

Thesis Title Development of Feed Additive from Edible Zingiberaceae Species to Control Infectious Diseases in Swine

Author Miss Waranee Prakatthagomol

Degree Doctor of Philosophy (Pharmacy)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Siriporn Okonogi Advisor

Assoc. Prof. Dr. Jakkapan Sirithunyalug Co-advisor

Asst. Prof. Dr. Songwut Yotsawimonwat Co-advisor

ABSTRACT

The following study was conducted to develop the feed additive from Thai medicinal plants belong to Zingiberaceae species and investigate its potential.

The essential oil and three crude extracts of *C. longa*, *Z. cussumunar* Roxb from hexane, ethyl acetate, and ethanol were studied on their antibacterial activity against bacteria by disc diffusion method. The essential oil of *A. galanga* (EOAG) had showed the highest antibacterial activity. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values of the essential oil which studied by agar and broth dilution methods were obviously lower than that of gentamicin in all of tested bacteria. More interestingly, EOAG showed more pronounced killing on gram negative than gram positive bacteria. The killing kinetic bactericidal action of the essential oil was extremely higher than gentamicin. The killing time of *E. coli* ATCC 25922 was 5 minutes after exposed. The electron

microscopic figures indicated that the bacterial morphology change occurred after exposed to the oil. The mechanisms of antibacterial action revealed that EOAG affects directly the bacterial membrane leading to morphological changes and finally causes of cell lyses and death.

From the *in vitro* antibacterial study, EOAG were selected for used as active ingredient in further study. The GC-MS revealed that EOAG consisted mainly of monoterpenoid; 1,8- cineole (44.94%) and sesquiterpene; beta-bisabolene (11.46%).

EOAG was used to produce granule by wet granulation method. The effect of three excipients, tapioca starch, wheat starch, and corn starch, on the EOAG granule properties was determined. Tapioca starch showed the outstanding advantages regarded to percent yield, friability, flow ability compared to the others. The stability study of the EOAG granules using 1,8 cineole as the marker revealed that EOAG tapioca granules had higher stability than others. From this point of view, EOAG tapioca granules were further investigated for their potential approaches as feed additives on animal.

Prior to use in animal, the toxicity of EOAG was determined in rats. EOAG was feed directly to the rats via gastrointestinal tube for 14 days. The experimental animals were divided in four groups, 1) negative control, 2) received 1 mg of EOAG/kg BW, 3) received 2 mg of EOAG/kg BW, 4) received 3 mg of EOAG/kg BW. The mortality among all treatment groups did not vary significantly. Significant change was observed from performance index, blood chemistry such as BUN, creatinine, AST, ALT, and pathological remarks in rats. This result indicated that EOAG should not be directly administered to the animals.

A 39-d feeding trial in weaning pig was carried out to study the influence of granule on feed consumption, body weight gain, and feed conversion. There were 4 dietary treatments groups: 1) negative control (NC) basal diet containing no plant extracts or antibiotic, 2) basal diet plus low level of EOAG granule (LG) at 1000 g/ton of feed, 3) basal diet plus high level of EOAG granule (HG) at 2000 g /ton of feed, 4) positive control (PC) containing colistin at 100 g/ton of feed. The significant changes in body weight gain were observed with the HG compared to the NC or LG. The HG increased body weight gain compare to the NC and LG. Neither difference in feed efficiency nor feed consumption was observed among all treatments. The HG supplement showed the enhancement of villous height and cell area in small intestine. The diarrhea score in HG group was lower than NC and LG but still higher than PC. This score was correlated to the number of *E. coli* isolated from feces. There was no significant change in intestinal enzyme activity, blood parameters, and blood chemistry profile through the period of study.

EOAG can be considered as a promising active ingredient in feed additive due to its efficacy in growth performance of animals and antibacterial as well as non-negative impact on blood parameters, blood chemistry profile, liver and kidney functions. The results of this study suggested the use of EOAG instead of colistin as a prophylactic agent in dealing with *E. coli* diarrhea in weaning pigs. Optimal EOAG granule levels could be increased up to 2000 ppm or higher in feed.

Keywords: Zingiberaceae, antibacterial, feed additives, swine, toxicity.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาสารเติมแต่งอาหารสัตว์จากพืชตระกูล Zingiberaceae ที่
รับประทานได้เพื่อควบคุมโรคติดเชื้อในสุกร

ผู้เขียน นางสาว วารณีย์ ประกัษฐโกมล

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. ศิริพร โอโกโนกิ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

รศ.ดร. จักรพันธ์ ศิริชัยญาติกษณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ผศ.ดร. ทรงวุฒิ ยศวิมลวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสารเติมแต่งอาหารสัตว์จากพืชสมุนไพรไทย
วงศ์ขิงและศึกษาถึงผลการใช้ในสัตว์ น้ำมันหอมระเหย และ สารสกัดหยาบสามชนิดของ ขมิ้น,
ไพล, และข่า ซึ่งสกัดโดย เฮกเซน เอธิลอะซิเตต และ เอทานอล ถูกนำมาศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อ
แบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากข่าแสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย
สูงสุด การศึกษาต่อพบว่าค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และ ค่า
ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ของน้ำมันหอมระเหยจากข่าต่ำกว่าของ เจนด้ามัยซิน เมื่อ
ทดสอบด้วยวิธี agar และ broth dilution ในเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ พบว่าน้ำมันหอม
ระเหยจากข่าฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแกรมบวก การศึกษาระยะเวลาในการฆ่าเชื้อพบว่า
น้ำมันหอมระเหยจากข่าสามารถฆ่าเชื้ออี. โคไลสายพันธุ์มาตรฐาน ได้ดีกว่า เจนด้ามัยซิน โดย
สามารถฆ่าได้ภายในเวลา 5 นาที ผลจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าน้ำมัน
หอมระเหยจากข่าทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโดยทำที่สุดทำให้เกิดการ
ตายของแบคทีเรีย

จากผลการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียจึงเลือกน้ำมันหอมระเหยข่ามาเป็น
สารสำคัญในการศึกษาต่อไป ผลจาก GC-MS พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากข่าประกอบไปด้วย

โมนิเทอร์ปีนอยด์; 1, 8 cineole (44.94%) เป็นสารสำคัญ และ ยังประกอบไปด้วย เซสควิเทอร์พีน; beta - bisabolene (11.46%) น้ำมันหอมระเหยข่าถูกนำมาเตรียมแกรนูลโดยใช้วิธีการทำแกรนูลแบบเปียก การศึกษาอิทธิพลของสารเพิ่มปริมาณสามชนิดคือ แป้งมันสำปะหลัง แป้งสาลี และ แป้งข้าวโพด พบว่าแกรนูลจากแป้งมันสำปะหลังแสดงข้อดี เช่น เฟอร์เซ็นต์ผลผลิต ความกรอบ การไหล เหนือกว่าแกรนูลที่ได้จากสารเพิ่มปริมาณชนิดอื่นๆ การศึกษาความคงตัวของแกรนูลโดยใช้ 1,8 cineole เป็นดัชนี พบว่าแกรนูลจากแป้งมันสำปะหลังมีความคงตัวของสารสำคัญสูงกว่าแกรนูลชนิดอื่นๆ ดังนั้นจึงเลือกแกรนูลจากแป้งมันสำปะหลังเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในสัตว์ต่อไป

ก่อนการนำไปใช้ในสัตว์ได้มีการศึกษาพิษวิทยาในหนูทดลองโดยให้น้ำมันหอมระเหย โดยการสอดท่อเข้าสู่กระเพาะอาหารสัตว์ เป็นเวลา 14 วัน ซึ่งแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 4 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มควบคุม 2) กลุ่มที่ได้รับน้ำมันหอมระเหย 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว 3) กลุ่มที่ได้รับน้ำมันหอมระเหย 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว 4) กลุ่มที่ได้รับน้ำมันหอมระเหย 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว อัตราการตายในกลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม แต่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าดัชนีที่สนใจเช่นประสิทธิภาพการผลิต ค่าเคมีในเลือด เช่น ค่า Blood urea nitrogen (BUN), ปริมาณ creatinine, ระดับเอนไซม์ Aspartate Aminotransferase (AST), และระดับเอนไซม์ Alanine Aminotransferase (ALT) และมีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา เกิดขึ้นในหนูทดลองที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยข่า ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าไม่ควรให้น้ำมันหอมระเหยข่าโดยตรงกับสัตว์

การทดลองในสุกรเพื่อศึกษาผลของแกรนูลข่าต่ออัตราการกินได้ อัตราการเจริญเติบโต และ อัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเวลา 39 วัน ซึ่งมีการแบ่งกลุ่มการทดลองดังนี้ 1) กลุ่มควบคุม, 2) กลุ่มที่ได้รับแกรนูลน้ำมันหอมระเหยข่า 1000 พีพีเอ็ม, 3) กลุ่มที่ได้รับแกรนูลน้ำมันหอมระเหยข่า 2000 พีพีเอ็ม, 4) กลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะโคลิสติน 100 พีพีเอ็ม พบว่าในกลุ่มสุกรทดลองที่ได้รับแกรนูลน้ำมันหอมระเหยข่าในปริมาณ 2000 พีพีเอ็ม มีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแกรนูลน้ำมันหอมระเหยข่าขนาด 1000 พีพีเอ็ม ในขณะที่อัตราการแลกเปลี่ยนอาหารและอัตราการกินได้ไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มที่ได้รับแกรนูลน้ำมันหอมระเหยข่า 2000 พีพีเอ็ม มีการกระตุ้นทำให้ความสูงของวิลไลและ พื้นที่เซลล์เพิ่มสูงขึ้น อัตราการท้องเสียในกลุ่มที่ได้รับแกรนูลข่า 2000 พีพีเอ็ม ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมแต่ยังคงสูงกว่ากลุ่มที่

ได้รับยาปฏิชีวนะซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณของเชื้อ อี. โคลิที่พบในอุจจาระ นอกจากนี้ไม่พบความเปลี่ยนแปลงของการทำงานของเอนไซม์ในลำไส้ ค่าทางโลหิตวิทยา และค่าเคมีในเลือด ตลอดระยะเวลาการทดลอง

น้ำมันหอมระเหยฆ่าแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติที่ดีในการเป็นสารสำคัญในสารเติมแต่งอาหารสัตว์ โดยมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียและกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อค่าทางโลหิตวิทยา ค่าทางเคมีในเลือดที่แสดงถึงการทำงานของตับและไต ในการศึกษา นี้แนะนำให้ใช้น้ำมันหอมระเหยฆ่าในการป้องกันปัญหาท้องเสียจากเชื้อ อี. โคลิ ในลูกสุกรหลังหย่านมเพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะ โคลิสติน ปริมาณการใช้ที่เหมาะสมของแกรนูลน้ำมันหอมระเหยฆ่า คือ 2000 พีพีเอ็ม หรือมากกว่าในอาหารสัตว์

คำสำคัญ: วงศ์ขิง, ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย, สารเติมแต่งอาหารสัตว์, สุกร, พืชวิทยา