peppermint		0.34
1.0% Peppermint		0.33
1.5% Peppermint		0.23
2.0% Peppermint		0.27
Pooled SEM[1/]		0.05
P-value		0.173

หมายเหตุ: [1/]SEM= Standard error of mean (n=4)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

จากภาพรวมทั้งหมด สารออกฤทธิ์หลักที่พบในสะระแหน่ *M. cordiforlia* คือ สารคาร์วีออล โดยการเสริมสะระแหน่บดแห้งที่ระดับ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% จะมีสารคาร์วีออลในอาหารปริมาณ 0.09, 0.18, 0.27 และ 0.36 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ ทั้งนี้จากผลการทดลองแนะนำให้เสริมสะระแหน่บดแห้งที่ระดับ 0.5% ซึ่งมีสารออกฤทธิ์สารคาร์วีออล เท่ากับ 0.09 มิลลิกรัม/กิโลกรัมกรัม โดยการเสริมสะระแหน่บดแห้งที่ระดับดังกล่าว ไม่มีผลกระทบต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ สมรรถนะการเจริญเติบโต ลักษณะซาก การผลิตแอมโมเนีย การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ และดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพการผลิต เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p>0.05$) แต่ส่งผลดีเด่นในด้านการลดไขมันช่องท้อง และการต้านอนุมูลอิสระ

บทที่ 5
บทสรุป

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และการศึกษาผลของการเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งเพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะ ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ ลักษณะซาก การต้านอนุมูลอิสระ การผลิตแอมโมเนีย และการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ สรุปได้ดังนี้

1. วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ด้วยวิธีการที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณผลผลิตของน้ำมันหอมระเหย และศักยภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

2. น้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ที่ได้จากวิธีการสกัดด้วยน้ำและไอน้ำ มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *S. typhimurium* คือ มีค่า MIC และ MBC ต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีอื่นๆ และน้ำมันหอมระเหยเชิงการค้าสายพันธุ์ *M. piperita* โดยสารออกฤทธิ์หลักที่พบในสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* คือ สารคาร์วีออล

3. การเสริมสะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* บดแห้งในอาหารที่ระดับ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% พบว่าไม่มีผลกระทบต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ สมรรถนะการเจริญเติบโต ลักษณะซาก และการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ แต่พบว่าส่งผลดีต่อการลดไขมันช่องในท้อง การต้านอนุมูลอิสระ และลดการผลิตแอมโมเนียในมูลของไก่เนื้อ เมื่อพิจารณาดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพการผลิตโดยรวมของไก่เนื้อ (PI) พบว่าการเสริมสะระแหน่บดแห้งทุกระดับสามารถเพิ่มค่าประสิทธิภาพการผลิตโดยรวมของไก่เนื้อ โดยสะระแหน่บดแห้งที่แนะนำให้ใช้ คือ ที่ระดับ 0.5% ซึ่งมีสารออกฤทธิ์สารคาร์วีออล เท่ากับ 0.09 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การใช้สะระแหน่ทั้งในรูปบดแห้งและน้ำมันหอมระเหย ควรคำนึงถึงปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ที่อาจจะก่อให้เกิดควรแปรปรวนต่อปริมาณของสารออกฤทธิ์ นอกจากนี้การใช้สะระแหน่สายพันธุ์ *M. cordifolia* ในรูปน้ำมันหอมระเหยอาจยังไม่เหมาะสมสำหรับเสริมในอาหารสัตว์

2. การใช้สะระแหน่ในรูปบดแห้งเสริมในอาหารสัตว์ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากเยื่อใยที่เป็นองค์ประกอบในสะระแหน่อาจเป็นอุปสรรคขัดขวางการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ หากเสริมในสูตรอาหารระดับสูง แต่อย่างไรก็ตามถ้ามีการควบคุมระดับเยื่อใยให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมเยื่อใยดังกล่าวอาจมีประโยชน์ ในแง่ของการลดไขมันช่องท้อง และลดปริมาณการผลิตแอมโมเนียของไก่เนื้อได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์. 1(1): 59-70.

ไชยวรรณ วัฒนจันทร์ สุธา วัฒนสิทธิ์ และอรุณพร อิฐรัตน์. (2553). ผลการเสริมสารสกัดหยาบจากขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ในอาหารไก่กระทงที่มีผลต่อการเติบโต ลักษณะซาก และคุณภาพเนื้อ. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. ว. สงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. หน้า 17-18.

นันท์นภัส เดิมวงศ์. (2551). ความสัมพันธ์ของสารประกอบฟีโนลิกส์และวิตามินซีกับความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระในใบบัวบก. กลุ่มวิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ. ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์. 8(1): 117-126.

นวลจันทร์ พารักษา ทวี ส่งเสริม และสินชัย พารักษา. (2548). การทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรในสัตว์ปีกและสุกร คู่มือการวิจัย 3 คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ. หน้า 9-45.

วันชัย ศรีวิบูลย์ แววตา ประพัทธ์ศร อรอนงค์ ตัณฑวิวัฒน์ และวีณา จิรัจฉวียากูล. (2547). การนำสมุนไพรธรรมชาติมาใช้ในทางเครื่องสำอาง. กลุ่มควบคุมเครื่องสำอาง. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 1: 1-665.

วัลลภ วีชะรังสรรค์ และประณีต โอปณะโสภิต. (2548). ภาพรวมของอนุมูลอิสระและการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชในห้องทดลอง. SWU. J. Pharm. Sci. 9(1): 73-79.

อรัญญา มโนสร้อย ชลดา คำโน เพ็ญพรรณ ขันรินทร์ กาญจนา เรือนโต และจีรเดช มโนสร้อย. (2548). การเตรียมสารสกัดและน้ำมันจากสมุนไพรไทยโดยใช้ Supercritical carbon dioxide fluid และการกลั่น. คณะเภสัชศาสตร์ ว. เชียงใหม่.

Al-Ankari, A.S., Zaki, M.M., and Al-Sutan, S.I. (2004). Use of habek mint (*Mentha longifolia*) in broiler chicken diets. Int. J. poult. Sci. 3(10): 629-634.

Al-Bayati, F.A. (2009). Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. A. C. M. A. 8(20): 1-6.

Alankar, K. (2009). A review on peppermint oil. Asian J. Pharm. Clin. Res. 2: 27-33.

Al-Kassie, G.A.M. 2010. The role of peppermint (*Mentha piperita*) on performance in broiler diets. Agric. Biol. J. N. Am. 1(5): 1009-1013.

Ammann, A., Hinz, D.C., Addleman, R.S., Wai, C.M., and Wenclawiak, B.W. (1999). Superheated water extraction, steam distillation and SFE of peppermint oil. Fresenius. J. Anal. Chem. 364: 650-653.

Ancerawicz, J., Migliavacca, E., Carrupt, P., Testa, B., Bree, F., Zini, R., Tillement, J., Labidalle, S., Guyot, D., Chauvet-Monges, A., Crevat, A., and Ridant, A. (1998). Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. F. R. B. M. 25(1): 113-120.

AOAC. (1990). Official methods of analysis (15th ed.). Association of Analytical Chemists. Washington, DC.

Asakawa, T., and Matsushita, S. (1980). Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroper oxidess. Lipid. 15: 137-140.

Asekun, O.T., Grierson, D.S., and Afolayan, A.J. (2007). Effect of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis*. Food Chem. 101: 995-998.

Baliga, M.S., and Rao, S. (2010). Radioprotective potential of mint: A brief review. J. C. R. T. 3: 255-262.

Brenes, A., and Roura, E. (2010). Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. Anim. Feed. Sci. Technol. 158: 1-14.

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

Chauhan, R.S., Kaul, M.K., Shahi, A.K., Kumar, A., Ram, G., and Tawa, A. (2009). Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM (J) 26] from North-West Himalayan region. India J. Ind. Crops Prod. 29: 654-656.

Chowdhury, J.U., Nandi, N.C., Uddin, M., and Rahman, M. (2007). Chemical constituents of essential oil from two types of spearmint (*Mentha spicata* L. and *M. cardiaca* L.) introduced in Bangladesh. Bangladesh J. Sci. Ind. Res. 42(1): 79-82.

Chrpova, D., Kourimska, L., Gordon, M.H., Hermanova, V., Roubickova, L., and Panek, J. (2010). Antioxidant activity of selected phenols and herbs use in diets for medical conditions. Czech. J. Food Sci. 28(4): 317-325.

Croteau, R.B., Davis, E.M., Ringer, K.L., and Wildung, M.R. (2005). Review: (-)-menthol biosynthesis and molecular genetics. Naturwissenschaften. 92: 562-577.

Crowell, P.L. (1990). Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. J. Nutr. 129: 775S-778S.

Dorman, H.J.D., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y., and Hiltunen, R. (2003). Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. J. Agric. Food Chem. 51: 4563-4569.

Dunkley, K.D., Callaway, T.R., Chalova, V.I., McReynolds, J.L. Humeb, M.E., Dunkley, C.S., Kubena, L.F., Nisbet, D.J., and Ricke, S.C. (2009). Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. Anaerobe.15: 26-35.

Dzamic, A.M., Sokovic, M.D., Ristic, M.S., Novakovic, M., Grujic-Jovanovic, S., Tesevic, V., and Marin, P.D. (2010). Antifungal and antioxidant activity of *Mentha longifolia* (L.) Hudson (Lamiaceae) essential oil. Botanica Serbica. 34(1): 57-61.

Eteghad, S.S., Mirzaei, H., Pour, S.F., and Kahnamui, S. (2009). Inhibitory effects of endemic *Thymus vulgaris* and *Mentha piperita* essential oils on *Escherichia coli* O157:H7. R. J. B. S. 4 (3): 340-344.

Gershenzon, J., Maffei, M., and Croteau, R. (1989). Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). Plant Physiol. 89: 1351-1357.

Gonzales, E., Kondo, N., Saldanha, E.S.P.B., Loddy, M.M., Careghi, C., and Decuypere, E. (2003). Performance and physiological parameters of broiler chickens subjected to fasting on the neonatal period. J. Poult. Sci. 82:1250-1256.

Gracindo, L.A.M.B., Grisi, M.C.M., Silva, D.B., Alves, R.B.N., Bizzo, H.R., and Vieira, R.F. (2006). Chemical characterization of mint (*Mentha* spp.) germplasm at Federal District. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu. 8: 5-9.

Gramzow, S., and Holthausen, A. (2002). Effect of antioxidants in farm livestock. Lohmann Information. 27: 1-6.

Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., and Ozkan, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *Longifolia*. Food Chem. 103: 1449-1456.

Hajlaoui, H., Snoussi, M., Jannet, H.B., Mighri, Z., and Bakhrouf, A. (2008). Comparison of chemical composition and antibacterial activities of *Mentha longifolia* L. spp. *Longifolia* essential oil from two Tunisian localities (Gabes and Sidi Bouzid). J. Ann. Microbiolo. 58(3): 513-520.

Hajlaoui, H., Fethi, B.A., Mejdi, S., Emira, N., and Amina, B. (2010). Effect of *Mentha longifolia* L. ssp *longifolia* essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy. African J. Microbiolo. Res. 4 (11): 1122-1127.

Jozefiak, D., Rutkowski, A., and Martin, S.A. (2004). Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. Anim. Feed Sci. Tech. 113: 1-15.

Kizil, S., Hasimi, N., Tolan, V., Kilinc, E., and Yuksel, U. (2010). Mineral content, essential oil compoment and biological activity of two *mentha* specie (*M. piperita* L., *M. spicata* L). Turkish J. Field Crops. 15(2): 148-153.

Lee, K-W., Everts, H., and Beynen, A.C. (2004). Essential oil in broiler nutrition. Int. J. Poult. Sci. 3(12): 738-752.

Lupien, S., Karp, F., Ponnamperuma, K., Wildung, M., and Croteau, R. (1995). Abstract: cytochrome P450 limonene hydroxylases of *Mentha* species. Drug Metabol. Drug Interact. 12(3):245-60.

Metzler, B.U., and Mosenthin, R. (2008). A review of interactions between dietary fiber and the gastrointestinal microbiota and their consequences on intestinal phosphorus metabolism in growing pigs. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 21(4): 603-615.

Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Mihajlovic, B., and Matavulj, M. (2003). Abstract: antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. Planta Med. 69(5): 413-419.

Mkaddem, M., Bouajila, J., Ennajar, M., Lebrihi, A. Mathieu, F., and Romdhane, M. (2009). Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha* (*longifolia* L. and *viridis*) essential oils. J. F. S. 74(7): 358-363.

Mohsenzadeh, M. (2007). Evaluation of antibacterial activity of selected Iranian essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in nutrient broth medium. Pakistan J. Biol. Sci. 10(20): 3693-3697.

Mucciarelli1, M., Camusso, W., Maffei, M., Panicco P., and Bicchi, C. (2007). Volatile terpenoids

of endophyte-free and infected peppermint (*Mentha piperita* L.): chemical partitioning of a symbiosis. Microb. Ecolo. 54: 685-696.

National Research Council. (1994). Nutrient Requirements of Poultry. 9th rev. ed., National Academy Press, Washington, USA.

Nobakht, A., Norani, J., and Safamehr, A. (2011). The effect of different amounts of *Mentha pulegium* L. (pennyroyal) on performance, carcass trait, hematological and blood chemical parameter of broilers. J. Med. Plants Res. 5(16): 3763-3768.

Ocak, N., Erener, G., Burak Ak F., Sungu, M., Altop, A., and Ozmen, A. (2008). Performance of broilers feed diets supplemented with dry peppermint (*Mentha piperita* L.) or thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves as growth promoter source. Czech J. Anim. Sci. 4(53): 169-175.

Olennikov, D.N., and Tankhaeva, L.M. (2010). QuanNRC. 1994. Nutrient Requirements of Poultry. 9th rev. ed, Natl. Acad. Sci., Washington, DC. Quantitative determination of phenolic compounds in *Mentha piperita* leaves. Chem. Nat. Comp. 46(1): 22-25.

Ouwehand, A.C., Tiihonen, K., Kettunen, H., Peuranen, S., Schulze, H., and Rautonen, N. (2010). *In vitro* effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. Vet. Med. 55(2): 71-78.

Pakdeechote, P., Kukongviyapan, U., Berkban, W., Prachaney, P., Kukongviriyapan, V., and Nakmareong, S. (2011). *Mentha cordifolia* extract inhibits the development of hypertension in L-NAME-induced hypertensive rats. J. Med. Plants Res. 5(7): 1175-1183.

Khempaka, S., Molee, W. and Guillaume, M. 2009. Dried cassava pulp as an alternative feedstuff for broilers: effect on growth performance, carcass traits, digestive organs, and nutrient digestibility. J. Appl. Poult. Res. 18(3): 487-493.

Rajeswara Rao, B.R. (1999). Biomass and essential oil yield of commint (*Mentha arvensis* L. f. *piperascens* Malinvaud *ex* Holmes) planted in different months in semi-arid tropical climate. Ind. Crop. Prod. 10: 107-113.

Rizzo, P.V., Menten, J.F.M., Racanicci, A.M.C., and Santarosa, J. (2008). Foundation and perspectives of the use of plant extract as performance enhancer in broiler. Brazilian J. Poult. Sci. 10(4): 195-204.

Rohloff, J., Dragland, S., Mordal, R., and Iversen, T-H. (2005). Effect of harvest time and drying method on biomass production essential oil yield and quality of peppermint (*Mentha piperita* L.) J. Agric. Food Chem. 53: 4143-4148.

Roberts, S.A., Bregendahl, K., Xin, H., Kerr, B., and Russell, J. (2006). Including fiber in the diet of laying hens lowers ammonia. Iowa State University and USDA Poultry Science Day Report.

Saeed, S., Naim, A., and Tariq, P. (2006). *In vitro* antibacterial activity of peppermint. Pakistan J. Biol. Sci. 38(3): 869-872.

Sartoratto, A., Machado, A.L.M., Delarmelina, C., Figueira, G.M., Duarte, M.C.T., and Rehder, V.L.G. (2004). Composition and antibacterial activity of essential oils from aromatic plants use in Brazil. Brazilian J. Microbiolo. 35: 275-280.

SAS. (1996). SAS Procedures Guide, Release 6.3 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC: 441p.

Shahi, A.K., Chandra, S., Dutt, P., Kaul, B.L., Tava, A., and Avato, P. (1999). Essential oil composition of *Mentha x piperita* L. from different environments of north India. J. Flavounal. 14: 5-8.

Sharafi, S.M. Rasooli, I., Owlia, P., Taghizadeh, M., and Astaneh S.D.A. (2010). Protective effects of bioactive phytochemicals from *Mentha piperita* with multiple health potentials. Pharma. Mag. 6(23): 147-153.

Sitthithaworn, W., Vimolmangkang, S., Chittasupho, C., Petcheunsakul, D., and Apa-adul, S. (2009). Pharmacognostic investigation of the leaves of *Mentha cordifolia* and Its DNA fingerprints. Thai Pharm. Health Sci. J. 4 (1): 9-14.

Sokovic, M.D., Vukojevic, J., Marin, P.D., Brkic, D.D.,Vajs, V., and Griensven, L.J.L.D.V. (2009). Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. J. Mol. 14: 238-249.

Tachakittirungrod, S., Okonogi, S., and Chowwanapoonpohn, S. (2007). Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. Food Chem. 103: 381-388.

Tandon, S. (2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. ICS-UNIDO. 7: 115-126.

Tassou, C., Koutsoumanis, K., and Nychas, G.J.E. (2000). Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. Food Res. Int. 33: 273-280.

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O., Neng, N. R., Nogueirae, J.M.F., Alexandre Saraiva, J., and Nunes, M.L. (2012). European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. Ind. Crop. Prod. 36: 81-87.

Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Polissiou, M., and Sokmen, A. (2005). Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sippyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. J. Food Eng. 66: 447-454.

Toghyani, M., Toghyani, M., Gheisari, A., Ghalamkari, G., and Mohammadrezaei, M. (2010). Growth performance serum biochemistry and blood hematology of broiler chicks fed different levels of black seed (*Nigella sativa*) and peppermint (*Mentha piperita*). Livestock Sci. 129: 173-178.

Turner, G.W., Gershenzen, J., and Croteau, R.B. (2000). Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. Plant Physiol. 124: 655-663.

Uchiyama, M., and Mihara, M. (1978). Determination of malondialdehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. Anal. Chem. 86: 271-278.

World Health Organization. (2005). Quality control methods for medicinal plant materials. Revised Draft Update. Geneva.

Willis, R.B., Montgomery, M.E., and Allen, P.R. (1996). Improved method for manual, colorimetric determination of total Kjeldahl nitrogen using salicylate. J. Agric. Food Chem. 1804-1807.

Yadegarinia. D., Gachkar, L., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., and Rasooli, I. (2006). Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. Phytochem. 67(12): 1249-1255.

Zheljaikov, V.D., Cerven, V., Cantrell, C.L., Ebeihar, W.M., and Horgan, T. (2009). Effect of nitrogen location and harvesting stage on peppermint productivity oil content and oil composition. Hort. Sci. 44(5): 1267-1270.

ภาคผนวก

Journal of Agricultural Science and Technology A 1 (2011) 1336-1340
Earlier title: Journal of Agricultural Science and Technology, ISSN 1939-1250

Comparison of Distillation Methods of *Mentha cordifolia* Opiz. Essential Oil on Antibacterial Activity for Application Use in Animal Feeds

U. Pudpila, S. Khempaka, W. Molee and C. Hormta

School of Animal Production Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

Received: August 18, 2011 / Published: December 20, 2011.

Abstract: This study was conducted to evaluate the effect of different distillation methods of *Mentha cordifolia* Opiz. essential oil on antibacterial activity. The essential oils were isolated by water and steam, hydro, ethanol, and 3methanol: 1ethanol distillations. Moreover, we also compared the efficacy of these various distillations with commercial peppermint oil. Essential oils were tested *in vitro* against three pathogen bacteria species by sensitivity test include disc diffusion assay (DD), minimal inhibition concentration (MIC) and maximal bactericidal concentration (MBC). *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* were used in this investigation. The results showed that the water and steam distillation and 3methanol: 1ethanol under tested by DD assay was found to be effective against all the pathogenic bacteria, in which the zone of inhibition exhibited *E. coli*, *S. aureus* and *S. typhimurium* were 9.67 ± 0.35, 11.67 ± 0.66, 18.0 ± 1.15 and 9.00 ± 0.05, 8.3 ± 0.35, 19.0 ± 0.00 mm, respectively. While the hydro and ethanol distillations did action to against only *E. coli* which the inhibition zones were 8.67 ± 0.66 and 8.67 ± 0.35 mm, respectively. However, the commercial oil was more effective against tested pathogenic bacteria than all *M. cordifolia* essential oil. In case of MIC and MBC assays, the results showed that all essential oil distillation methods posed antibacterial potential in which the water and steam distillation showed the lowest MIC and MBC values against *E. coli*, *S. aureus* and *S. typhimurium*. It is suggested that among all *M. cordifolia* essential oil extractions, water and steam distillation was found to be highly bactericidal as it has shown in lowest MIC and MBC values and high in growth inhibition zone diameter.

Key words: *Mentha cordifolia* Opiz., essential oil, antibacterial activity, sensitivity test.

1. Introduction

Recently, the development of bacteria pathogens resistance to antibiotics is a global concern. This trend made livestock producer search for alternative substances to replace antibiotics as a growth promoter. The peppermint herb contains essential oils which have considered to posses antibacterial activity, antioxidant and digestive enzyme stimulation. The antibacterial effectiveness of peppermint oil has been pointed out as one of its most interesting properties. Previous studies reported that essential oil of *M. piperita* showed a potent activity against *S. aureus*, *E. coli* and *S. typhimurium* [1-2]. Hajlaoui et al. [3] have also described effects of *M. longlifolia* essential oil against bacteria and yeast species. Generally, menthol is the major essential oil substance of *M. piperita, M. longlifolia* and *M. rotunifolia* represent approximately 30%-50% [3-5] and it showed antimicrobial activity against broad range of bacteria [5]. While some mint species such as *M. spicata* is mostly composed of cavone ranging between 45%-70% [6-7]. In particular, *M. cordifolia* Opiz. is widely cultivated in Thailand and in many Southeast Asian countries, however, the literature research in regards to chemical substances or antibacterial properties of this plant is limited

Corresponding author: S. Khempaka, Ph.D., research fields: animal nutrition and feed science. E-mail: khampaka@sut.ac.th.

therefore, this study was aimed to conduct the effect of different distillation methods of *M. cordifolia* Opiz. essential oil on antibacterial activity for further application in animal feeds.

2. Materials and Methods

2.1 Plant Materials

M. cordifolia Opiz. was obtained from the farm of Suranaree University of Technology and local market in Naknon Ratchasima province during February-May 2011. Fresh leaves and stems above the grown were cut up into small pieces and subjected to various extraction methods.

2.2 Extraction of Essential Oil

Four essential oil extraction methods were: (1) water and steam distillation, (2) 3methanol: 1ethanol distillation, (3) hydro distillation and (4) ethanol distillation. All methods were extracted with different solvents for 12 h at temperature 50-60 °C, subsequently the essential oils were removed water by rotary evaporator and stored in dark bottles at 4 °C for further menthol analysis.

2.3 Gas Chromatography

Menthol component of *M. cordifolia* essential oil was performed on a gas chromatography using Hewlett-Packard Model 6850 (Palo Alto, CA) equipped with flame ionization detectors, HP- Innowax, 30 m × 320 µm ID and 0.25 µm film thicknesses fused capillary column. The oven temperature was programmed from 50 °C hold 1.0 min, ramp to 220 °C at 5 °C/min, hold 1 min, injector temperature 250 °C, detector temperature 280 °C, split rations 50:1, carrier gas a constant rate of 1.2 m/mL, nitrogen gas 25 mL/min, hydrogen flow 30 mL/min, volume injected 1 µL of 1% solution (diluted in ethanol). Menthol compound in crude oils were identified by compare retention time of the peak area with standard (menthol), the relative proportion of menthol constituent was calculated and expressed as percentages.

2.4 Microorganisms and Inoculums Preparations

Three bacteria, including one gram-positive bacteria (*S. aureus* TISIR 517) and two gram-negative bacteria (*E. coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* TISIR 292) were obtained from the culture collection of Thailand Institute of Scientific and Technological Research for used to determine the antimicrobial activity of the crude oils. All these freeze-dried bacteria were revived in agar culture by streak plate technique following with incubation at 37 °C for 24 h, subsequently bacteria were sub-culture in selective nutrient broth and incubation at 37 °C for 24 h. The optical density of each active culture was adjusted to 0.5 Mac-Farland standards (equivalent to 10^8 CFU/ml) measuring by spectrophotometer at wavelength of 625 nm for used in the antibacterial assays.

2.5 Disc Diffusion Assay (DD)

The antibacterial activity of essential oil against the selected microorganism was evaluated by disc diffusion (DD) method. A 0.1 ml of *E. coli*, *S. typhimurium* and *S. aureus* (10^8 cfu/ml of each) were spread on the Petri dish containing MacCONKEY (MCK), Xylose-Lysine Deoxycholate (XLD) and Nutrient agar (NA) by sterile glass spreader, respectively. Sterile filter paper discs (6 mm in diameter) were placed on the surface of the agar plate containing the indicator strain. Then 10 µl of various essential oil extractions were transferred onto the inoculated plate and incubated at 37 °C for 24 h. Each test was repeated with triplicate. Antibacterial activity were measured by the zone of growth inhibition and expressed in millimeter (mm).

2.6 Minimum Inhibition Concentration (MIC)

The MIC was determined by the broth micro dilution method using nutrient broth with different essential oil concentrations. Freshly prepared tubes containing two-fold dilution of essential oils from water and steam (rang from 6.25 to 100 mg/mL), 3methanol:1ethanol (rang from 7.8125 to 250 mg/mL),

hydro and ethanol distillation (rang from 125 to 1,000 mg/ml) were inoculated with 0.1 ml of tested bacteria suspensions and incubated at 37 °C for 24 h. The MIC was determined by visual examination for turbidity after 24 h of incubation. The commercial peppermint oil (rang from 7.8125 to 250 mg/mL) was also included as control.

2.7 Minimum Bactericide Concentration (MBC)

The MBC was considered the lowest concentration of essential oil which prevented growth and reduced inoculums of the bacteria being tested. A 0.1 mL of selected bacteria suspensions were spread on the agar plate and incubated 37 °C for 24 h. A progressive change after 24 h was noted.

3. Results and Discussion

3.1 Chemical Composition of Essential Oil

The result of extraction methods on the yield of *M. cordifolia* essential oil is presented in Table 1. This finding found that the concentration of menthol obtained from 3methanol:1ethanol, hydro and ethanol distillation methods were 10, 50 and 30 mg/L, respectively. While water and steam distillation showed no present of menthol, probably due to *M. cordifolia* that contains a low level of menthol and represents a rich source of the other active antibacterial agents. Chowdhury et al. [6] and Chauhan et al. [7] also reported that the major chemical substance of *M. spicata* presented in the form of cavone range between 45%-70%. In general, essential oil concentrations are variable depending on plant sources, geographical locations, harvest times, plant part used and method of extractions [8-10]. From the literature reports, the major active ingredient of *M. longlifolia* and *M. rotunifolia* employing hydro distillation method presented in the form of menthol (30%-60%) [3-5]. We obtained a lower menthol concentration of *M. cordifolia* when compared to *M. longlifolia* and *M. rotunifolia*, the difference could be due to a difference in species, plant locations and the method of extractions.

Table 1 The effect of distillation methods on essential oil yield and menthol component of *M. cordifolia* opiz..

Distillation methods	Yield (%)	Menthol (mg/L)	Oil characteristics
Water and steam distillation	0.01	-	yellowish brown
3Methanol:1 ethanol distillation	0.01	10	yellowish green
Hydro distillation	1.33	50	Brown
Ethanol distillation	1.00	30	Brown

3.2 Antibacterial Activity Using Disc Diffusion Assay

The results of essential oils against three pathogen bacteria species using DD is shown in Table 2. The water and steam and 3methanol:1ethanol distillations were found to be the most effective against all the pathogenic bacteria compared to the other extraction methods used in this study, in which the zone of inhibition exhibited *E. coli, S. aureus* and *S. typhimurium* were 9.67 ± 0.35, 11.67 ± 0.66 and 18.0 ± 1.15 and 9.00 ± 0.05, 8.3 ± 0.35 and 19.0 ± 0.00 mm, respectively. While the hydro and ethanol distillations did action to against only *E. coli* which the inhibition zones were 8.67 ± 0.66 and 8.67 ± 0.35 mm, respectively. This suggested that essential oil of *M. cordifolia* has a high capability in broader spectrum of antibacterial activity both in Gram-positive and Gram-negative bacteria. However, the commercial oil from *M. piperita* showed the most effective against pathogenic bacteria than all *M. cordifolia* essential oil extractions. Probably due to this commercial oil, not

Table 2 Comparison of distillation methods of *M. cordifolia* essential oil on antibacterial activity using disc diffusion assay.*

Extraction methods	Disc diffusion assay (zone of inhibition, mm)		
	E. coli	*S. aureus*	*S. typhimurium*
Water and steam distillation	9.67 ± 0.35	11.67 ± 0.66	18.0 ± 1.15
3Methanol:1ethanol distillation	9.00 ± 0.05	8.3 ± 0.35	19.0 ± 0.00
Hydro distillation	8.67 ± 0.35	-**	-
Ethanol distillation	8.67 ± 0.66	-	-
Commercial oil***	29.00 ± 0.57	19.3 ± 0.69	20.3 ± 0.88

*Mean ± S.E, **No inhibition, ***M. piperita.

only differences in active substances but its crude oil may process with the suitable method to reach a high quality of active substances. Our results are in accordance with the previous studies which reported essential oil of *M. piperita* [1-2] and *M. rotundifolia* [11] exhibited *E. coli*, *S. aureus* and *S. typhimurium*.

3.3 Minimal Inhibition Concentration and Maximal Bactericidal Concentration

In case of MIC and MBC assays, the results showed that all *M. cordifolia* essential oil distillation methods posed potential antibacterial properties in which the water and steam distillation showed the lowest MIC and MBC values against *E. coli*, *S. aureus* and *S. typhimurium* (Table 3). Among the various *M. cordifolia* extractions, water and steam distillation was found to be highly bactericidal as it has shown in the lowest MIC and MBC values against the tested bacteria. Even menthol substance was not performed by the water and steam distillation but it may contain the other antimicrobial agents. Unfortunately, the data of chemical substances of *M. cordifolia* is limited. Our results found that *M. cordiforlia* showed a lower potential of antibacterial activity as compared to the other type of pepper mint culture in Africa or Latin America. Hafedh et al. [5] indicated that essential oils of *M. longifolia* showed MIC value in the range 0.19-1.56 mg/mL which inhibited the growth of *E. coli*, *S. aureus* and *S. typhimurium*. In addition, Hajlaoui et al. [3] also noted that *M. longifolia* essential oil comprised 32.51% menthol, 20.7%-28.8% menthone and 7.8%-17.8% pulegone, with the MIC values 0.195-3×10^3 µg/mL showed the action of antibacterial and antifungal. These differences are due to several factors such as mint species, selective microbial strains and assay conditions. Our results found essential oil of *M. cordiforlia*, in case of water and steam distillation, showed a greater effect on microbial defenses then commercial oil (*M. peperita*). This indicated that *M. cordiforlia* had a beneficial effect on antimicrobial activity; however, distillation methods are of great concerns on essential oil yield and component.

Table 3 Comparison of distillation methods of *M. cordifolia* essential oil in minimal inhibition concentration and maximal bactericide concentration.

Extraction methods	Dilution methods (mg/ml)	Microorganisms		
		E.coli	*S. aureus*	*S. typhimurium*
Water and steam distillation	MIC	25	25	50
	MBC	50	100	100
3Methanol: 1 ethanol distillation	MIC	62.5	125	31.25
	MBC	125	250	500
Hydro distillation	MIC	1,000	1,000	1,000
	MBC	>1,000	>1,000	>1,000
Ethanol distillation	MIC	500	500	500
	MBC	1,000	>1,000	>1,000
Commercial oil*	MIC	31.25	31.25	31.25
	MBC	62.5	250	125

**M. piperita.*

4. Conclusions

It is concluded that among all *M. cordifolia* essential oil, water and steam distillation was found to be highly bactericidal as it has shown in the lowest MIC and MBC values and high in growth inhibition zone diameter. Further studies should be carried out in animals, since antimicrobial potential and appropriate supplementation levels of *M. cordifolia* may differ with animal types.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from National Research Council of Thailand (NRCT). The authors also would like to acknowledge Suranaree University of Technology for facilities research.

References

[1] S. Saeed, A. Naim, P. Tariq, *In vitro* antibacterial activity of peppermint, Pakistan. J. Biol. Sci. 38 (2006) 869-872.

[2] C. Tassou, K. Koutsoumanis, G. J. E. Nychas, Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil, Food Res. Int. 33 (2000) 273-280.

[3] H. Hajlaoui, M. Snoussi, H.B. Jannet, Z. Mighri, A. Bakhrouf, Comparison of chemical composition and antibacterial activities of *Mentha longifolia* L. spp. essential oil from two Tunisian localities (Gabes and Sidi Bouzid), J. Ann. Microbiol. 58 (2008) 513-520.

[4] M.D. Sokovic, J. Vukojevic, P.D. Marin, D.D. Brkic, V. Vajs, L.J.L.D.V. Griensven, Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities, J. Molecules. 14 (2009) 238-249.

[5] H. Hafedh, B.A. Fethi, S. Mejdi, N. Emira, B. Amina, Effect of *Mentha longifolia* L. ssp *longifolia* essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy, Afr. J. Microbiol. Res. 4 (2010) 1122-1127.

[6] J.U. Chowdhury, N.C. Nandi, M. Uddin, M. Rahman, Chemical constituents of essential oil from two types of spearmint (*Mentha spicata* and *M. cardiac* L.) introduced in Bangladesh, Bangladesh J. Sci. Ind. Res. 42 (2007) 79-82.

[7] R.S. Chauhan, M.K. Kaul, A.K. Shahi, A. Kumar, G. Ram, A. Tawa, Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM(J)] from North-West Himalayan region, India, Ind. Crop Prod. 29 (2009) 654-656.

[8] A. Brenes, E. Roura, Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action, J. Ani. Feed Sci. and Technol. 158 (2010) 1-14.

[9] P.V. Rizzo, J.F.M. Menten, A.M.C. Racanicci, J. Santarosa, Foundation and perspectives of the use of plant extract as performance enhancer in broiler, Brazil. J. Poult. Sci. 10 (2008) 195-204.

[10] K.W. Lee, H. Everts, A.C. Beynen, Essential oil in broiler nutrition, Int. J. Poult. Sci. 3 (2004) 738-752.

[11] E. Derwich, Z. Benziane, A. Boukir, Antibacterial activity and chemical composition of the leaf essential oil of *Mentha rotundifolia* from morocco, EJEAFChe. 9 (2009) 19-28.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัตินักวิจัย

Name : Sutisa Khempaka (Ph.D.)

Position : Lecturer

Address : School of Animal Production Technology
Institute of Agricultural Technology
Suranaree University of Technology
Nakhon Ratchasima 300000, Thailand
Tel. (66 44) 224572 Fax (66 44) 224150
E- mail: khampaka@sut.ac.th

Date of Birth : September 14, 1975

Place of Birth : Surin

Education :

B.Sc. (1998) Animal Science (First Honor), Ubon Ratchathanee University, Thailand

M.Sc. (2002) Animal Nutrition, Khon Kaen University, Thailand

Ph.D. (2006) Animal Nutrition and Feed Science, Gifu University, Japan

Work Experience :

2002 - present : Lecturer, School of Animal Production Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Thailand

Papers published in international and national journals

Khempaka, S., K. Koh, and Y. Karasawa. 2006. Effect of shrimp meal on growth performance and digestibility in growing broilers. J. Poult. Sci. 43: 250-254.

Khempaka, S., M. Mochizuki, K. Koh, and Y. Karasawa. 2006. Effect of chitin in shrimp meal on growth performance and digestibility in growing broilers. J. Poult. Sci. 43: 339-343.

Khempaka, S., W. Molee, and M. Guillaume. 2009. Dried cassava pulp as an alternative feedstuffs for broilers: effect on growth performance, carcass traits, digestive organs and nutrient digestibility. J. Appl. Poult. Res. 18: 487-493.

Thongkratok, R., **S. Khempaka**, and W. Molee. 2010. Protein enrichment of cassava pulp using microorganisms fermentation techniques for use as an alternative animal feedstuff. J. Anim. Vet. Adv. 9(22): 2859-2862.

Khempaka, S., C. Chitsatchapong, and W. Molee. 2011. Evaluation of chitin and protein constituents in shrimp meal on growth performance, nutrient digestibility, intestinal microbial populations, volatile fatty acids and ammonia production in broilers. J. Appl. Poult. Res. 20: 1-11.

Pudpila, U., **S. Khempaka**, W. Molee, and C. Hormta. 2011. Comparison of distillation methods of *Mentha cordifolia* Opiz. essential oil on antibacterial activity for application use in animal feeds. J. Agri. Sci. and Tech A. 1336-1340.

จรณี จิตสัจจพงศ์ วิทธวัช โมพี และสุทิศา เข็มผะกา. 2552. ผลของการเสริมเปลือกกุ้งป่นในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต คุณภาพซาก และการตอบสนองภูมิคุ้มกันของไก่เนื้อ. วารสารแก่นเกษตร. 37 (4): 331-338.

เอกพล พูนชัย **สุทิศา เข็มผะกา** วิทธวัช โมพี และจักร์ โนจากุล. 2553. บทบาทของกลูตามีนต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน และการพัฒนาระบบทางเดินอาหารสุกรหย่านม. วารสารแก่นเกษตร. 38 (1): 39-46.

Papers published in international conferences

Khempaka, S., M. Mochizuki, K. Koh, and Y. Karasawa. 2005. Effects of shrimp meal on growth performance, digestibility, nitrogen retention and meat color in growing broilers. Japanese Poultry Science Association, Spring Meeting 2005. Tokyo, Japan.

Khempaka, S., K. Koh, and Y. Karasawa. 2005. Growth performance, digestibility and nitrogen retention in growing broiler given diets containing 4 to 16% of shrimp meal. Japanese Poultry Science Association, Autumn Meeting 2005. Kumamoto, Japan.

Khempaka, S., K. Koh, and Y. Karasawa. 2006. High calcium content in shrimp meal had little effect on growth performance in growing broilers. Japanese Poultry Science Association, Spring Meeting 2006. Fukuoka, Japan.

Khempaka, S., K. Koh, and Y. Karasawa. 2007. The *in vitro* measurement of dry matter and crude protein digestibilities of shrimp meal. First International Conference on Sustainable Animal Agriculture in Developing Countries, Kunming Yunnan, China.

Khempaka, S., W. Molee, R. Thongkratoke, C. Chitsatchapong, and E. Poonchai. 2008. Fermentation of cassava pulp with *Aspergillus oryzae* and *Candida utilis* for improved nutrients as an alternative feedstuff for animals. The 13th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. September 22-26, 2008. Hanoi, Vietnam.

Khempaka, S., and W. Molee. 2008. Effect of cassava pulp on growth performance and digestibility in broilers. The 13th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. September 22-26, 2008. Hanoi, Vietnam.

Khempaka, S., C. Chitsatchapong, and W. Molee. 2009. Measurement of chitin efficiencies on growth performance and ammonia production in broilers. The 2nd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries, November 8-11, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia.

Chisatchapong, C., **S. Khempaka**, W. Molee, and C. Homta. 2009. Effect of chitin constituent in shrimp meal on nutrient digestibility, hematology and immune response in broilers. The 2nd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries. November 8-11, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia.

Thongkratok, R., **S. Khempaka**, W. Molee, and C. Homta. 2009. Evaluation of fermented cassava pulp on growth performance and nutrient digestibility in broilers. 2009. The 2nd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries. November 8-11, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia.

Poonchai, E., **S. Khempaka**, W. Molee, and J. Nojakul. 2009. Effect of glutamine supplementation on growth performance and intestinal microbial population of weaned pigs. The 2nd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries. November 8-11, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia.

Khempaka, S., N. Chaiyasit, and W. Molee. 2010. Effect of dietary shrimp meal on microbial populations and ammonia production in broilers administered with *Lactobacillus* spp. and *Bacillus* spp. The 14th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. August 23-27, 2010. Pingtung, Taiwan, Republic of China.

Molee, W., S. Khempaka, C. Chitsatchapong and P. Puttaraksa. Effects of dietary Tuna Oil on growth performance and fatty acid composition of meat in Thai Native Chickens. The 14th

Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. August 23-27, 2010. Pingtung, Taiwan, Republic of China.

Pudpila, U., **S. Khempaka**, W. Molee, and C. Hormta. 2011. Comparison of distillation methods of *Mentha cordifolia* Opiz. essential oil on antibacterial activity for application use in animal feeds. The 3rd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries. July 26-29, 2011. Nakhon Ratchasima, Thailand.

Suriyawong, T., **S. Khempaka**, W. Molee, and C. Hormta. 2011. The *In Vitro* evaluation of non-starch polysaccharide digestibility of cassava pulp using xylanase enzyme. The 3rd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries. July 26-29, 2011. Nakhon Ratchasima, Thailand.

Khempaka, S., and K. Koh. 2011. Effect of covering with acidified sawdust on ammonia volatilization during composting of poultry manure. The 3rd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries. July 26-29, 2011. Nakhon Ratchasima, Thailand.

Chaokaur, A., **S. Khempaka**, T. Matsumoto, J. Takahashi. and T. Nishida. 2011. Effect of ruminal dosing of mechanical stimulating brush on methane emission from rumen in dry cows. The 3rd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries. July 26-29, 2011. Nakhon Ratchasima, Thailand.

Khempaka, S., S. Okrathok, L. Hokking, B. Thuhanon, and W. Molee. 2011. Influence of supplemental glutamine on nutrient digestibility and utilization, small intestinal morphology and gastrointestinal tract and immune organ developments of broiler chickens. World Academy of Science, Engineering and Technology. August 24-26, 2011. Paris, France.

Khempaka, S. and W. Molee. 2012. An evaluation of glutamine feed supplementation on the immune response, intestinal morphology and growth performance of broilers, at various stages of development. ADSA®-AMPA-ASAS –CSAS-WSASAS Joint Annual Meeting. July 15-19, 2011, Phoenix, Arizona, USA.

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี