

การศึกษาประสิทธิภาพการป้องกันโรคบิดที่เกิดจาก *Eimeria tenella* ของน้ำมันหอมระเหยอบเชยจีน

Study efficiency of *Cinnamomum cassia* essential oils in Coccidiosis
prevention caused by *E. tenella*

กนกชล อินทร์วิมล¹, ทวีศักดิ์ ส่งเสริม², ภคอร อัครมธุรากุล¹, สุรพันธ์ จิตวิริยานนท์¹
และ นวลจันทร์ พารักษา^{1*}

Kanokchon Intarawimol¹, Taweesak Songserm², Phakka-on Akaramathurakul¹,
Surapan Jitviriyanon¹ and Nuanchan Paraksa^{1*}

บทคัดย่อ: การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อบิดชนิด *Eimeria tenella* ของน้ำมันอบเชยจีนแบ่งเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 ศึกษาการยับยั้งเชื้อบิดในระดับห้องปฏิบัติการ โดยให้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด MDBK สัมผัสกับสไปโรซอยท์จากเชื้อบิดและน้ำมันหอมระเหยอบเชยจีนที่ความเข้มข้นต่างกัน แล้วตรวจนับเซลล์ที่ถูกบุกรุกด้วยสไปโรซอยท์ ผลพบความสัมพันธ์เป็นแบบลอการิทึมด้วยสมการ $y = -9.2791\ln(x) - 31.5858$ โดยมีค่า IC50 และ IC100 เท่ากับ 0.00016 และ 0.03 มคล./มล.ตามลำดับ จากนั้นทำการทดสอบในสัตว์โดยใช้ น้ำมันอบเชยจีน 3 ระดับ (0.03, 0.20 และ 1.40 มคล./มล.) พบว่าที่ความเข้มข้น 0.20 มคล./มล.สามารถยับยั้งเชื้อบิดได้โดยไม่กระทบต่อการกินอาหารและน้ำของไก่เนื้อ การทดลองที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพการป้องกันโรคบิดของผลิตภัณฑ์น้ำมันอบเชยจีนในไก่เนื้อที่เลี้ยงในสภาพปกติ ใช้ไก่เนื้ออายุ 1 วัน จำนวน 768 ตัว แบ่งเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 4 ซ้ำๆ ละ 48 ตัว สุ่มไก่ให้ได้รับกลุ่มทดลองดังนี้ กลุ่ม 1 ไม่กรอกเชื้อและไม่เสริมสารใดๆ กลุ่ม 2-4 ได้รับโอโอซิสต์จาก *E. tenella* จำนวน 2500 โอโอซิสต์ที่อายุ 14 วันและเสริมสารซาลิโนมายซิน 0, 50 มก/กก.อาหาร และผลิตภัณฑ์น้ำมันอบเชยจีน 0.20 มคล./มล.ในน้ำดื่ม ตามลำดับ สุ่มไก่ 4 ตัวต่อซ้ำที่อายุ 21 และ 35 วันเพื่อให้คะแนนรอยโรคบิดได้ต้นด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยา พบว่าผลิตภัณฑ์น้ำมันอบเชยจีนแสดงประสิทธิภาพการป้องกันโรคบิดที่เกิดจาก *E. tenella* ต่ำกว่าผลในระดับห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้อาจเกิดจากผลข้างเคียงของสารที่ใช้ในการเตรียมผลิตภัณฑ์

คำสำคัญ: การป้องกันโรคบิด, น้ำมันอบเชยจีน, ไก่เนื้อ

Received November 22, 2018

Accepted January 24, 2019

¹ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture at KamphaengSaen, Kasetsart University KamphaengSaen Campus, Nakonpathom, 73140

² ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University KamphaengSaen Campus, Nakonpathom, 73140

* Corresponding author: agrnupa@ku.ac.th

ABSTRACT: Two experiments were conducted to investigate the anti-coccidial property of *Cinnamomum cassia* essential oil (ES). The in vitro efficiency of *C. cassia* oil was assessed by the inhibition of sporozoites invasion in MDBK cell lines in experiment 1. The cell lines were contacted with sporozoites from *Eimeria tenella* in different concentrations of Cassia oil. The correlation between ES concentrations and the percentage of invaded cells was found in logarithmic regression by $y = -9.2791\ln(x) - 31.5858$ with the calculated IC50 and IC100 values as 0.00016 and 0.03 $\mu\text{l/ml}$., respectively. Afterwards, three concentrations (0.03, 0.20 and 1.40 $\mu\text{l/ml}$.) were used to study the optimal usage dose for broilers and found that 0.20 $\mu\text{l/ml}$. *C. cassia* oil had an effective anti-coccidial property without negative effect on the water and feed consumption of broilers. Therefore, the efficiency in Coccidiosis prevention of 0.20 $\mu\text{l/ml}$. *C. cassia* oil in micro-emulsion product was studied in experiment 2. A total of 768 one-day old broilers were used in a completely randomized design with four treatments and four replicates each (48 birds/replication) and randomly received the following treatments; group 1 was non-challenged with *E. tenella* and without anti-coccidial product supplementation, group 2-4 were challenged with 2,500 oocysts from *E. tenella* at 14 day-old and supplemented with 0 and 50 ppm. salinomycin in diet, 0.20 $\mu\text{l/ml}$. *C. cassia* oil in micro-emulsion product through drinking water, respectively. Intestinal tissues were collected from 4 birds per each replicate at 21 and 35 day of age for histopathological lesion scoring. Results showed that micro-emulsion product of *C. cassia* oil had the lower efficiency in Coccidiosis prevention caused by *E. tenella* than those from in vitro study, probably, due to the side effects of surfactants used in product preparation.

Keywords: Coccidiosis prevention, Cassia oil product, broilers

คำนำ

โรคบิดเป็นปัญหาที่ทำให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกของโลก ซึ่งสร้างความสูญเสียทางเศรษฐกิจทั่วโลกถึงปีละ 2.4 พันล้านดอลลาร์ (Quiroz-Castañeda, 2018) โดยมีสาเหตุจากเชื้อโปรโตซัว *Eimeria* sp. ที่มีหลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะสายพันธุ์ *E. tenella* ที่ทำให้เกิดความเสียหายบริเวณไส้ตันของไก่ ด้วยการทำลายผนังลำไส้ ทำให้ลำไส้อักเสบอย่างรุนแรง ถ่ายเป็นมูกเลือด สัตว์เกิดความสูญเสียค่อนข้างมาก (Chapman, 2014) นอกจากนี้เซลล์สืบพันธุ์ของเชื้อบิดหรือโอโอซิสต์ (oocysts) มีความทนทานต่อน้ำยาฆ่าเชื้อโรคที่ใช้ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์และสามารถอยู่ในสภาพแวดล้อมได้นาน จึงจำเป็นต้องมีการใช้สารป้องกันโรคบิดในอาหารเพื่อควบคุมโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารในกลุ่มไอโอโนฟอร์ (Ionophores) (Gerhold, 2016) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีการจำกัดการใช้สารป้องกันโรคบิดในการผลิตสัตว์ปีกกันมากขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากสารเหล่านี้ทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อบิด อีกทั้งอาจก่อให้เกิดการตกค้างในตัวสัตว์รวมถึงผลิตภัณฑ์จาก

สัตว์ และส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค (Markiewicz et al., 2014) ด้วยเหตุนี้จึงมีการใช้แนวทางต่างๆ เพื่อช่วยลดผลกระทบที่เกิดขึ้น ซึ่งสมุนไพรหรือสารสกัดจากสมุนไพร โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กลุ่มน้ำมันหอมระเหย (Essential oils) มีศักยภาพในการนำมาใช้ทดแทนสารป้องกันโรคบิดได้ เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดมีคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ รวมทั้งเชื้อบิดได้ และไม่ส่งผลเสียต่อสัตว์และผู้บริโภค (Remmal et al., 2013) ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยจีน (*Cinnamomum cassia*) มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เนื่องจากองค์ประกอบหลักคือ สารซินนามอลดีไฮด์ (cinnamaldehyde) ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Krishan and Narang, 2014) จึงน่าจะสามารถนำมาใช้เป็นสารป้องกันโรคบิดได้ นอกจากนี้สารซินนามอลดีไฮด์ยังมีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและลดความเสียหายของเซลล์ที่ถูกทำลายด้วยเชื้อบิดได้ (Lee et al., 2011) ซึ่งจะช่วยลดผลกระทบจากการได้รับเชื้อบิดอีกทั้งช่วยให้สุขภาพของสัตว์ดีขึ้น ดังนั้นการทดลองนี้จึงทำการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคบิดชนิด *E. tenella* ของน้ำมันอบเชยจีน ทั้งการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ

การ (in vitro study) และการทดสอบในตัวไก่เนื้อ (in vivo study) เพื่อใช้เป็นแนวทางในการใช้เพื่อป้องกันและควบคุมโรคบิดทดแทนการใช้สารป้องกันโรคบิดในการผลิตสัตว์ปีกต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันโรคบิดที่เกิดจาก *E. tenella* ของน้ำมันหอมระเหยอบเชยจีน แบ่งเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเข้าทำลายเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด MDBK ของสปอโรซอยท์ในระดับห้องปฏิบัติการ และการทดลองที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพในการป้องกันโรคบิดของผลิตภัณฑ์น้ำมันหอมระเหยอบเชยจีนในไก่เนื้อที่เลี้ยงในสภาพปกติ

การทดลองที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อบิดชนิด *E. tenella* ของน้ำมันหอมระเหยอบเชยจีนในระดับห้องปฏิบัติการด้วยการวัดเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ถูกบุกรุก (invaded cells) โดยสปอโรซอยท์จากเชื้อบิดชนิด *E. tenella* ตามลักษณะดัง Figure 1 โดยขั้นตอนแรกทำการทดสอบ

ความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยอบเชยจีนต่อเซลล์เพาะเลี้ยง (cytotoxicity test) เพื่อหาค่าความเข้มข้นสูงสุดของน้ำมันหอมระเหยที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Mardin-Darby Bovine Kidney cells (MDBK) เนื่องจากเป็นเซลล์ที่เหมาะสมกับการทดสอบเชื้อบิด *E. tenella* (Schmatz et al., 1984) ซึ่งความเข้มข้นต่างๆของน้ำมันอบเชยจีนที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วยความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงใช้เป็นความเข้มข้นสูงสุด และลดหลั่นความเข้มข้นลงมาทีละสองเท่า (Two-fold dilution) ทั้งนี้ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง การเตรียมน้ำมันหอมระเหยอบเชยจีน การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ รวมทั้งการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันอบเชยจีนในการยับยั้งการเข้าบุกรุกเซลล์ของสปอโรซอยท์จากเชื้อ *E. tenella* ดำเนินการตามวิธีของ Jitviriyanon et al. (2016) จากนั้นสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยกับเปอร์เซ็นต์ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ถูกบุกรุกด้วยสปอโรซอยท์เพื่อคำนวณหาค่า IC50 และ IC100 สำหรับการทดสอบการยับยั้งเชื้อบิดและผลกระทบในตัวสัตว์ต่อไป



Figure 1 Morphological characteristic of invaded MDBK cell by sporozoites (arrow).

ความเข้มข้นที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการอาจจะไม่เหมาะสมกับการใช้ในสัตว์สัตว์ เนื่องจากสภาพแวดล้อมในร่างกายสัตว์มีความซับซ้อนกว่าในห้องปฏิบัติการ ที่อาจส่งผลกระทบต่อออกฤทธิ์ของสารที่ทดสอบ (Lorian 1988) จึงทำการทดสอบในตัวไก่เนื้อจำนวน 18 ตัวโดยใช้ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยอบเชยจำนวน 3 ระดับ ซึ่งให้ครอบคลุมความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยจีนที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (ที่ระดับ 0.025% หรือ 0.25 มคก./มล.) ตามรายงานของ Oussalah et al.(2006) ทำการแบ่งไก่ทดลองออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 6 ตัวๆ ละ 1 ตัว โดยทำการกรอกโอเอสทีระยะติดเชื้อมาจากเชื้อ *E. tenella* จำนวน 60,000 โอเอสที/ตัว ที่อายุ 14 วัน ทำการเก็บข้อมูลปริมาณน้ำและอาหารที่กินของไก่แต่ละกลุ่มทดลองในช่วง 7 วัน พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างไส้ตันเมื่อครบ 7 วันหลังกรอกเชื้อ เพื่อตรวจและให้คะแนนรอยโรคด้วยลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาตามวิธีการของ Jitviriyanon et al. (2016) เพื่อหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเกิดคะแนนรอยโรคบิดโดยไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณการกินน้ำและอาหารสำหรับทดสอบในไก่เนื้อที่เลี้ยงในสภาพปกติในการทดลองที่ 2 ต่อไป

การทดลองที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันโรคบิดของผลิตภัณฑ์น้ำมันหอมระเหยอบเชยจีนชนิดละลายน้ำในไก่เนื้อที่เลี้ยงในสภาพปกติ โดยใช้ไก่เนื้อสายพันธุ์ Ross 308 จำนวน 768 ตัว แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 4 ตัวๆ ละ 48 ตัว (เพศผู้ 24 ตัว และเพศเมีย 24 ตัว) สุ่มไก่แต่ละตัวให้ได้รับกลุ่มทดลองดังนี้ กลุ่มที่ 1 ไม่ได้รับเชื้อบิดและไม่เสริมสารป้องกันโรคบิด กลุ่มที่ 2-4 เป็นกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดและเสริมสารซาลิโนมายซินที่ระดับ 0 และ 50 มก./กก.อาหาร, และผลิตภัณฑ์น้ำมันหอมระเหยอบเชยจีนชนิดละลายน้ำดื่มที่ความเข้มข้นจากการทดลองที่ 1 ตามลำดับ โดยทำการกรอกโอเอสทีระยะติดเชื้อมาจากเชื้อ

E. tenella จำนวน 2,500 โอเอสที/ตัว ให้กับไก่กลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดเมื่ออายุ 14 วัน และเลี้ยงไก่ทดลองด้วยอาหารทดลองหรือให้น้ำดื่มที่ผสมน้ำมันหอมระเหยในช่วงอายุ 1-35 วัน อาหารที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วยข้าวโพด-กากถั่วเหลืองเป็นหลักและมีสารอาหารเพียงพอสำหรับไก่เนื้อตามคำแนะนำของ NRC (1994) ในกรณีการเสริมผลิตภัณฑ์น้ำมันอบเชยจีนในน้ำดื่มโดยให้ไก่กินน้ำให้หมดภายใน 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงให้น้ำตามปกติอย่างเต็มที่

การเลือกใช้น้ำมันหอมระเหยในรูปแบบละลายน้ำเนื่องจากน้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติที่ไม่ทนร้อน ทำให้มีข้อจำกัดเมื่อผสมในอาหาร การใช้ในรูปแบบละลายในน้ำดื่มจะสามารถควบคุมความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ได้ดีกว่า(อรุณญาและจิเรศ, 2548) โดยผลิตภัณฑ์น้ำมันอบเชยจีนที่ใช้ในการทดลองได้รับการพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบของไมโครอิมัลชัน (microemulsion) โดยณัฐวดี และ มัลลิกา (2559) เพื่อให้การละลายน้ำดีขึ้นและสะดวกต่อการนำไปใช้จริงในเชิงปฏิบัติหากผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งบิดได้ผลดี

ทำการสุ่มไก่แต่ละ 4 ตัว (เพศผู้ 2 ตัว และเพศเมีย 2 ตัว) เพื่อเก็บตัวอย่างลำไส้ส่วนดูโอเดนิม เจจูนัม และไส้ตัน ภายหลังจากได้รับเชื้อบิด 7 และ 21 วัน ตามลำดับ (ไก่อายุ 21 และ 35 วัน) ทำการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อให้คะแนนทางจุลพยาธิวิทยาตามวิธีของ อาริษา และคณะ (2557) โดยการให้ระดับคะแนนรอยโรคบิดมีตั้งแต่ 0 ถึง 4 ตามวิธีของ สุรพันธ์ (2559) ดังนี้ 0 = ไม่พบรอยโรค; 1 = พบระยะต่างๆ ของเชื้อบิดในเนื้อเยื่อน้อยกว่า 10% ; 2 = พบระยะต่างๆ ของเชื้อบิดในเนื้อเยื่อทั่วไปและพบการอักเสบในเนื้อเยื่อมากกว่า 10% แต่ไม่ถึง 50%; 3 = พบระยะต่างๆ ของเชื้อบิดในเนื้อเยื่อตั้งแต่ 50% ขึ้นไปและมีการอักเสบรุนแรง; 4 = พบระยะต่างๆ ของเชื้อบิดในเนื้อเยื่อกระจายเป็นวงกว้าง พบเนื้อตายและเลือดออกในเนื้อเยื่อ (Figure 2)

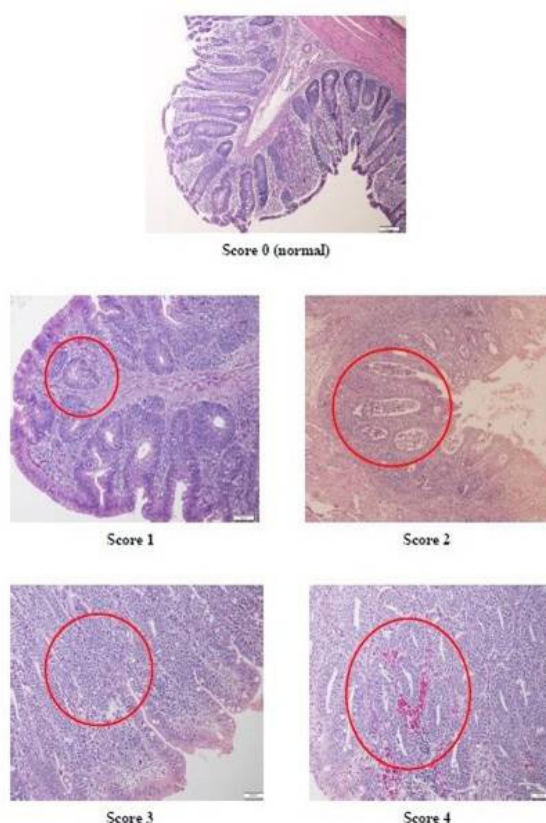


Figure 2 Histopathological lesion scoring of caecal tissue (score 0 = no lesion; score 1 = all stage of coccidiosis found in the tissue is less than 10%; score 2 = moderate level of inflammation and all stage of coccidiosis found is more than 10% but less than 50%; score 3 = moderate to high level of inflammation of coccidiosis affected tissue; score 4 = extensive enteritis with bloody necrosis/content of intestine infected with *Coccidia*)

การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลจากการทดลอง ทำการวิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อปรสิต *E. tenella* ของน้ำมันหอมระเหยอบเชยจีน ในระดับห้องปฏิบัติการ

การศึกษาระดับความเข้มข้นสูงสุดของน้ำมันหอมระเหยอบเชยจีนที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด MDBK พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.006 มคค./มล. และพบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยอบเชยจีนกับเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ MDBK ที่ถูกบุกรุกด้วยสปอโรซอยต์เป็นแบบลอการิทึม (Logarithmic regression) โดยมีสมการดังนี้คือ $y = -9.2791 \ln(x) - 31.5858$ และมีค่า $R^2 = 0.9656$ (Figure 3) และเมื่อคำนวณความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยจีนที่สามารถยับยั้งการบุกรุกเซลล์ของสปอโรซอยต์จากเชื้อ *E. tenella* ที่ระดับ 50 % (IC50) และที่ 100% (IC100) มีค่าเท่ากับ 0.00016 และ 0.03 มคค./มล. ตามลำดับ จากผลการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการดังกล่าว

จึงนำค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการบุกรุกของสปอโรซอยต์จากเชื้อ *E. tenella* ที่ระดับ 100% มาทดสอบในไก่เนื้อ โดยเพิ่มระดับความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยจีนที่ละ 7 เท่า เพื่อให้ครอบคลุมความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่มีค่าเท่ากับ 0.25 มคล./มล. (Oussalah et al., 2006) ซึ่งความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยจีนที่ใช้ในการทดสอบในไก่เนื้อมีจำนวน 3 ระดับคือ 0.03, 0.20 และ 1.40 มคล./มล. ตามลำดับ ผลพบว่าการเสริมน้ำมันอบเชยจีนในน้ำที่ระดับ 1.40 มคล./มล. สามารถยับยั้งการเกิดรอยโรคได้ดีที่สุด ($P < 0.05$) ดังแสดงใน Table 1 แต่ไก่มีปริมาณการกินน้ำและอาหารลดลงอย่างมีนัย

สำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.0001$) ดังแสดงใน Table 2 ที่จะส่งผลเสียต่อสมรรถภาพการผลิตของไก่เนื้อในสภาพการเลี้ยงจริง ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำมันหอมระเหยอบเชยจีนที่มีความเข้มข้น 0.20 มคล./มล. ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อบิดในไส้ตันได้ไม่แตกต่างจากการใช้ที่ระดับ 1.40 มคล./มล. ($P > 0.05$) และไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณการกินน้ำและอาหารของไก่เนื้อสำหรับการทดสอบในการทดลองที่ 2 ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยจีนดังกล่าวสอดคล้องกับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *Listeria monocytogenes* ด้วยการลดค่าความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์แบคทีเรีย และการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Oussalah et al., 2006)

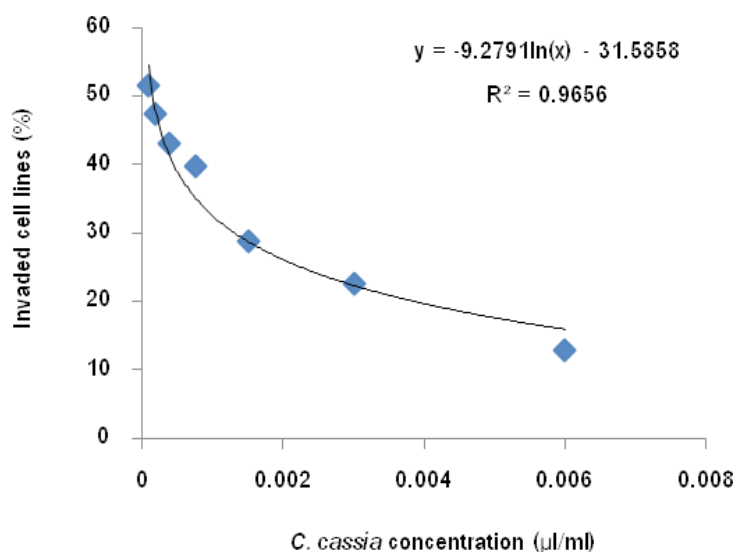


Figure 3 The logarithmic regression between the invaded MDBK cells by *Eimeria* sporozoites and concentrations of *C. cassia* oil.

Table 1 Effect of *Cinnamomum cassia* essential oil through drinking water on pathogenic lesion

score of caecal tissue of broiler	
Treatment	Lesion scoring after oocysts challenge 7 days
<i>C. cassia</i> 0.03 μ l./ml.	2.60 ^a
<i>C. cassia</i> 0.20 μ l./ml.	1.80 ^{ab}
<i>C. cassia</i> 1.40 μ l./ml.	1.17 ^b
SEM	0.30
P-value	0.0204

^{a-b}Means within column with no common superscript differ significantly ($P < 0.05$)

Table 2 Effect of *Cinnamomum cassia* essential oil through drinking water on average water

(ml/b/d) and feed consumption (g/b/d) of broiler during 7 days

Treatment	Water consumption (ml./b/d)	Feed consumption (g/b/d)
<i>C. cassia</i> 0.03 μ l./ml.	102.5 ^A	95.72 ^A
<i>C. cassia</i> 0.20 μ l./ml.	92.92 ^A	91.63 ^A
<i>C. cassia</i> 1.40 μ l./ml.	41.67 ^B	44.27 ^B
SEM	3.37	4.23
P-value	<0.0001	<0.0001

^{A-B}Means within column with no common superscript differ significantly (P<0.0001)

การทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันโรคบิดของผลิตภัณฑ์น้ำมันหอมระเหยอบเชยจีนชนิดละลายน้ำในไก่เนื้อที่เลี้ยงในสภาพปกติ

จากผลการตรวจและให้คะแนนรอยโรคบิดบริเวณลำไส้ส่วนต่างๆภายหลังการกรอกโอโอซิสต์จากเชื้อบิดเป็นเวลา 7 วัน (ไก่อายุ 21 วัน) ซึ่งเป็นระยะเวลาในวงจรชีวิตของเชื้อบิดชนิด *E. tenella* (Conway and McKenzie, 2007) พบว่าไก่ทดลองทุกกลุ่มไม่พบรอยโรคบิดที่บริเวณเนื้อเยื่อลำไส้เล็ก ทั้งส่วนดูโอดินัม และเจจูนัม ซึ่งแสดงว่าไก่ทดลองไม่ได้รับเชื้อบิดจากธรรมชาติ เนื่องจากโอโอซิสต์ที่กรอกให้กับไก่ทดลองมาจากเชื้อ *E. tenella* ที่มีได้ต้นเป็นบริเวณเฉพาะในการเข้าทำลาย (Shirley et al., 2005) ในส่วนของการตรวจรอยโรคของเนื้อเยื่อบริเวณลำไส้ต้นพบว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการกรอกเชื้อบิดไม่พบรอยโรคบิด ดังแสดงใน Table 3 และการได้รับโอโอซิสต์จำนวน 2,500 โอโอซิสต์สามารถก่อให้เกิดรอยโรคบิดที่บริเวณเนื้อเยื่อลำไส้ต้นได้ โดยพบคะแนนรอยโรคเฉลี่ยเท่ากับ 0.94 ในกลุ่มกรอกเชื้อแต่ไม่เสริมสารป้องกันโรคใดๆ ซึ่งแสดงว่ามีการพบเชื้อบิดระยะต่างๆในเนื้อเยื่อไม่เกิน 10% ของเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบทั้งหมด การเสริมสารป้องกันโรคบิดทางการค้า(ซาลิโนมายซิน) ที่ระดับ 50 มก./กก.อาหาร สามารถป้องกันโรคบิดได้ดีที่สุดโดยไม่พบรอยโรคเลย(คะแนนเท่ากับ 0) ทั้งนี้ซาลิโนมายซินเป็นสารในกลุ่มโอโอโนพอร์ที่มีคุณสมบัติทำให้เกิดช่องที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อบิดได้อย่างง่ายดายเนื่องจากมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (lipophilic) และรบกวนสมดุลของประจุที่ไหลเข้าออกภายในเซลล์

เช่น K^+ , Na^+ , Ca^{2+} และ Mg^{2+} เป็นต้น ซึ่งสารซาลิโนมายซินจะทำลายสเปิร์มโรซอຍท์ด้วยการให้ประจุของโซเดียมไหลเข้าสู่เซลล์มากขึ้น ส่งผลให้เซลล์บิดมีการสูญเสียพลังงานในการขับประจุของโซเดียมออกนอกเซลล์ นอกจากนี้การที่ประจุของโซเดียมไหลเข้าสู่เซลล์มากขึ้นส่งผลให้ประจุของคลอไรด์ไหลเข้าสู่เซลล์มากขึ้นด้วย เพื่อรักษาสมดุลของเซลล์ทำให้เซลล์เกิดการบวม น้ำและตายในที่สุด (Huczynski, 2012)

การเสริมด้วยผลิตภัณฑ์น้ำมันอบเชยจีนที่มีความเข้มข้น 0.20 มล./มล.ก่อให้เกิดคะแนนการเกิดรอยโรคเฉลี่ยเท่ากับ 2.06 ซึ่งมีค่ามากกว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดและไม่เสริมสารป้องกันโรคบิดใดๆ ที่มีคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 0.94 ผลดังกล่าวแตกต่างจากรายงานของวรรณวิภาและคณะ (2558) ที่ทำการเสริมน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่างๆ (กระชาย โหระพาและอบเชย) ในน้ำดื่ม หลังการกรอกเชื้อบิด *E. tenella* จำนวน 2,500 โอโอซิสต์/ตัว มีผลช่วยลดคะแนนรอยโรคบิดบริเวณลำไส้ต้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเชื้อบิดและไม่เสริมสารป้องกันโรคบิดใดๆ ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพรวมทั้งเชื้อบิด โดยน้ำมันหอมระเหยมีขนาดโมเลกุลเล็กและมีคุณสมบัติละลายในไขมัน จึงสามารถแทรกซึมและทำความเสียหายให้กับเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อบิด ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ส่งผลให้เกิดการรั่วออกของสารอาหารและประจุภายในเซลล์ทำให้เซลล์ตาย (Remmal et al., 2011) นอกจากนี้สารซาลิโนมายซิน

ลดีไฮด์ที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันอบเชยยังทำให้เกิดการ cross-linked ตรงตำแหน่งของหมู่อะมิโน (-NH₂) ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนในเซลล์ จุลินทรีย์ส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึม และการแบ่งเซลล์ของ จุลินทรีย์ (Prabuseenivasan et al., 2006) จึงสามารถยับยั้ง

เชื้อบิดได้ ความแตกต่างของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อบิดนี้เกิดจากความแตกต่างของสารที่ใช้ในการลดแรงตึงผิวของน้ำมันหอมระเหย โดยวรรณวิภา และคณะ (2558) ใช้ 5% Tween 80 และ 5% ethanol เป็นสารลดแรงตึงผิว ซึ่งไม่มีรายงานถึงผลข้างเคียงต่อเซลล์ในร่างกายสัตว์

Table 3 Effect of *Cinnamomum cassia* essential oil product application through drinking water on histopathological lesion score of caecal tissue of broiler

Treatment	Lesion scoring after oocysts challenge	
	7day	21 day
No. <i>E. tenella</i> +no anticoccidial product	0	0
<i>E. tenella</i> +0 ppm Salinomycin	0.94 ^B	0.25
<i>E. tenella</i> +50 ppm Salinomycin	0	0
<i>E. tenella</i> +0.20µl/ml <i>C. cassia</i> oil	2.06 ^A	0.63
SEM	0.1700	0.0857
P-value	<0.0001	0.2458

^{A-B} Means within column with no common superscript differ significantly (P<0.001)

การที่ผลิตภัณฑ์น้ำมันอบเชยจีนทำให้เกิดคะแนนรอยโรคบิดสูงกว่ากรณีที่ไม่ได้เสริมสารป้องกันโรคบิดใดๆ ในการทดลองนี้อาจมาจากผลกระทบของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมผลิตภัณฑ์ชนิดละลายน้ำ โดยผลิตภัณฑ์น้ำมันอบเชยจีนได้รับการพัฒนาให้อยู่ในรูปของไมโครอิมัลชัน (microemulsion) ด้วยการใช้ Kolliphor® EL ที่มีชื่อเดิมว่า Cremophor EL เป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) และใช้สารTranscutol® HP เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant) ซึ่งประกอบอยู่ในระบบนำส่งยาแบบ SMEDD (self microemulsion drug delivery system) เป็นการพัฒนาระบบอิมัลชันชนิดเกิดได้เองโดยอาศัยสมบัติของสารลดแรงตึงผิวในการทำให้เกิดเป็นหยดของอิมัลชันได้สมบูรณ์มากขึ้น (Wu et al., 2015) อย่างไรก็ตาม Pangen et al. (2017) รายงานว่า สาร Cremophor EL สามารถทำให้เกิดการระคายเคืองหรือการอักเสบของผนังเซลล์ภายในลำไส้ แต่ไม่ส่งผลต่อการดูดซึมของตัวยา โดยมีการวัดเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) ที่เป็นเอนไซม์ที่บ่งบอกถึงการระคายเคืองหรือการได้รับบาดเจ็บของเนื้อเยื่อซึ่ง Cremophor EL ที่ความเข้มข้น 10% (v/v) ส่งผลทำให้เกิดการรั่วไหลของ LDH

ในไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ทำให้ LDH มีค่าสูงขึ้น (Hamid et al., 2009) ดังนั้นการใช้ผลิตภัณฑ์น้ำมันอบเชยจีนในน้ำดื่มในรูปของไมโครอิมัลชันจึงอาจส่งผลให้เซลล์ของลำไส้เกิดการระคายเคืองหรืออักเสบ ทำให้ง่ายต่อการติดเชื้อบิดมากขึ้น

การตรวจรอยโรคบิดบริเวณเนื้อเยื่อไส้ตันภายหลังการกรอกเชื้อบิด 21 วัน (ไก่มีอายุ 35 วัน) ให้ผลตอบสนองเป็นไปในทิศทางเดียวกับผลที่ 7 วัน หลังการกรอกเชื้อ แต่มีคะแนนรอยโรคลดน้อยลงมากจนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ในระหว่างกลุ่มทดลองดังแสดงใน Table 3 ทั้งนี้คาดว่าเกิดจากการฟื้นฟูสภาพของเนื้อเยื่อที่ได้รับการติดเชื้อบิด ประกอบกับสัตว์มีภูมิคุ้มกันมากขึ้น Laurent et al. (2001) รายงานว่าไก่ที่ได้รับเชื้อบิด *E. tenella* จะมีการสร้างภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นทั้งการสร้างแอนติบอดี (antibody) และภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell mediated immunity) ด้วยการหลั่งสารไซโตไคน์ (cytokine) ที่เกี่ยวข้องกับการบวนการอักเสบภายในร่างกายเพิ่มขึ้นหลายเท่าเมื่อเทียบกับสภาพปกติ อาทิ interleukin-1 β (IL-1 β) และ macrophage inflammatory factor 1 β (MIP-1 β) เป็นต้นเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมรวมทั้งเชื้อบิด ส่งผลให้เนื้อเยื่อที่ติดเชื้อมีสภาพดีขึ้น

สรุป

การทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า น้ำมันหอมระเหยอบเชยจีนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อบิดชนิด *E. tenella* โดยมีค่า IC50 และ IC100 เท่ากับ 0.00016 และ 0.03 มคล./มล.ตามลำดับ และความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อบิดในตัวไก่เนื้อโดยไม่มีผลกระทบต่อการกินอาหารและน้ำหนักเท่ากับ 0.20 มคล./มล. อย่างไรก็ตามการใช้ น้ำมันอบเชยจีนในรูปแบบของผลิตภัณฑ์ไม่โครอิมัลชัน และมีระบบนำส่งยาแบบ SMEDD ที่ความเข้มข้น 0.20 มคล./มล. ละลายในน้ำดื่มแสดงประสิทธิภาพในการป้องกันโรคบิดที่เกิดจาก *E. tenella* ได้ต่ำกว่าผลการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ จากผลกระทบของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในการเตรียมผลิตภัณฑ์ ดังนั้นควรมีการปรับชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่เน้นให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวและละลายน้ำได้ดีเพื่อให้ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อบิดในระบบทางเดินอาหารเท่านั้น

คำขอบคุณ

คณะวิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- ณัฐรุณี เจริญไทย และ มัลลิกา ชมนาวัง. 2559. การพัฒนาน้ำมันอบเชยจีนชนิดระบบนำส่งยาแบบกอลให้เกิดไมโครอิมัลชันเองเพื่อใช้ในการต้านจุลชีพในไก่เนื้อ. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ.
- วรรณวิภา วรธนศิริ, นันทวัน บุญยะประภัศร, ทวีศักดิ์ ส่งเสริม และ นวลจันทร์ พารักษา. 2558. การใช้ผลิตภัณฑ์น้ำมันหอมระเหยชนิดละลายน้ำเพื่อป้องกันโรคบิดในไก่เนื้อ. แก่นเกษตร. 43: 729-738.
- สุรพันธ์ จิตวิริยนนท์. 2559. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการป้องกันโรคบิดในไก่เนื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัทยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อรัญญา มโนสร้อย และจิเรศ มโนสร้อย. 2548. น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากสมุนไพร. โรงพิมพ์ครองช้าง. เชียงใหม่.
- อาริษา แสงศรี, เสาวลักษณ์ จงประกิจพงษ์ และอำไพ นุสสติ. 2557. การเตรียมขี้เนื้อเยื่อด้วยน้ำยาเคมีเพื่อการตรวจทางพยาธิวิทยาโดยปราศจากไขมัน. สถาบันพยาธิวิทยา, กรมการแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข.
- Chapman, H.D. 2014. Milestones in avian coccidiosis research: a review. Poult. Sci. 93: 501-511.
- Conway, D.P. and M.E. McKenzie. 2007. Poultry Coccidiosis Diagnostic and Testing Procedures. 3rd ed. Blackwell Publishing Asia, Australia.
- Gerhold, R. W. 2016. Overview of coccidiosis in poultry. Veterinary Manual. Available Source: www.msdsmanual.com/poultry/Coccidiosis/overview-of-coccidiosis-in-poultry, March 6, 2018.
- Hamid, K. A., H. Katsumi, T. Sakane, and A. Yamamoto. 2009. The effects of common solubilizing agents on the intestinal membrane barrier functions and membrane toxicity in rats. Int. J. Pharm. 379: 100-108.
- Huczynski, A. 2012. Salinomycin: a new cancer drug candidate. Chem. Biol. Drug Des. 79: 235-238.
- Jitviriyanon, S., P. Phanthong, P. Lomarat, N. Bunyapraphatsara, S. Pomtrakulpipat, and N. Paraksa. 2016. In vitro study of anti-coccidial activity of essential oils from indigenous plants against *Eimeria tenella*. Vet. Parasitol. 228: 96-102.
- Krishan, G and A. Narang. 2014. Use of essential oils in poultry nutrition: a new approach. J. Adv. Vet. Anim. Res.1: 156-162.

- Laurent, F., R. Mancassola, S. Lacroix, R. Menezes, and M. Naciri. 2001. Analysis of chicken mucosal immune response to *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infection by quantitative reverse transcription-PCR. *Infect. Immun.* 69: 2527-2534.
- Lee, S. H., H. S. Lillehoj, S. I. Jang, K. W. Lee, M. S. Park, D. Bravo, and E. P. Lillehoj. 2011. Cinnamaldehyde enhances in vitro parameters of immunity and reduces in vivo infection against avian Coccidiosis. *Br. J. Nutr.* 106: 862-869.
- Lorian, V. 1988. Differences between in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 32: 1600-1601.
- Markiewicz, W., D. Barski, A. Burmanczuk, and E. Tomaszewska. 2014. Toxicity of salinomycin and narasin in turkeys. *J. Elem.* 19: 903-914.
- National Research Council (NRC). 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Oussalah, M., S. Caillet, and M. Lacroix. 2006. Mechanism of action of Spanish Oregano, Chinese cinnamon, and Savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogens*. *J. Food Prot.* 69: 1046-1055.
- Pangeni, R., S. W. Kang, M. Oak, E. U. Park, and J. W. Park. 2017. Oral delivery of quercetin in oil-in-water nanoemulsion: In vitro characterization and in vivo anti-obesity efficacy in mice. *J. Funct. Foods.* 38: 571-581.
- Prabuseenivasan, S., M. Jayakumar, and S. Ignacimuthu. 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern. Med.* 6: 39-46.
- Quiroz-Castañeda. 2018. Avian Coccidiosis, new Strategies of treatment. In *farm animals diseases*, Available: <http://www.intechopen.com/books/farm-animals-diseases-recent-omic-trends-and-new-strategies-of-treatment>. Accessed January 4, 2019.
- Remmal, A., S. Achahbar, L. Bouddine, N. Chami, and F. Chami. 2011. In vitro destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. *Vet. Parasitol.* 182: 121-126.
- Remmal, A., S. Achahbar, L. Bouddine, F. Chami, and N. Chami. 2013. Oocysticidal effect of essential oil components against chicken *Eimeria* oocysts. *Int. J. Vet. Med. Res. Rep.* 2013: 1-8.
- Schmatz, D. M., M. S. Crane, and P. K., Murray. 1984. Purification of *Eimeria* sporozoites by DE-52 anion exchange chromatography. *J. Protozool.* 31: 181-183.
- Shirley, M.W., A.L. Smith, and F.M. Tomley. 2005. The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. *Adv. Parasit.* 60: 285-330.
- Wu, L., Y. Qiao, L. Wang, J. Guo, G. Wang, W. He, L. Yin, and J. Zhao. 2015. A self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for a novel medicative compound against depression: a preparation and bioavailability study in rats. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 16: 1051-1058.