Research Article

Received: May 30, 2019; Accepted: July 3, 2020

ผลของการเสริมน้ำมันหอมระเหยในอาหารต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานโรคของปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

Effects of Dietary Essential Oils Supplementation on the Growth Performance, Blood Parameters, Non-Specific Immunity and Disease Resistance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

นพดล ศุกระกาญจน์*, กฤษณะ เรืองคล้าย และพันธสิทธิ์ โชคสวัสดิกร

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ตำบลบ้านพร้าว อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93210

Noppadon Sukrakanchana*, Kritsana Ruangkhlaii and Puntasit Choksawasdikorn

Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung Campus, Baan Prao, Papayom, Phatthalung 93210

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของการเสริมน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชท้องถิ่น 3 ชนิด ได้แก่ ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*) มะกรูด (*Citrus hystrix*) และสะระแหน่ (*Mentha cordifolia*) ในอาหารต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานต่อการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยทดลองให้อาหารผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ผิวมะกรูด และสะระแหน่ ที่ระดับ 0.5 ml/kg อาหาร เท่ากัน และชุดควบคุมให้อาหารปกติ เป็นเวลา 75 วัน นำปลามาวัดอัตราการเจริญเติบโต วิเคราะห์องค์ประกอบเลือด ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ แล้วชักนำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* บันทึกอัตราการตายสะสมภายใน 10 วัน ผลการศึกษาพบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันสะระแหน่มีค่าการเจริญเติบโต ได้แก่ น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ และชุดควบคุม และปลาในทุกชุดการทดลองมีค่าองค์ประกอบเลือด ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดง ค่าฮีมาโตคริต และปริมาณฮีโมโกลบินเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า lysozyme activity ในน้ำเลือดของปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหยในแต่ละชุดการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าปลานิลในทุกชุดการทดลองมีอัตราการรอดจากการชักนำให้ติดเชื้อไม่ต่างกัน แต่ปลากลุ่มที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหย โดยเฉพาะน้ำมัน

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** sukrakanchana@hotmail.com **doi:** 10.14456/tstj.2021.18

สะระแหน่ มีแนวโน้มการตายต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปลาในชุดควบคุม ผลการศึกษาจึงชี้ให้เห็นว่าการเสริมน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ในอาหารมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด และมีแนวโน้มของอัตรารอดจากการติดเชื้อที่สูงขึ้นในปลานิล

คำสำคัญ : น้ำมันหอมระเหย; การเจริญเติบโต; องค์ประกอบเลือด; ภูมิคุ้มกัน; โรค; ปลานิล

Abstract

The present study investigated the effects of essential oils extracted from lemongrass (*Cymbopogon citratus*), Kaffir lime (*Citrus hystrix*) and peppermint (*Mentha cordifolia*) as feed supplement on growth performance, blood parameters, non-specific immunity and disease resistance against *Streptococcus agalactiae* of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The fish were fed with diets supplemented with lemongrass, Kaffir lime peel and peppermint essential oil at the same ratio of 0.5 ml/kg feed and a control group was fed with basal diet. After 75 days of feeding, growth performance, blood parameters and non-specific immunity of fish were investigated. After feeding trial, fish were also challenged with *S. agalactiae* and mortalities were recorded. Results of this study showed that peppermint essential oil at 0.5 ml/kg feed significantly improved final body weight, weight gain and specific growth rate ($p < 0.05$). All supplemented diets showed significantly increased total erythrocyte count, hematocrit levels and hemoglobin ($p < 0.05$). In addition, fish fed essential oil supplemented diets showed no significant increases of both lysozyme activity and survival rate following *S. agalactiae* infection, compared with those of the control group. The results indicated that peppermint essential oil supplementation potentially improved growth performance, some blood parameters and tendency toward decreased mortality after bacterial infection of cultured tilapia.

Keywords: essential oil; growth performance; blood parameter; fish immunity; disease; Nile tilapia

1. บทนำ

น้ำมันหอมระเหย (essential oil) เป็นส่วนของของเหลวที่ระเหยได้และมีกลิ่น ได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช ได้แก่ ดอก เมล็ด ใบ กิ่ง เปลือกไม้ ผล และราก [1] มีวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชหลายวิธี ได้แก่ การบด การหมัก การสกัด การใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลว และการใช้คลื่นไมโครเวฟ แต่วิธีการสกัดที่ใช้กันเป็นส่วนใหญ่ในการผลิตน้ำมันหอมระเหยเชิงพาณิชย์จะเป็นวิธีการสกัดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) หรือการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วตามด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำ [2,3] น้ำมันหอมระเหยได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (USFDA) ให้เป็นสารที่มีความปลอดภัย ระยะเวลากว่าสิบปีที่ผ่านมานั้นมีการวิจัยเพื่อการใช้ประโยชน์จากน้ำมันหอมระเหยในด้านต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะการประยุกต์ใช้น้ำมันหอมระเหยเป็นสารกระตุ้นการ

เจริญเติบโต (growth promoter) ในสัตว์เศรษฐกิจทดแทนการผสมยาปฏิชีวนะในอาหาร โดยเฉพาะน้ำมันหอมระเหยกลุ่ม carvacrol และ thymol จาก oregano ซึ่งมีรายงานพบว่ามีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์บกและสัตว์น้ำหลายชนิด [4-8] นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ (lemongrass oil) น้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ (pepermint) และน้ำมันหอมระเหยจาก thyme ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในสัตว์น้ำหลายชนิดอีกด้วย [9-15]

การศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้น้ำมันหอมระเหยเพื่อผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำจึงเป็นแนวโน้มที่น่าสนใจอันจะนำไปสู่การพัฒนาการผลิตสัตว์น้ำที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และลดการใช้ยาและสารเคมีเพื่อการควบคุมโรคในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะปลานิลซึ่งเป็นปลาน้ำจืดจากการเพาะเลี้ยงที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยในปัจจุบัน แต่กำลังประสบปัญหาจากโรคติดเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะโรค Streptococcosis ซึ่งมีสาเหตุจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptococcus* sp. นำมาซึ่งความสูญเสียต่อผลผลิตของผู้ประกอบการ งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของการเสริมน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชท้องถิ่นของไทยชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*) มะกรูด (*Citrus hystrix*) และสะระแหน่ (*Mentha cordifolia*) ในอาหารต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานโรคของปลานิล อันอาจนำไปสู่แนวทางการเพิ่มผลผลิตและลดความสูญเสียจากโรคติดเชื้อในระบบการเพาะเลี้ยงปลานิลได้ในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สัตว์ทดลองและการวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยนำปลานิล (*Oreochromis niloticus*) น้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 15 กรัม จากฟาร์มในจังหวัดพัทลุงมาปล่อยลงเลี้ยงในบ่อคอนกรีตขนาด 1.3x2.8x1.1 เมตร บ่อละ 100 ตัว จำนวน 12 บ่อ ให้อาหารปกติ (basal diet) ซึ่งเป็นอาหารเม็ดลอยน้ำสำเร็จรูปสำหรับปลากินพืชที่มีระดับโปรตีนไม่น้อยกว่า 30 % เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้ปลาคุ้นเคยกับสภาพการทดลอง หลังจากนั้นเริ่มให้อาหารที่ผสมน้ำมันหอมระเหยชนิดต่าง ๆ ใช้น้ำมันหอมระเหยสกัดสำเร็จโดยการกลั่นด้วยไอน้ำภายใต้ชื่อทางการค้า BOTANICESSENCE แบ่งการทดลองเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ประกอบด้วยชุดทดลอง 1 (T1) ชุดควบคุม ให้อาหารปกติ (basal diet) ชุดทดลอง 2 (T2) ให้อาหารผสมน้ำมันตะไคร้ (lemongrass oil) ที่ระดับ 0.5 ml/kg อาหาร ชุดทดลอง 3 (T3) ให้อาหารผสมน้ำมันผิวมะกรูด (Kaffir lime peel oil) ที่ระดับ 0.5 mL/kg อาหาร ชุดทดลอง 4 (T4) ให้อาหารผสมน้ำมันสะระแหน่ (peppermint oil) ที่ระดับ 0.5 mL/kg อาหาร

การผสมน้ำมันหอมระเหยในอาหารจะใช้วิธีการฉีดพ่น ทั้งนี้เพื่อลดการสูญเสียของน้ำมันหอมระเหยจะผสมน้ำมันหอมระเหยลงในอาหารสำหรับให้ปลากินวันต่อวัน โดยผสมน้ำมันหอมระเหยในปริมาตรที่สัมพันธ์กับปริมาณอาหารสำหรับให้ปลากินในแต่ละวันกับน้ำและสารกลุ่ม phospholipid (lecithin) ฉีดพ่นให้น้ำมันหอมระเหยเคลือบบนเม็ดอาหารอย่างสม่ำเสมอแล้วนำไปให้ปลากินทันที (ชุดควบคุมฉีดพ่นอาหารด้วยน้ำผสม lecithin) โดยให้อาหารปลาวันละ 2 ครั้ง ปริมาณ 3-5 % ของน้ำหนักตัวต่อวัน เป็นเวลา 75 วัน วัดค่าอัตราการเจริญเติบโต และสุ่มเก็บตัวอย่างปลาซ้ำละ 30 ตัว เพื่อตรวจวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบ

เลือด ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือด ค่าฮีมาโตคริต และปริมาณฮีโมโกลบิน และค่าปัจจัยด้านภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ คือ lysozyme activity แล้วนำปลา 30 ตัว จากแต่ละชุดการทดลองมาทดสอบความต้านทานโรค โดยการชักนำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค Streptococcosis ในปลานิล

2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดและปัจจัยทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

สลบปลาด้วยสารละลาย ethyl 3-amino benzoate methanesulfonate (MS-222) (Sigma-Aldrich) ความเข้มข้น 100 ppm ชั่งน้ำหนัก แล้วเก็บเลือดปลาตัวละประมาณ 0.5 mL (น้ำหนักปลาหลังสิ้นสุดการทดลองอยู่ระหว่าง 70-100 กรัมต่อตัว) โดยใช้เข็มขนาด 25G และหลอดฉีดยาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งหล่อภายในด้วย heparin sodium salt (Sigma-Aldrich) 5 mg/mL เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว โดยเจาะจากเส้นเลือดบริเวณโคนหางของปลา แล้วนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด โดยเลือดส่วนที่เหลือทิ้งไว้ให้แข็งตัวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนของน้ำเลือด (serum) ใส่ในหลอดใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการวิเคราะห์ปัจจัยทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (lysozyme activity) ต่อไป

2.2.1 ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (total erythrocyte/leucocyte count)

การนับปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวจะใช้วิธีการเดียวกัน [16] โดยเจือจางเลือดปลาในสีย้อม Dacie's fluid อัตราส่วน 1:100 แล้วนับจำนวนโดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด (Neubauer cell counting chamber) คำนวณปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวทั้งหมดในหน่วย cells/µL

2.2.2 ค่าฮีมาโตคริต

วัดค่าฮีมาโตคริต (haematocrit) ด้วยวิธี microhaematocrit โดยบรรจุเลือดปลาเข้าไปในหลอด capillary แล้วปิดปลายด้านหนึ่งของหลอดด้วยซิลิโคน นำหลอดไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที คำนวนเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริตโดยวัดสัดส่วนของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่อปริมาตรของเลือดทั้งหมด [17]

2.2.3 ปริมาณฮีโมโกลบิน

วิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบิน (haemoglobin) ด้วยวิธี cyanmethemoglobin [18] โดยหยดเลือดตัวอย่างปริมาตร 20 µL ลงในหลอดที่บรรจุ Drabkin's solution ปริมาตร 5 mL (20 mg potassium ferricyanide และ 50 mg potassium cyanide ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) ผสมให้เข้ากันดี แล้วทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer คำนวณความเข้มข้นของฮีโมโกลบินในหน่วย g/dL โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของฮีโมโกลบินมาตรฐาน (human haemoglobin)

2.2.4 lysozyme activity assay

วัดความว่องไวของปฏิกิริยาของ lysozyme ในน้ำเลือดในการย่อยสลายเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกชนิด *Micrococcus lysodeikticus* [19] โดยเตรียมสารละลาย *M. lysodeikticus* (Sigma®) ความเข้มข้น 0.2 mg/mL ใน sodium phosphate buffer, pH 6 เติมน้ำเลือดลงใน microtitre plate ปริมาตรหลุมละ 10 µL จากนั้นจึงเติมสารละลาย *M. lysodeikticus* ปริมาตร 250 µL ลงในแต่ละหลุม วัดค่าดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง ELISA reader หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องภายในเวลา 0.5 ถึง 6.5 นาที คำนวณ lysozyme

activity โดยที่หนึ่งหน่วยของปฏิกิริยาคือปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลง 0.001 ต่อนาที

2.3 การวิเคราะห์การเจริญเติบโต

หลังจากการทดลองให้อาหารเป็นเวลา 75 วัน วัดค่าอัตราการเจริญเติบโตของปลาในแต่ละชุดการทดลอง ประกอบด้วยน้ำหนักตัวเริ่มต้น (initial body weight; g) น้ำหนักตัวสุดท้าย (final body weight; g) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain; %) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR; % day^{-1}) อัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio; FCR) และอัตราการรอด (survival rate; %) โดยที่

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain; %) = [(น้ำหนักปลาสุดท้าย - น้ำหนักปลาเริ่มต้น) ÷ น้ำหนักปลาเริ่มต้น] x 100

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate; SGR; % day^{-1}) = [(ln น้ำหนักปลาสุดท้าย - ln น้ำหนักปลาเริ่มต้น) ÷ ระยะเวลาทดลอง (วัน)] x 100

อัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio; FCR) = น้ำหนักอาหารที่ปลากิน ÷ น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น

อัตราการรอด (%) = (จำนวนปลาเริ่มต้น – จำนวนปลาสุดท้าย) x 100

2.4 การทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย

ใช้แบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* (serotype III) ที่แยกได้จากปลานิลที่แสดงอาการของโรค Streptococcosis (ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) เลี้ยงบนอาหาร tryptic soy agar (TSA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเพาะเลี้ยง (inoculate) ในอาหารเหลว tryptic soy broth (TSB) บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง รวบรวมเซลล์แบคทีเรียโดยการหมุนเหวี่ยง แล้วล้างด้วย TSB สามครั้ง จนได้สารละลายเชื้อเข้มข้น หาความหนาแน่นของเชื้อในสารละลายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และเปรียบเทียบความขุ่นกับสารละลาย McFarland standard เติมสารละลายเชื้อเข้มข้นในปริมาตรที่ทำให้มีความหนาแน่นของเชื้อที่ระดับ 10^8 CFU/mL ลงไปในตู้กระจกซึ่งมีน้ำ 30 ลิตร (แต่ละตู้มีปลา 10 ตัว) บันทึกอัตราการตายสะสมของปลาภายในเวลา 10 วัน และยืนยันการติดเชื้อ *S. agalactiae* ของปลาที่ตายด้วยการแยกเชื้อจากสมองและอวัยวะภายใน เพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA สังเกตลักษณะของโคโลนีสีขาวขนาดเล็กที่เจริญบนอาหาร และนำไปย้อมสี Gram

2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ อัตราการรอด องค์ประกอบเลือด ปัจจัยทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และอัตราการรอดจากการทดสอบความต้านทานโรคของปลาในแต่ละชุดการทดลอง โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one way analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$

3. ผลการวิจัย

การทดลองเลี้ยงปลานิลในบ่อคอนกรีตด้วยอาหารที่มีระดับโปรตีน 30 % ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 75 วัน แล้ววัดดัชนีการเจริญเติบโต ประกอบด้วยน้ำหนักตัวเริ่มต้น น้ำหนักตัวสุดท้าย ร้อยละน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการรอด หลังสิ้นสุดการทดลองพบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันตะไคร้

(T2) น้ำมันผิวมะกรูด (T3) มีค่าการเจริญเติบโตทุกดัชนีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในชุดควบคุม (T1) ยกเว้นปลานิลที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันสะระแหน่ที่ระดับ 0.5 mL/kg อาหาร (T4) มีน้ำหนักตัวสุดท้าย ร้อยละน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในชุดทดลองอื่น ๆ และปลาในชุดควบคุม อย่างไรก็ตามพบว่าปลานิลในทุกชุดการทดลองมีอัตราการแลกเนื้อ (FCR) และอัตราการรอดตลอดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยอัตราการแลกเนื้อมีค่า 0.85-0.88 และอัตราการรอด 97.66-99.66 % (ตารางที่ 1)

หลังสิ้นสุดการทดลอง แล้วเก็บเลือดปลามาวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด ซึ่งประกอบด้วยปริมาณเม็ดเลือดแดงทั้งหมด ปริมาณฮีโมโกลบิน ค่าฮีมาโตคริต และปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมด พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันตะไคร้ (T2) น้ำมันผิวมะกรูด (T3) และน้ำมันสะระแหน่ที่ระดับ 0.5 mL/kg อาหาร (T4) มีปริมาณเม็ดเลือดแดงทั้งหมด ปริมาณฮีโมโกลบินและค่าฮีมาโตคริตเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในชุด

Table 1 Growth performance, feed utilization and survival rate of fish fed different kinds of essential oil supplemented diet for 75 days

Treatments	Initial body weight (g/fish)	Final body weight (g/fish)	Weight gain (%)	Specific growth rate (% day^{-1})	FCR	Survival rates (%)
T1 (control)	14.57±0.017^{a}	81.25±2.36^{a}	457.65±10.37^{a}	2.29±0.04^{a}	0.88±0.02^{a}	97.66±1.15^{a}
T2 (lemongrass)	14.52±0.066^{a}	80.95±2.92^{a}	457.50±15.49^{a}	2.29±0.04^{a}	0.86±0.03^{a}	99.66±0.57^{a}
T3 (Kaffir lime peel)	14.42±0.116^{a}	81.08±3.07^{a}	462.27±21.75^{a}	2.30±0.05^{a}	0.87±0.04^{a}	98.66±0.57^{a}
T4 (peppermint)	14.48±0.204^{a}	84.98±3.68^{b}	486.87±30.58^{b}	2.36±0.03^{b}	0.85±0.05^{a}	98.00±1.00^{a}
p-value	0.198	0.032	0.01	0.037	0.453	0.187

Values (mean±S.D.) followed by the different letters in the same column indicate significant differences at $p < 0.05$

Table 2 Blood parameters of fish fed different kinds of essential oil supplemented diet for 75 days

Treatments	Red Blood Cells (x 10^{5} cells/μL)	Haemoglobin (g/dL)	Haematocrit (%)	White Blood Cells (x 10^{3} cells/μL)
T1 (control)	2.484±0.563^{a}	6.33±1.29^{a}	33.65±3.59^{a}	3.568±1.298^{a}
T2 (lemongrass)	2.976±0.751^{b}	6.92±1.60^{b}	36.98±3.34^{b}	3.722±1.730^{a}
T3 (Kaffir lime peel)	3.008±0.533^{b}	7.39±1.25^{b}	36.75±3.52^{b}	3.517±1.779^{a}
T4 (peppermint)	2.968±0.337^{b}	7.35±1.17^{b}	36.00±4.98^{b}	3.635±1.405^{a}
p-value	0.000	0.000	0.001	0.145

Values (mean±S.D.) followed by the different letters in the same column indicate significant differences at $p < 0.05$

ควบคุม (T1) อย่างไรก็ตาม พบว่าปลานิลในทุกชุดการทดลองมีปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมดมีค่า $3.517\text{-}3.722 \times 10^3$ cells/μL (ตารางที่ 2)

Table 3 Lysozyme activity of fish fed different kinds of essential oil supplemented diet for 75 days

Treatments	Lysozyme activity (unit)
T1 (control)	27.71±12.42[a]
T2 (lemongrass)	22.47±11.22[a]
T3 (Kaffir lime peel)	26.28±16.88[a]
T4 (peppermint)	27.13±9.88[a]
p-value	0.216

Values (mean±S.D.) followed by the different letters in the same column indicate significant differences at $p < 0.05$

Table 4 Survival rates of fish fed different kinds of essential oil supplemented diet for 75 days and challenged with the pathogen *Streptococcus agalactiae* for 10 days

Treatments	Survival rates (%)
T1 (control)	88.71±2.42[a]
T2 (lemongrass)	91.73±5.22[a]
T3 (Kaffir lime peel)	91.62±3.28[a]
T4 (peppermint)	94.34±2.87[a]
p-value	0.526

Values (mean±S.D.) followed by the different letters in the same column indicate significant differences at $p < 0.05$

ผลการวิเคราะห์ค่าปัจจัยทางด้านภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาทดลอง โดยการวัดค่า lysozyme activity ในน้ำเลือด ซึ่งเป็นค่าที่แสดงความว่องไวของปฏิกิริยาของ lysozyme ในการย่อยสลายเซลล์แบคทีเรีย พบว่าน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดไม่มีผลต่อการกระตุ้น lysozyme activity ของปลานิล สังเกตจากค่า lysozyme activity ในแต่ละชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 3)

หลังจากการทดลองให้อาหารผสมน้ำมันหอมระเหยชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 75 วัน แล้วนำปลาทดลองในแต่ละชุดการทดลอง จำนวน 30 ตัว มาทดสอบความต้านทานโรค โดยชักนำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญของปลานิล โดยวิธีการแช่สารละลายเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 10^8 CFU/mL บันทึกอัตราการตายสะสมของปลาทดลองทุกวันเป็นเวลา 10 วัน ผลการทดลองพบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหยในทุกชุดการทดลองมีอัตราการรอดจากการชักนำให้ติดเชื้อ *S. agalactiae* ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยที่อัตราการรอดมีค่า 88.71-94.34 % อย่างไรก็ตาม มีข้อสังเกตว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหย โดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันสะระแหน่ มีอัตราการตายจากการชักนำให้เกิดการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในอัตราที่ค่อนข้างต่ำ (5.66 %) เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในชุดควบคุม (11.29 %) แม้จะอยู่ภายใต้สภาพการเลี้ยงแบบหนาแน่นในตู้ทดลองที่อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 26 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4)

4. วิจารณ์

ผลการทดลองพบว่าน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้และผิวมะกรูดที่ผสมในอาหารไม่มีผลต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ และอัตรา

การรอดของปลานิล ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มปลาทดลองที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันสะระแหน่ โดยที่ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันสะระแหน่มีน้ำหนักตัวสุดท้าย ร้อยละน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับปลาในชุดทดลองอื่น ๆ และปลาในกลุ่มควบคุม โดยสอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหย clove basil ที่ระดับ 0.5 % เป็นเวลา 55 วัน มีน้ำหนักตัวสุดท้ายเพิ่มสูงขึ้นและมีอัตราการแลกเนื้อต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับปลาในชุดควบคุม [20] การทดลองในปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) ที่พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ Bermuda grass, beal, wintercherry และขิง (ginger) [21] และน้ำมันหอมระเหยจากผิวส้ม (*Citrus sinensis* peel) [22] ที่ผสมในอาหารมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของปลาทดลอง มีความเป็นไปได้ว่าการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นของปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหยอาจเป็นผลของน้ำมันหอมระเหยชนิดนั้น ๆ ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยอาหาร โดยมีรายงานการทดลองในไก่เนื้อ ซึ่งพบว่าไก่ที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหย oregano มีค่าประสิทธิภาพในการย่อยสารอาหารประเภทโปรตีนเพิ่มสูงขึ้น [23] และพบว่าไก่ที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหยผสม 3 ชนิด ประกอบด้วย oregano, cinnamon และ pepper มีค่าประสิทธิภาพในการย่อยวัตถุแห้งและสารอาหารประเภทโปรตีนเพิ่มสูงขึ้นด้วย [24] นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษายืนยันว่าน้ำมันหอมระเหยที่ผสมในอาหารยังส่งผลในการกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหาร นำไปสู่การกระตุ้นการเจริญเติบโตอีกด้วย [25]

ผลจากการทดลองครั้งนี้ยังชี้ให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยที่ผสมในอาหารมีส่วนในการกระตุ้นองค์ประกอบเลือดของปลานิล ยกเว้นปริมาณเม็ดเลือดขาว โดยพบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหยสกัดจากตะไคร้ ผิวมะกรูด และสะระแหน่ ที่ระดับ 0.5 mL/kg อาหาร มีปริมาณเม็ดเลือดแดง ปริมาณฮีโมโกลบิน และค่าฮีมาโตคริตเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับปลาในชุดควบคุม อย่างไรก็ตาม ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการกระตุ้นองค์ประกอบเลือดในปลาค่อนข้างหลากหลาย ซึ่งมีความแตกต่างกันไปตามชนิดและปริมาณของน้ำมันหอมระเหยที่ศึกษา ตลอดจนชนิดและอายุของปลาทดลอง อาทิ ปลาหมอเทศที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหยสกัดจากผิวส้ม bitter lemon ที่ระดับ 0.5, 0.75 และ 1 % ค่าฮีมาโตคริตไม่มีความแตกต่างจากปลาในกลุ่มควบคุม ขณะที่เฉพาะปลาทดลองกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหยที่ระดับ 0.5 และ 0.75 % เท่านั้นที่มีปริมาณของเม็ดเลือดขาวเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุม [26] หรือการทดลองในปลา ningu (*Labeo victorianus*) อายุ 4 สัปดาห์ ที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหยสกัดจากผิวส้ม bitter lemon ที่ระดับ 1-5 % มีค่าองค์ประกอบเลือด ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดง ปริมาณเม็ดเลือดขาว ปริมาณฮีโมโกลบิน ค่าฮีมาโตคริต และดัชนีเม็ดเลือดแดงเพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย [27]

การศึกษาในครั้งนี้พบว่าน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด (ตะไคร้ ผิวมะกรูด และสะระแหน่) ที่ผสมในอาหารไม่มีผลต่อการกระตุ้น lysozyme activity ในน้ำเลือดของปลานิลเมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับการทดลองที่พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหยสกัดจากขิง มีค่า phagocytic activity ไม่แตกต่างจากปลาในชุดควบคุม โดยทั้งน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากขิงและ clove basil ไม่มีผลต่อการกระตุ้นปัจจัยด้านภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด

ได้แก่ serum total protein, immuno-globulin และ agglutination titer ของปลานิล [20] อย่างไรก็ตาม มีบางรายงานการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดมีฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลา โดยเฉพาะการกระตุ้นการทำงานของ lysozyme และ phagocytic cell อาทิ สารสกัดจาก oregano (*Origanum vulgare*) สามารถกระตุ้น respiratory burst activity, phagocytic activity และ lysozyme activity ในปลา rainbow trout [28] หรือการทดลองที่คล้ายคลึงกันในปลา rainbow trout ที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันที่สกัดจาก black cumin (*Nigella sativa*) มี lysozyme activity ในน้ำเลือดสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุม [29]

การศึกษาครั้งนี้พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ผิวมะกรูด และสะระแหน่ มีอัตราการตายลดลงจากการชักนำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุม แม้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยหรือองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยมีผลในทางบวกต่ออัตราการรอดของปลานิลที่ติดเชื้อ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาหลายฉบับที่พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ผสมในอาหารมีผลต่อการลดอัตราการตายของปลาหลังจากการชักนำให้มีการติดเชื้อ อาทิ ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหย cinnamon (*Cinnamomum verum*) มีอัตราการตายลดลงหลังจากการชักนำให้มีการติดเชื้อ *S. iniae* [30] หรือปลานิลที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหย clove oil (*Szygium aromaticum*) มีอัตราการตายลดลงหลังจากการชักนำให้มีการติดเชื้อ *Lactococcus garviea* [31] หรือการทดลองที่คล้ายคลึงกันในปลาหมอเทศ พบว่าปลาหมอเทศที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหยสกัดจากผิวส้ม sweet orange peel (*Citrus sinensis*) มีอัตราการตายลดลงหลังจากการชักนำให้มีการติดเชื้อ *S. iniae* [22] มีความเป็นไปได้ว่าอัตราการรอดที่สูงขึ้นในปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหยหลังถูกชักนำให้มีการติดเชื้อแบคทีเรียจะสัมพันธ์กับฤทธิ์ในการทำลายเซลล์แบคทีเรียขององค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหย มีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหย cinnamon, oregano, lemongrass (*Cymbopogon citratus*) และ thyme มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์แบคทีเรีย *Aeromonas salmonicida* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค furunculosis ในปลากลุ่มแซลมอน [32] และพบว่าน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชกว่า 52 ชนิด มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ยีสต์ (*Candida albicans*) และแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Aeromonas veronii* bv. sobria, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* [9] ทั้งนี้กลไกในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยเกี่ยวข้องกับการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลออกของสารประกอบภายในเซลล์ การละลาย หรือการเกาะกลุ่มกันของสารประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ นอกจากนี้การทำปฏิกิริยากันระหว่างน้ำมันหอมระเหยและ ATPase membrane protein ของแบคทีเรียส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียมีการปลดปล่อยโมเลกุลหรือไอออนที่จำเป็นผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกสู่ภายนอกได้ง่ายขึ้น รวมถึงการไปยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์หรือการดูดซึมอาหาร นำไปสู่การตายของเซลล์แบคทีเรียในที่สุด [1,33]

ผลการศึกษาครั้งนี้ แม้ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ผิวมะกรูด และสะระแหน่ จะมีอัตราการตายลดลงจากการชักนำให้เกิดการติดเชื้อ *S. agalactiae* เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุม แต่มีข้อสังเกตว่าปลาทดลองมีอัตราการตายจากการชักนำให้เกิดการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในอัตราที่ค่อนข้างต่ำ (5.66-11.39 %) แม้จะอยู่ภายใต้

สภาพการเลี้ยงแบบหนาแน่นที่อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 26 องศาเซลเซียส มีรายงานว่าอัตราการตายที่สูงจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ของปลานิลมักจะสัมพันธ์กับความเครียดของปลาที่มีสาเหตุจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำ โดยเฉพาะเมื่อปลาอยู่ภายใต้อุณหภูมิของน้ำที่ต่ำกว่า 24 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 32 องศาเซลเซียส [34] จึงมีความเป็นไปได้ว่าอัตราการรอดของปลานิลที่ค่อนข้างสูงในการทดลองนี้อาจมีสาเหตุจากการที่ระหว่างชักนำให้เกิดการติดเชื้อ ปลาทดลองยังคงอยู่ภายใต้อุณหภูมิที่ไม่ก่อให้เกิดความเครียด ดังนั้นเพื่อให้ผลการศึกษาที่ชัดเจนมากขึ้น การชักนำให้ปลานิลติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในอนาคตจึงจำเป็นต้องศึกษาภายใต้ปัจจัยความเครียดด้านอุณหภูมิของน้ำเข้ามาร่วมด้วย

5. สรุป

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการเสริมน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ที่ระดับ 0.5 mL/kg อาหาร มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือดของปลานิล และมีแนวโน้มช่วยลดอัตราการตายจากการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลที่เพาะเลี้ยงได้ น้ำมันหอมระเหยจึงเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางเลือกที่อาจนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตและสร้างเสริมภูมิคุ้มกันในปลานิลได้ในอนาคต

6. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยทักษิณ ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยทักษิณ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ และผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้การสนับสนุนจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

7. References

[1] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M., 2008, Biological effects of essential oils, Rev. Food Chem. Toxicol. 46: 446-475.

[2] Burt, S., 2004, Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – a review, Int. J. Food Microbiol. 94: 223-53.

[3] Zhang, K.Y., Yan, F., Keen, C.A. and Waldroup, P.W., 2005, Evaluation of microencapsulated essential oils and organic acids in diets for broiler chickens, Int. J. Poult. Sci. 4: 612-619.

[4] Alcicek, A., Bozkurt, M. and Cabuk, M., 2003, The effect of an essential oil combination derived from selected herbs growing wild in Turkey on broiler performance, S Afr. J. Anim. Sci. 33: 89-94.

[5] Kommera, S.K., Mateo, R.D., Neher, F.J. and Kim, S.W., 2006, Phytobiotics and organic acids as potential alternatives to the use of antibiotics in nursery pig diets, Asian-Aust. J. Anim. Sci. 19: 1784-1789.

[6] Zheng, Z.L., Tan, J.Y.W., Liu, H.Y., Zou, X.H., Xiang, X. and Wang, K.Y., 2009, Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), Aquaculture 292: 214-218.

[7] Peterson, B.C., Bosworth, B.G., Wood, M.L.,

Li, M.H. and Beltran, R., 2011, Essential oils increase weight gain in channel catfish, Global Aquacult. Advocate 14: 80-82.

[8] Giannenas, I., Triantafillou, El., Stavrakakis, S., Margaroni, M., Mavridis, S., Steiner, T. and Karagouni, E., 2012, Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Aquaculture 350-353: 26-32.

[9] Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V., 1999, Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, J. Appl. Microbiol. 86: 985-990.

[10] Masamba, W.R.L., Kamanula, J.F.M., Henry, E.M.T. and Nyirenda, G.K.C., 2003, Extraction and analysis of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil: An essential oil with potential to control the Larger Grain Borer (*Prostephanus truncatus*) in stored products in Malawi, Malawi J. Agric. Sci. 2: 56-64.

[11] Al-Saadi, N., H. M., Ahmad, N. S. and Saeed, S., E., 2009, Determination of some chemical compounds and the effect of oil extract from orange peel on some pathogens, J. Kerbana Univ. 7(2) Scientific: 33-39.

[12] Schmidt, E., Bail, S., Buchbauer, G., Stoilova, I., Atanasova, T., Stoyanova, A., Krastanov, A. and Jirovetz, L., 2009, Chemical composition, olfactory evaluation and antioxidant effects of essential oil from *Mentha* x *piperita*, Nat. Prod. Commun. 4: 1107-1112.

[13] Garcia-Garcia, R., Aurelio, L.M. and Palou, E., 2011, Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*, J. Food Sci. 76: M95-100.

[14] Tsai, M.L., Wu, C.T., Lin, T.F., Lin, W.C., Huang, Y.C. and Yang, C.H., 2013, Chemical composition and biological properties of essential oils of two mint species, Trop. J. Pharm. Res. 12: 577-582.

[15] Habsari, R.A. and Noorhamdani, W., 2018, Chemical composition of oil fraction Kaffir lime (*Citrus hystrix* DC) as antibacterial activity of *E. coli*, J. Pure Appl. Chem. Res. 7: 32-38.

[16] Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W., 1973, Routine haematological methods for use with fish blood, J. Fish Biol. 5: 771-781.

[17] Sukrakanchana, N., 2006, Fish Diseases Laboratory Manual, Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Songkhla, 104 p. (in Thai)

[18] Larsen, H.N. and Snieszko, S.F., 1961, Comparison of various methods of determination of hemoglobin in trout blood, Prog. Fish Cult. 23: 8-17.

[19] Parry, R.M., Chandau, R.C. and Shahani, R.M., 1965, A rapid and sensitive assay of muramidase, Proceedings of the Society

for Experimental Biology and Medicine 119: 384-386.

[20] Brum, A., Pereira, S.A., Owatari, M.S., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Mouriño, J.L.P. and Martins, M.L., 2017, Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*, Aquaculture 468: 235-243.

[21] Immanuel, G., Uma, R.P., Iyapparaj, P., Citarasu, T., Punitha, P.S.M., Michael, B.M. and Palavesam, A., 2009, Dietary medicinal plant extracts improve growth, immune activity and survival of tilapia *Oreochromis mossambicus*, J. Fish Biol. 74: 1462-1475.

[22] Acar, Ü., Kesbiç, O.S., Yılmaz, S., Gültepe, N. and Türker, A., 2015, Evaluation of the effects of essential oil extracted fromsweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*, Aquaculture 437: 282-286.

[23] Malayoglu, H., Baysal, S., Misirlioglu, Z., Polat, M., Yilmaz, H. and Turan, N., 2010, Effects of oregano essential oil with or without feed enzymes on growth performance, digestive enzyme, nutrient digestibility, lipid metabolism and immune response of broilers fed on wheat-soybean meal diets, Brit. Poult. Sci. 51: 67-80.

[24] Hernandez, F, Madrid, J., Garcia, V., Orengo, J. and Megias, M.D., 2004, Influence of two plant extracts on broilers performance digestibility and digestive organ size, Poult. Sci. 83: 169-174.

[25] Cowan, M.M., 1999, Plant products as antimicrobial agents, Clin. Microbiol. Rev. 12: 564-582.

[26] Baba, E., Acar, U., Öntaş, C., Kesbiç, O.S. and Yılmaz, S., 2016, Evaluation of *Citrus limon* peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mos sambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*, Aquaculture 465: 13-18.

[27] Ngugi, C.C., Oyoo-Okoth, E. and Muchiri, M., 2016, Effects of dietary levels of essential oil (EO) extract from bitter lemon (*Citrus limon*) fruit peels on growth, biochemical, haemato-immunological parameters and disease resistance in juvenile *Labeo victorianus* fingerlings challenged with *Aeromonas hydrophila*, Aquacult. Res. 48: 2253-2265.

[28] Haghighi, M., Pourmoghim, H. and Rohani, M.S., 2018, Effect of *Origanum vulgare* extract on immune responses and heamatological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Oceano graphy Fish Open Access J. 6: 555687.

[29] Awad, E., Austin, D. and Lyndon, A.R.,

2013, Effect of black cumin seed oil (*Nigella sativa*) and nettle extract (Quercetin) in enhancement of immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), Aquaculture 388-391: 193-197.

[30] Rattanachaikunsopon, P. and Phumkha chorn, P., 2010, Potential of cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil to control *Streptococcus iniae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*), Fish. Sci. 76: 287-293.

[31] Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P., 2009, Protective effect of clove oil supplemented fish diets on experimental *Lactococus graviae* infection in tilapia, Biosci. Biotechnol. Biochem. 73: 2085-2089.

[32] Starliper, C.E., Ketola, H.G., Noyes, A.D., Schill, W.B., Henson, F.G., Chalupnicki, M.A. and Dittman, D.E., 2015, An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to *Aeromonas* spp., J. Adv. Res. 6: 89-97.

[33] Cristani, M., Arrigo, D.M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A. and Trombetta, D., 2007, Interaction of four monoter-penes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity, J. Agric. Food Chem. 55: 6300-6308.

[34] Marcusso, P.F., Aguinaga, J.Y., Claudiano, G.S., Eto, S.F., Fernandes, D.C., Mello, H., Marinho Neto, F.A., Salvador, R., Moraes, J.R.E. and Moraes, F.R., 2015, Influence of temperature on *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia, Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 52: 57-62.