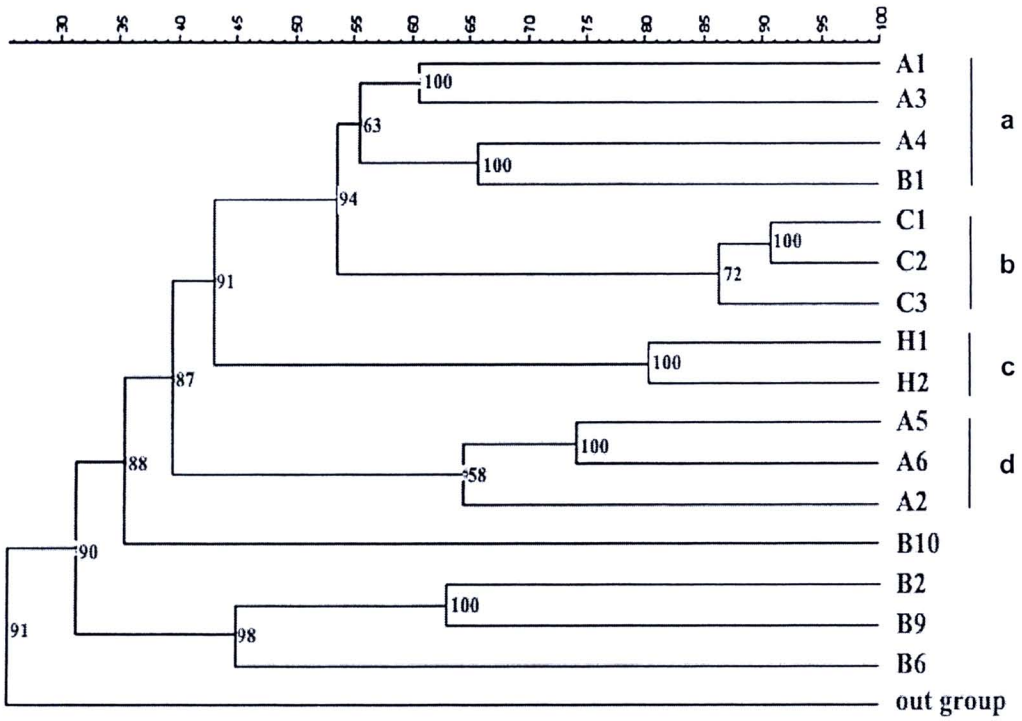
constructed by using Fingerprinting II program. Similarly index of Campylobacter was demonstrated.

A1, A2, A3, A4, A5, A6, B1, B2, B6, B9, B10 were from backyard chickens

C, C2, C3, H1, H2 were from commercial broiler chickens



อธิปรายผลการทดลอง

จากผลการศึกษาถึงปริมาณเชื้อ Normal flora ในลำไส้ตันไก่ ที่มีความแตกต่างในระบบการเลี้ยง คือ ไก่จากฟาร์มเลี้ยงแบบเข้มข้น และไก่จากหลังบ้านที่ปล่อยเลี้ยงตามธรรมชาติแล้ว พบว่าไก่เลี้ยงไว้หลังบ้านมีค่าเฉลี่ยของเชื้อ Campylobacter มากกว่าในกลุ่มของไก่ที่มาจากฟาร์ม ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในต่างประเทศที่การเลี้ยงไก่อินทรีย์ (organic chicken farming) มีความชุกที่สูงกว่าการเลี้ยงไก่ในระบบฟาร์ม ซึ่งไก่หลังบ้านมีโอกาสได้สัมผัสกับสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ พื้นดิน สัตว์มีชีวิตเล็กๆ มากกว่าไก่ที่เลี้ยงในฟาร์ม สิ่งแวดล้อมต่างๆ เหล่านี้ต่างเป็นตัวส่งผ่านเชื้อ Campylobacter สู่ไก่ได้เป็นอย่างดี แต่ทว่าความแตกต่างระหว่างเชื้อ Campylobacter ในไก่ 2 ระบบนี้มีไม่มาก และไม่มีนัยทางสถิติ ทำให้เราทราบว่าไก่ที่เลี้ยงทั้ง 2 ระบบนี้เป็นแหล่งปนเปื้อนเชื้อ Campylobacter สูงและพร้อมที่จะแพร่กระจายเข้ามาสู่กระบวนการผลิตอาหาร (เนื้อไก่) ที่ปนเปื้อนเชื้อนี้และขณะเดียวกันพร้อมเข้าสู่ผู้บริโภคได้ ถ้าผู้บริโภคไม่ได้ทำหรือเตรียมอาหารที่มีความร้อนที่เหมาะสมต่อการฆ่าเชื้อนี้ได้ ดั้งนั้นไก่เนื้อที่เลี้ยงทั้ง 2 ระบบจึงเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อคนเป็นอันมาก

ขณะที่ Normal flora ในลำไส้ตันไก่ทั้ง 2 ระบบนั้นแนวโน้มที่ไก่เลี้ยงในฟาร์มจะมีปริมาณของ Normal flora ในกลุ่มของ Anaerobic, Lactobacillus, Total bacteria และ Enterobacteriaceae

มากกว่า แต่ไม่มีนัยทางสถิติทำให้เห็นภาพว่าไก่ฟาร์มน่าจะมีความหลากหลายของ Normal flora ในเชิงปริมาณมากกว่าไก่ที่เลี้ยงกันหลังบ้าน ซึ่งข้อมูลน่าจะสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของ Normal flora ในลำไส้ตันไก่ในการเลี้ยง 2 ระบบ โดยวิธีทางอณูวิทยาโดยการใช้เทคนิค RAPD และ Phytogenetic tree analysis ที่ทำให้พบว่าสามารถแยกไก่ที่เลี้ยงโดย 2 ระบบนี้โดยอาศัยความแตกต่างและความเหมือนของแถบ DNA ของตัวอย่างในลำไส้ตันไก่ ได้เป็นกลุ่มไก่ที่ปลอดเชื้อ Campylobacter หรือมาจากไก่ไม่ปลอดเชื้อ Campylobacter นับว่าเป็นข้อมูลใหม่ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน ข้อสันนิฐานว่าในกลุ่มไก่ที่ปลอดเชื้อและไม่ปลอดเชื้อ Campylobacter น่าจะมีกลุ่มของ Normal flora บางกลุ่มที่ไม่เหมือนกันอาศัยอยู่ ทำให้สามารถแยกไก่ออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ซึ่งในกลุ่มที่ปลอดเชื้อ Campylobacter นั้น เป็นที่น่าสนใจว่า จะเป็นNormal flora กลุ่มใดเพราะจะได้เป็นแหล่งนำทางในการเพาะแยกเชื้อที่มีผลหรือฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Campylobacter และพัฒนากลุ่ม Nomal flora ดังกล่าว ที่อาจจะมีผลให้การเจริญเติบโตของ Campylobacter ในลำไส้ตันไก่ได้ ในการทดลองนี้จึงเลือกกลุ่มแบคทีเรีย Lactobacillus หรือ Anaerobic ที่เคยมีรายงานในเรื่องคุณสมบัติการมีศักยภาพต่อต้านเชื้อจุลชีพที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย เช่น Campylobacter และ Salmonella ไปแล้วนั้น ในการทดลองครั้งนี้ได้พบว่ามีแบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าวให้ผลยับยั้ง Campylobacter ได้ และเป็นกลุ่ม Lactobacillus และ Anaerobic ในการทดสอบ Agar well diffusion ในเบื้องต้นไปแล้วนั้น แต่เมื่อทำการศึกษาร่วมในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแล้วพบว่าไม่พบฤทธิ์การยับยั้ง เหตุผลอันเป็นไปได้น่าจะเพราะว่า Lactobacillus (ชนิดที่ให้ผลดีที่สุด LH10) น่าจะไม่สามารถเจริญเติบโตในหลอดทดลองที่ได้เตรียมไว้ จึงทำให้มีผลสรุปเบื้องต้นว่า LH10 ไม่น่าจะเหมาะสมนำมาทดลองในไก่ทดลองจนกว่าจะได้ผลการทดลองในหลอดทดลองที่ให้ผลดี ผลที่เกิดขึ้นอาจจะเป็นเพราะ LH10 ไม่ได้อยู่ในภาวะ Microaerophilic ได้จริง ๆซึ่งต้องมีการปรับหรือแก้ไข หรือทดลองซ้ำก่อนจึงจะทำการทดลองในไก่ทดลอง ทางผู้วิจัยจึงได้ปรับเปลี่ยนไปศึกษาสมุนไพร ซึ่งน่าจะให้ผลดีและคงทนในสภาวะต่าง ๆได้ดี จึงเป็นการปรับแผนการทดลอง ผลการทดลองพบว่าสมุนไพรสมอพิเภทได้ผลดีที่สุดดังรายงานเบื้องต้นแล้ว เมื่อทดลองทั้งในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวก็ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ ซึ่งสารประเภทในสมอพิเภทน่าจะเป็นกลุ่มสารที่ละลายในแอลกอฮอล์ เช่น แทนนิน นั้นพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มลบได้ ในการทดลองในไก่ทดลองเบื้องต้น ทำให้ทราบว่าสมอพิเภทสามารถลดจำนวนเชื้อ Campylobaceter ลงได้บ้างนับว่าเป็นจุดประกายให้ศึกษาและพัฒนาต่อไปอีกถึงคุณสมบัติวิธีใช้ รวมถึงผลการออกฤทธิ์ต่อเชื้อ Campylobacter ได้อย่างไร

ซึ่งผลการทดลองสมุนไพรที่ได้นับว่าเป็นข้อมูลใหม่ และเป็นแนวทางใหม่ที่จะช่วยลดจำนวน Campylobacter ลงในไก่เนื้อได้ และยังคงต้องศึกษาข้อมูลอีกมากในการพัฒนาเพื่อที่จะสามารถสร้างหรือผลิตสารสมุนไพรดังกล่าวในเชิงการทดลองที่มีกลุ่มตัวอย่างใหญ่และหลากหลายขึ้นเพื่อจะได้ทราบถึงผลของการใช้ในวงการอุตสาหกรรมการเลี้ยงจริง ๆ เพราะถ้าผสมผสานสมุนไพรในน้ำหรืออาหารได้สำเร็จแล้ว และมีฤทธิ์การควบคุมหรือป้องกันเชื้อ Campylobacter ได้ แล้วจะนับว่า เป็นนวัตกรรมใหม่ที่น่าสนใจและต่อยอดเนื่องจากตลาดการค้าขายไก่เนื้อนั้นใหญ่ และกว้างมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณการบริโภคเนื้อไก่ทั้งโลก

การศึกษาข้อมูลของสมุนไพรไทยในเชิงลึกได้ทำการวางแผนการทดลองในปีถัดมาของผู้วิจัยเพื่อต่อยอดองค์ความรู้ของผู้วิจัยที่พยายามปรับปรุงที่มีอยู่นี้ขึ้นมา เพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในไก่เนื้อ รวมทั้งอาจจะเป็นสินค้าส่งออกไปยังต่างประเทศก็ได้ในอนาคต

3. การทดสอบเชื้อที่แยกได้ต่อการเจริญเติบโตของ *Campylobacter* spp.

3.1 วิธี agar diffusion assay

หลังจากการเลี้ยงเชื้อที่แยกมาจากไก่ (ที่ปลอดจาก *Campylobacter*) Supernatant จะถูกเก็บ และหยดลงในหลุม ใน agar plate ที่ได้เลี้ยง *Campylobacter* เอาไว้แล้ว หลังจากนั้น plates จะถูกบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48 h. ที่สภาพอากาศ Microaerophilic แล้ว Inhibition zone จะถูกวัดและบันทึกไว้

ผลการทดลอง พบว่า มีจำนวน Normal flora 23 ชนิดที่แยกจาก Normal flora จากไก่ที่ปลอดจากเชื้อ Campylobacter ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อCampylobacter จำนวน 10 ชนิดที่แยกมาจากไก่ทั้งฟาร์มและที่เลี้ยงหลังบ้าน (การเพาะแยกเบื้องต้น) เมื่อเส้นผ่าศูนย์กลางของหลุมทดสอบมีความกว้าง 6 มม. (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3. Inhibitory effect of isolated bacteria from Campylobacter-free chickens on the growth of Campylobacter spp. was demonstrate by using agar diffusion method. The diameter of inhibition zone was measured in mm. Control was culture media without the growth of bacteria. Acetic acid was used as positive control. [1] isolated bacteria from backyard chickens and [2] isolated bacteria from commercial chickens. [a], Campylobacter isolated from backyard and [b] Campylobacter isolated from

Commercial chickens.

Campylobacter Isolated bacteria	**A1**[a]	**A2**[a]	**A4**[a]	**B1**[a]	**B2**[a]	**B6**[a]	**B9**[a]	**C1**[b]	**H1**[b]
[1]BA72	10	8	9	7	10	9	10	8	8
[2]I8.1L	15	15	13	11	12	12	13.5	11	10
[2]LH5	15	12	13	12	13.5	12	13.5	11	11
[2]I10.1L	-	16	14	13	15	13	14	11	12
[2]I9.1L	12	10	11	8	8	8	8	8	9
[1]A5.5	15	12	13	11	14	12.5	13.5	12	12.5
[2]I4.1L	16	13.5	13	13	117	15	14	12.5	14
[1]BL52	16	13	11	12	14	13	13	10	13.5
[1]A3.3	13	13	14	12	14	12	12	11.5	12.5

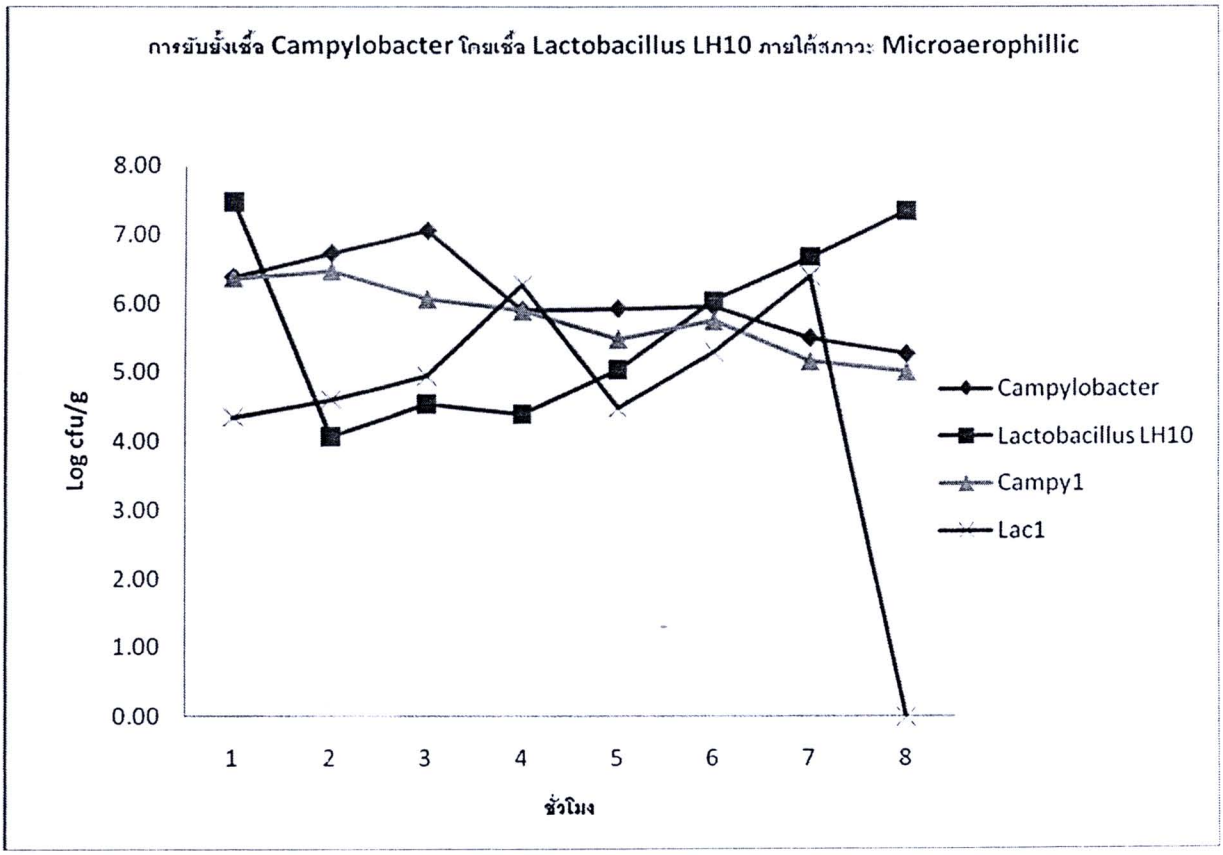
[1]BL44	13	12	12	11	13	11	11	11.5	14
[2]I2.1L	9	11	12	9	11.5	10	8	8	11
[2]I1.1L	14	16	16	16	17	15	13.5	14	13
[1]A.3.1	12	13	12	-	13	13	13	12	11
[1]A3.2	13.5	13.5	13	13	14	13	14	12.5	13
[1]A5.1	12.5	11.5	13	11	13	12	12.5	12	12
[1]A5.4	17	13	16	12	16	13	13	14.5	15.5
[1]BL8	13	13.5	13	12	14	16	13	13.5	13
[1]BL3	12	13	15.5	12	15	13	12.5	15	12
[1]BL5.1	14	13	13.5	14	15.5	13	13	14	14
[1]BA3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[2]CL3	12	12.5	12	12	14	13.5	12	12.5	11.5
[2]L5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[2]L3	14	13.5	16	13	14	13	17	13.5	17
[2]LH10	13.5	13	12.5	12	12.5	12.5	14	13.5	17
[2]LH9	12	12	13	12	13	11	13	12	11
[2]M8	14	13	13	13	-	14	13	13	-
[2]M4	-	-	-	-	-	6.5	-	-	-
[2]I8.2L	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.2 การทดสอบเชื้อที่ได้คุณสมบัติ Probiotic ในขวดทดลองต่อการเจริญเติบโตของ *Campylobacter* *Campylobacter* จะถูกเลี้ยงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในขวดทดลอง ภายใต้สภาพ microaerophilic ที่ 37°C เชื้อ bacteria ที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นที่สามารถเป็น Probiotic จะถูกจ่ายเข้าไปในขวดทดลองเดียวกันที่มี *Campylobacter* เจริญอยู่ ตัวอย่างจากขวดทดลองจะถูกเก็บ เพื่อศึกษาความอยู่รอดได้ของเชื้อ *Campylobacter* และ Probiotic bacteria

ในการทดลองนี้ Campylobacter ได้ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MH เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ขณะที่ Lactobacillus LH10 ถูกเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขวดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้ถูกปรับบรรยากาศภายในให้เป็น Microaerophillic โดยการปรับสัดส่วนอากาศกับก๊าซที่ได้มีสัดส่วน O2:CO2:N2 เป็น 5:10:75 โดยบริษัทที่น่าเชื่อถือ เมื่อได้สภาวะอากาศที่เหมาะสมแล้วนำขวดทั้งหลายเหล่านี้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120C เป็นเวลา 15 นาที ภายใต้ความดัน 1 บรรยากาศ เสร็จแล้วนำเชื้อ Campylobacter จำนวน 150 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในขวดที่ 1 และ Lactobacillus LH10 จำนวน 150 ไมโครลิตร ลงในขวดที่ 2 ส่วนขวดที่ 3 นำ Campylobacter และ Lactobacillus LH10 จำนวนละ 75 ไมโครลิตรใส่ลงไป แล้วนำขวดทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37C เก็บ

ตัวอย่างจากขวดทดลองโดยปราศจากเชื้อในช่วงเวลาที่ 0 24 30 36 48 60 66 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ นำตัวอย่างที่มีการเจือจางที่เหมาะมาเพาะแยกเชื้อโดยวิธี Spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ CCDA ที่มีสารปฏิชีวนะผสม แล้วนำไปบ่มเชื้อที่ 37C ภายใต้สภาวะ Microaerophillic สำหรับ Campylobacter เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ Anaerobic สำหรับ Lactobacillus LH10 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีมานับและบันทึก

ผลการทดลองพบว่า ในช่วงแรกที่ Campylobacter มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นที่ 6.38 log cfu/ml และเมื่อชั่วโมงที่ 36 จำนวน Campylobacter ได้ลดจำนวนลงมาที่ 5.9 log cfu/ml หลังจากนั้น จำนวน Campylobacter ลดลงมาจนถึง 5.28 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 72 ขณะที่ Lactobacillus เมื่อเริ่มต้นมีจำนวนเชื้อที่ 7.48 log cfu/ml ในช่วง 24 30 36 จำนวนเชื้อลดลงมาที่ 4.08 4.56 และ 4.21 ตามลำดับ หลังจากนั้นเชื้อค่อยๆเจริญเติบโตขึ้นจนถึง 7.35 log cfu/ml เมื่อบ่มเชื้อที่ 72 ชั่วโมง ในขวดที่ 3 ที่มีเชื้อ Campylobacter และ Lactobacillus LH10 ผสมอยู่ด้วยกันพบว่า จำนวนเชื้อ Campylobacter ที่ชั่วโมงที่ 6 24 มีปริมาณ 6.36 และ6.46 log cfu/ml ตามลำดับ หลังจากนั้นจำนวนเชื้อค่อยๆลดลงไปตามเวลาจนกระทั่งถึง 5.02 log cfu/ml ที่ 72 ชั่วโมง จำนวนเชื้อ Campylobacter มีปริมาณต่ำกว่าเชื้อ Campylobacter ในขวดที่ 1(control) เล็กน้อย ขณะที่เชื้อ Lactobacillus LH10 ที่ 6 ชั่วโมง มีปริมาณที่ 4.36 log cfu/ml และที่ 24 30 36 มีปริมาณเชื้ออยู่ที่ 4.61 4.95 และ 6.28 log cfu/ml ตามลำดับ แล้วเพิ่มขึ้นเป็น 5.3, 6.4 log cfu.ml ที่ ชั่วโมงที่ 60 และ 66 ตามลำดับ จนชั่วโมงที่ 72 จำนวน Lactobacillus LH10 ลดลงจนถึงไม่สามารถเพาะเชื้อได้ (รูปภาพที่ 6)



รูปภาพที่ 6 แสดงผลของ Lactobacillus LH 10 และ Campylobacter ในขวดทดลองที่ปรับสภาพ Microaerophilic ภายใต้อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 0, 24, 30, 36, 48, 60, 66 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

3.3 การศึกษาคุณสมบัติของ Bacteria ที่มีผลลบต่อการเจริญเติบโตของ *Campyloacter*

คุณสมบัติการมี Bacteriocin (Protein peptide-like substance)

คุณสมบัติการผลิต hydrogen peroxide

คุณสมบัติการผลิต acidity

คุณสมบัติการทนต่อความร้อน

คุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ

ผลการทดลอง ไม่ได้ดำเนินการเนื่องจากผลการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไม่ได้ผลที่ดี

4. การทดสอบ Probiotic ต่อ *Campylobacter* ในไก่ทดลอง

4.1 การทดสอบ Colinisation ของ Probiotic bacteria ในไก่ทดลอง

ไก่จะถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มอายุ Probiotic bacteria จะถูกป้อนให้ไก่ในวันต่างๆ เพื่อให้ทราบถึงการ colonise ได้ของ Probiotic bacteria วิธีการพิสูจน์โดยใช้ Molecular approach จาก caecal contents ของไก่แต่ละตัว โดยวิธี DNA finger print

4.2 การทดสอบ Colonisation ของ *Campylobacter* spp. ในไก่ทดลอง

ไก่จะถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มอายุเช่นเดียวกับการทดลองหัวข้อ 4.1 วิธีการพิสูจน์จะใช้หลักการเดียวกัน

4.3 การทดสอบผลของ Probiotic bacteria เพื่อป้องกันการ colonise ของ *Campylobacter*

ไก่จะถูกป้อนด้วย Probiotic bacteria ตามโปรแกรมที่ได้ข้อมูลจากข้อ 4.1 หลังจากนั้นไก่จะถูกป้อนเชื้อ *Campylobacter* เมื่อสิ้นสุดการทดลองจำนวน *Campylobacter* จะถูกนับจาก ceacal contents

ผลการทดลอง ไม่ได้ดำเนินการเนื่องจากผลการทดลองในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไม่ได้ผลการทดลองที่ดี

5.การทดสอบสารสมุนไพร

ขั้นตอนที่ 1 การคัดเลือกพืชสมุนไพร คัดเลือกพืชสมุนไพร 60 ชนิด ที่มีรายงานว่ามีสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดต่าง ๆ ได้ นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ*Campylobacter* spp.

การเตรียมสารสกัดพืชสมุนไพร

การสกัดพืชสมุนไพรอย่างหยาบ

พืชสมุนไพรที่นำมาศึกษามีทั้งแบบสดและแบบแห้ง โดยแบบแห้งซื้อจากร้านขายสมุนไพรหมอเหรียญ 43/2 หมู่ที่ 14 บ้านหนองแวง ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ซึ่งจัดเก็บไว้ในถุงกระดาษ

หนาสีน้ำตาล มีอายุการเก็บไม่เกิน 6 เดือน และแบบสดซื้อจากร้านค้าที่ขายสมุนไพรสดในตลาดสดบางลำพู เขตเทศบาลเมืองขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

การเตรียมสมุนไพรเพื่อทำการบดเพื่อทำเป็นผงยา

1. นำสมุนไพรที่คัดเลือกแล้วมาล้างให้สะอาด ทิ้งไว้ให้เสด็จน้ำแล้วทำการหั่นให้เป็นชิ้นย่อย ๆ แล้วจึงนำไปอบแห้งในตู้อบสมุนไพร โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 45 – 50oC จนแห้งสนิทใช้ระยะเวลาประมาณ 8-10 ชั่วโมง

2. นำสมุนไพรที่ผ่านการอบแห้งแล้วนำมาบดโดยใช้เครื่องบด เพื่อทำให้ได้ผงยา

3. เก็บผงยาที่ได้ใส่ภาชนะที่เตรียมไว้ นำไปไว้ในโถสุญญากาศ เพื่อทำการวิจัยต่อไป

การเตรียมสารสกัดผงยาสมุนไพรด้วย 95% ethanol โดยใช้วิธีการหมัก(maceration)

1. ชั่งผงยาสมุนไพรประมาณ 50 กรัม ใส่ flask ขนาด 500 มล.นำมาแช่ใน95% ethanol ปริมาตร 250 มล.หมักนาน 2 วัน ในระหว่างการหมักมีการเขย่า flask ด้วยเครื่องเขย่าสารความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นระยะ ๆ เมื่อครบกำหนดทำการเก็บสารสกัด โดยผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1

2. นำสารสกัดที่ได้มาทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ(rotary vacuum evaporator) เมื่อสารสกัดมีปริมาตรลดลงเหลือ 1 ใน 3 ของสารสกัดขั้นต้น จึงนำเอาสารสกัดที่ได้มาถ่ายใส่ลงใน evaporating dish นำไปตั้งบนอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)จนกระทั่งได้สารสกัดที่แห้งหรือเข้มข้น

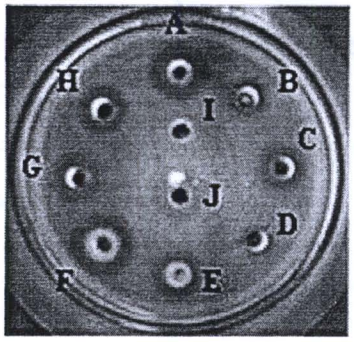
3. ทำการเก็บสารสกัดแห้งหรือเข้มข้นที่ได้ในขวดเก็บสาร แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเตรียมทำการวิจัยขั้นตอนต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรต่อเชื้อ *Campylobacter* spp. โดยวิธี agar well diffusion

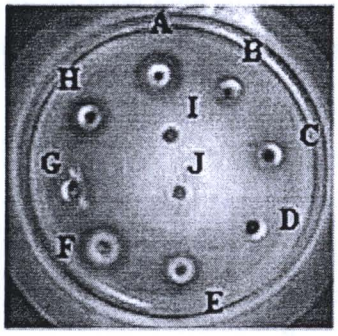
วิธีการทดสอบ หยดสารสกัดหยาบพืชสมุนไพรความเข้มข้น 200 มก./มล. ด้วยปิเปตใส่ในหลุมปริมาตรหลุมละ 35 ไมโครลิตร โดยที่จานเพาะเชื้อ 1 จานจะทดสอบสารสกัดได้ 5 ชนิด ที่เหลือ 2 หลุม จะเป็นตัวควบคุมโดยที่ตัวควบคุมผลลบใช้น้ำกลั่น ส่วนตัวควบคุมผลบวกจะใช้5% glacial acetic acid ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มภายใต้สภาพ microaerophilic condition ที่อุณหภูมิ 37oC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจบันทึกผลวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณเชื้อที่ไม่เจริญลักษณะโซนใส (clear zone) รอบหลุมสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดหน่วยเป็นมิลลิเมตร แล้วหาค่าเฉลี่ยบันทึกผลและบันทึกภาพ คัดเลือกสารสกัดหยาบจากพืชที่ให้ผลดีไปทดสอบการทดลองต่อไป

ผลการทดลองพบว่า จากการนำพืชสมุนไพรจำนวน 60 ชนิด มาสกัดสารสกัดหยาบด้วยวิธี maceration โดยใช้ 95% ethanol เป็นตัวทำละลายแล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) แล้วนำสารสกัดหยาบความเข้มข้น 200 มก./มล. ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* โดยวิธี agar well diffusion บนอาหาร Semi-Solid Brucella Agar พบพืชสมุนไพร 6 ชนิด ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยก่อให้เกิดบริเวณโซนใสเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 7) มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 14.80-22.40 มม. ได้แก่ สารสกัดหยาบจากผลสมอไทย ผลมะขามป้อม ใบชุมเห็ดเทศ ดอกสารภี ผลยอ และใบพลู ให้ผล

22.40±1.29, 17.80±1.09, 16.13±1.29, 15.50±0.57, 15.30±0.92 และ 14.80±0.89 มม. ตามลำดับ ขณะที่กลุ่มควบคุมผลบวกให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเป็น 29.20±0.67 มม. เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* ทั้ง 10 ชนิดของสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด พบว่า สารสกัดจากผลสมอไทย ให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ คือ 22.40 มม. (P<0.05) ดังแสดงผลในตารางที่ 4 และเมื่อทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารสกัดจากพืชทั้ง 6 ชนิด ให้มีค่าเป็น 6.5 ก่อนทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้น ผลพบว่า สารสกัดจากพืชทั้ง 6 ชนิดไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (ตารางที่ 5)



Campylobacter isolate A4



Campylobacter isolate B2

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาพที่ 7 แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *Campylobacter* spp. (A4 และ B2) ของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Semi-Solid Brucella Agar. (ใช้ 35 µl ของสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 200 มก./มล. ต่อหลุม)
A = สมอไทย, B = ราชดัด, C = พลู, D = ยอ, E = สารภี, F = มะขามป้อม, G= ชุมเห็ดเทศ
H = ส้มโอ, I = น้ำกลั่น (กลุ่มควบคุมผลลบ), J = 5% glacial acetic acid (กลุ่มควบคุมผลบวก)

ตาราง ที่ 4 แสดงผลของสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ Campylobacter 10ตัวอย่างที่ได้จากไก่

Campylobacter	**การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (มม.)***					
	สมอไทย	**มะขามป้อม**	**ชุมเห็ดเทศ**	**สารภี**	**พลู**	**ยอ**
A1	21±0.09	19±0.00	18±0.00	16±0.06	15±0.00	15±0.07
A2	22±0.00	17±0.05	15±0.00	15±0.06	15±0.00	15±0.07
A4	23±0.00	19±0.00	16±0.00	16±0.00	15±0.07	14±0.00
A6	21±0.00	16±0.00	16±0.00	15±0.00	17±0.00	15±0.00
B1	22±0.09	18±0.00	16±0.06	15±0.07	14±0.07	15±0.00
B2	22±0.08	18±0.05	18±0.01	15±0.00	15±0.08	15±0.00
B6	22±0.08	18±0.00	14±0.00	16±0.00	15±0.00	15±0.00
B7	24±0.04	18±0.00	15±0.00	16±0.00	17±0.06	15±0.00

B9	25±0.08	16±0.00	17±0.00	16±0.06	15±0.00	15±0.00
B10	22±0.04	19±0.05	16±0.00	15±0.06	15±0.07	15±0.00
ค่าเฉลี่ย	22.40±1.29[a]	17.80±1.09[b]	16.13±1.29[c]	15.50±0.57[cd]	15.30±0.92[cd]	14.80±0.89[d]

[a,b,c,cd,d] ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)* ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

น้ำกลั่น คือ negative control ซึ่งแสดงผล no clear zone ต่อเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลท (isolates) ที่ทำการทดสอบ5% glacial acetic acid คือ positive control ซึ่งให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส เท่ากับ 29.02±0.67 มม.

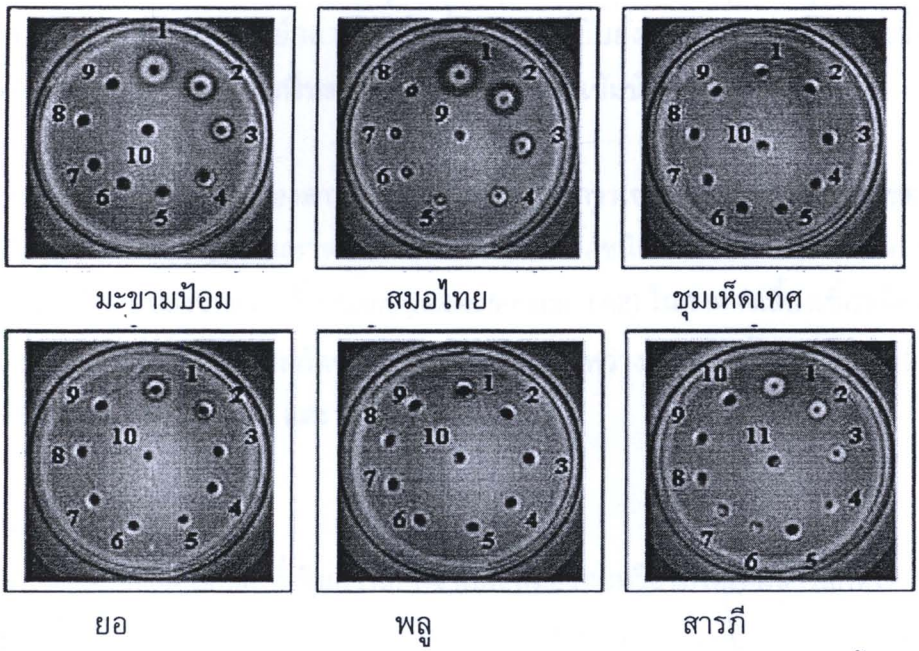
A1, A2, A4, A6, B1, B2, B6, B7, B9 และ B10 คือ *Campylobacter* ที่แยกได้จากไก่เส้นผ่านศูนย์กลางหลุม เท่ากับ 6 มม.

สารสกัดจากพืชสมุนไพร	**เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (มม.)**
สมอไทย ไม่ได้ปรับค่า pH 2.80	22.00±1.00
หลังปรับค่า pH ที่ 6.5	NC
มะขามป้อม ไม่ได้ปรับค่า pH 2.56	18.33±1.15
หลังปรับค่า pH ที่ 6.5	NC
ชุมเห็ดเทศ ไม่ได้ปรับค่า pH 4.55	16.33±1.53
หลังปรับค่า pH ที่ 6.5	NC
สารภี ไม่ได้ปรับค่า pH 3.85	15.67±0.58
หลังปรับค่า pH ที่ 6.5	NC
ยอ ไม่ได้ปรับค่า pH 3.65	14.67±0.58
หลังปรับค่า pH ที่ 6.5	NC
พลู ไม่ได้ปรับค่า pH 5.67	15±0.00
หลังปรับค่า pH ที่ 6.5	NC
NC = no clear zone, ไม่เกิดโซนใส (clear zone)	

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Campylobacter* spp. ของสารสกัดจากพืชทั้ง 6 ชนิด เมื่อทำการปรับค่าพีเอช (pH)

ขั้นตอนที่ 2 การหาความเข้มข้นต่ำสุด (minimal inhibitory concentration, MIC) ของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* spp.โดยวิธี agar well diffusion

ผลการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืช 6 ชนิดได้แก่ สารสกัดจากสมอไทย มะขามป้อม ชุมเห็ดเทศ สารภี ยอ และพลู ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* spp. (A2) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเป็นที่ชัดเจนว่าสารสมุนไพรออกฤทธิ์เพิ่มขึ้นหรือลดลงเมื่อเพิ่มหรือหรือลดลงของความเข้มข้นที่ใช้ และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อพบว่า ให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ



มะขามป้อม สมอไทย ชุมเห็ดเทศ

ยอ พลู สารภี

ภาพที่ 8 แสดงระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร ต่อเชื้อ *Campylobacter* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Semi-Solid Brucella Agar.

1 = 200 มก./มล., 2 = 100 มก./มล., 3 = 50 มก./มล., 4 = 25 มก./มล., 5 = 12.5 มก./มล.,
6 = 6.25 มก./มล., 7 = 3.12 มก./มล., 8 = 1.56 มก./มล., 9 = 0.78 มก./มล.,
10, 11 = น้ำกลั่น

จากตารางที่ 6 พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Campylobacter* spp. (A2) ของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรทั้ง 6 ชนิดอยู่ในช่วง 25-200 มก./มล. โดยสารสกัดจากผลสมอไทยและผลมะขามป้อมสามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *Campylobacter* spp. (A2) ได้ดีที่สุดโดยให้ค่า MIC เท่ากับ 25 มก./มล. รองลงมาคือ สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ และดอกสารภี มีค่าMIC เท่ากับ 50 มก./มล. ส่วนสารสกัดจากใบพลูพบว่า ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *Campylobacter* spp. (A2)ได้ต่ำสุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 200 มก./มล.

พืชสมุนไพร	**เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (มม.) ความเข้มข้นของสารสกัด (มก./มล.)**									
	0.78	**1.56**	**3.12**	**6.25**	**12.5**	**25**	**50**	**100**	**200**	**pH**
สมอไทย	-	-	-	-	-	10	15	18	22	2.80

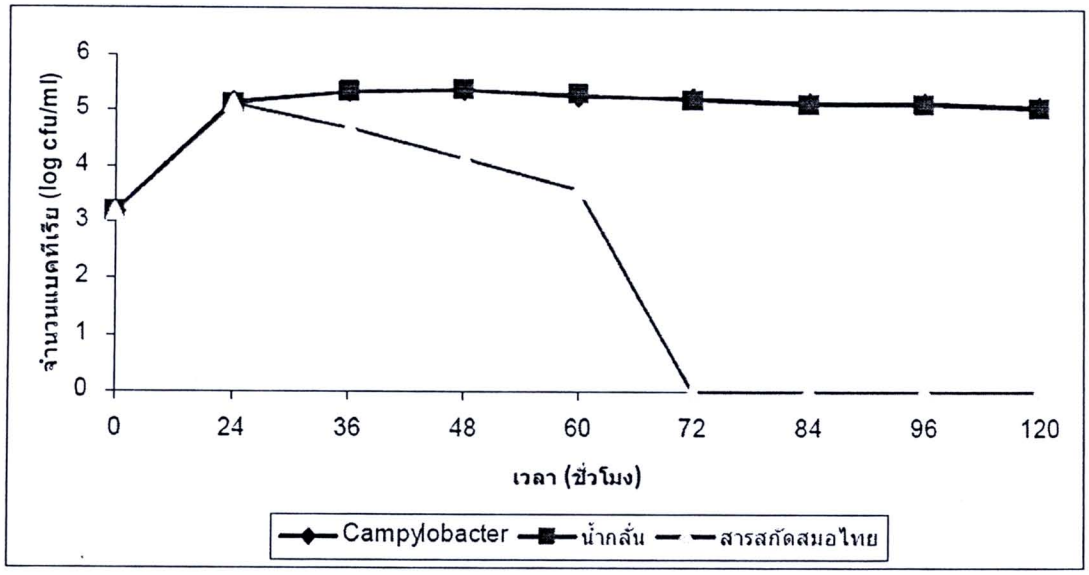
มะขามป้อม	-	-	-	-	-	10	14	17	20	2.56
ชุมเห็ดเทศ	-	-	-	-	-	-	12	14	16	4.55
ยอ	-	-	-	-	-	-		10	15	3.65
สารภี	-	-	-	-	-	-	15	13	8	3.85
พลู	-	-	-	-	-	-	-	-	14	5.67

ตารางที่6 เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Campylobacter* spp. (A2) ของสารสกัดหยาบพืชสมุนไพร ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาผลของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการเจริญและการเหลือรอดของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในขวดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Mueller-Hinton Broth การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ *Campylobacter* spp. (A2) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Mueller-Hinton Broth ที่เติมสารสกัดจากผลสมอไทย ในระหว่างการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 0, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 และ120 ชั่วโมง

ผลการทดลองพบว่า

Mueller-Hinton Broth ที่เติมสารสกัดจากผลสมอไทยหรือไม่ได้เติมสารสกัดใด ๆ ในระหว่างการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จำนวน *Campylobacter* ในขวดที่ 1 พบว่า จำนวนเชื้อมีการเจริญเติบโตคงที่ที่ 5.22±0.10 log10 CFU/ml จนสิ้นสุดการทดลอง ผลการทดลองของขวดที่ 2 (น้ำกลั่น) จะมีลักษณะคล้ายกันกับการเจริญเติบโตของเชื้อ *Campylobacter* ในขวดที่ 1 จนสิ้นสุดการทดลอง ส่วนในขวดที่ 3 พบว่า จำนวนเชื้อได้เริ่มลดลงจาก 5.11±0.04 log10 CFU/ml ในชั่วโมงที่ 24 และลดลงเรื่อย ๆ ที่ชั่วโมงที่ 60 พบว่ามี *Campylobacter* 3.58±0.11 log10 CFU/ml และเมื่อที่ 72 ชั่วโมง ไม่สามารถเพาะเชื้อได้จากตัวอย่างที่ 3 (ต่ำกว่า 10^2 CFU/ml) จนสิ้นสุดการทดลองจากภาพที่ 9 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ (log10 CFU/ml) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว



ภาพที่ 9 ผลสารสกัดจากผลสมอไทยที่ความเข้มข้น 50 มก./มล. ต่อ *Campylobacter* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Broth เทียบกับเวลาที่ 0 ชั่วโมงถึง 120 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 4 ศึกษาผลของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการเพิ่มจำนวนและการเหลือรอดของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในไก่ทดลอง

การเตรียมเชื้อเพื่อใช้ทดสอบ เตรียมสารละลายเชื้อ *Campylobacter* isolate (A2) ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland nephelometer standard 0.5 จากนั้นเจือจางด้วย 0.85% sterile normalsaline เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 106 CFU/mlไก่ทดลอง ใช้ไก่เนื้อ คละเพศอายุ 1 วัน จำนวน 40 ตัว จากบริษัทเบทาโกรเกษตรอุตสาหกรรม สาขาร้อยเอ็ดได้วางแผนการทดลองแบบสุ่มทั้งหมดโดยสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) โดยแบ่งลูกไก่ 40 ตัวออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว ให้อาหารและน้ำตามปกติเป็นเวลา 7 วัน (เพื่อปรับให้เข้ากับสภาพแวดล้อม)

แผนการทดลอง

กลุ่มที่ 1 ไม่ได้รับสารสกัดฯ, ไม่ได้รับเชื้อ

กลุ่มที่ 2 ไม่ได้รับสารสกัดฯ, ได้รับเชื้อ (ที่อายุ 9 วัน)

กลุ่มที่ 3 เริ่มได้รับสารสกัดฯในขนาด 2 เท่าของค่า MIC ก่อนได้รับเชื้อ 24 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 4 เริ่มได้รับสารสกัดจากพืชที่ผลิตในเชิงการค้า(commercial herbal medicine extract)

การเลี้ยงไก่ แต่ละกลุ่มเลี้ยงแบบปล่อยพื้นบนพื้นปูนรองพื้นด้วยแกลบ ขนาด 0.6 x 1.0 เมตร โดยแยกเลี้ยงในแต่ละคอกที่สร้างห่างกัน 2.50 เมตร ให้แสงสว่างตลอด 24 ชั่วโมงให้น้ำและอาหารกินเต็มที่ตลอดเวลา อาหารใช้อาหารสำหรับลูกไก่เนื้อระยะแรก โปรตีนไม่น้อยกว่า 21% และไม่มียาปฏิชีวนะผสม

การให้เชื้อแก่ไก่ ไก่แต่ละตัวในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 จะได้รับเชื้อขนาด $1x10^6$CFU/ml ใน 0.85% sterile normal saline 500 ไมโครลิตร โดยการป้อนทางปากเมื่อไก่อายุ 9 วันและได้อดอาหารก่อนป้อนเชื้อ 2 ชั่วโมงการให้สารสกัดหยาบพืชสมุนไพร ไก่จะได้รับสารสกัดติดต่อกัน 4 วันโดยเริ่มวันที่ 8, 9, 10, 11 โดยสารสกัดหยาบพืชสมุนไพรจะละลายในน้ำกลั่นโดยให้สารสกัดมีความเข้มข้นเท่ากับ 50 มก./มล. ก่อนป้อนเข้ากระเพาะพักโดยตรง ในปริมาณ 0.5 มล. ด้วยกระบอกฉีดยาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยป้อนให้ไก่ทุกตัวเมื่ออายุไก่ได้ 6 วัน ทำ cloaca swab ลูกไก่ ในแต่ละกลุ่มทุกตัว

เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อโดยใช้ก้านสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแหย่เข้าไปในทวารไก่ลึกประมาณ 2.5 ซม. หรือป้ายอุจจาระที่ติดอยู่ที่ cloaca ของไก่ แล้วนำใส่ในหลอดทดลองปิดฝาหลอดให้แน่น บรรจุในถังส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุขทันที หลังจากนั้นทำ cloacal swabs ทุกวันจนกระทั่งลูกไก่อายุได้ 8 วัน การเก็บตัวอย่างเมื่อลูกไก่อายุ 12 วัน ไก่ทุกตัวจะถูกทำสลบโดยวิธีฉีด70% alcohal เข้าสมอง แล้วทำการผ่าซากเก็บลำไส้บริเวณไส้ตัน (caecum) เพื่อตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* โดยเก็บ caecum ทุกตัวนำกากอาหาร (caecal content) ที่อยู่ในไส้ตัน ของไก่แต่ละตัวมา 1 กรัม เพื่อทำการเจือจาง 10 เท่าด้วย 0.1% peptone water (PW) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องvortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นเจือจางลำดับขั้นครั้งละ 10 เท่าจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม จึงนำตัวอย่างที่ได้มาเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ mCCDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง ภายใต้ microaerophilic condition แล้วจึงนับจำนวนโคโลนี เพื่อแสดงผลจำนวนโคโลนีเป็นค่า log10 CFU/g เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่พบในแต่ละกลุ่ม

ผลการทดลองพบว่า จากการตรวจนับจำนวนเชื้อ *Campylobacter* spp. (A2) จากไส้ตันไก่ จำนวน 40 ตัว ไม่พบเชื้อในกลุ่มที่ 1 (ไม่ได้ป้อนเชื้อ)ในกลุ่มควบคุมที่ 2 (ป้อนเชื้อ), กลุ่มที่ 3 (ป้อนสารสกัดหยาบสมอ
ไทย) และกลุ่มที่ 4 (ป้อนสารสกัดพืชเชิงพาณิชย์) พบว่า มีค่าเป็น 8.07±0.62, 5.72±2.05 และ 7.20±0.96 log10 CFU/g ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 7 จะเห็นว่า จำนวนเชื้อ *Campylobacter* ของไก่ในกลุ่มที่ 3 (ป้อนสารสกัดหยาบสมอไทย) และกลุ่มที่ 4 (ป้อนสารสกัดพืชเชิงพาณิชย์) มีจำนวนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีการป้อนเชื้อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)และไก่ในกลุ่มที่ 3 (ป้อนสารสกัดหยาบสมอไทย) มีจำนวนเชื้อ *Campylobacter* น้อยกว่ากลุ่มที่ 4(ป้อนสารสกัดพืชเชิงพาณิชย์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบสารสกัดสมุนไพรสมอไทย และสารเชิงพาณิชย์ต่อ *Campylobacter* ใน ไก่ทดลอง ในช่วงอายุ 0-12 วัน

กลุ่มทดลอง	ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนี (log_{10} CFU/g)*
กลุ่มที่ 1 (ไม่ได้ป้อนเชื้อ)	UD
กลุ่มที่ 2 (ป้อนเชื้อ)	8.07 ± 0.62^{a}
กลุ่มที่ 3 (ป้อนสารสกัดหยาบสมอไทย)	5.72 ± 2.05^{b}
กลุ่มที่ 4 (ป้อนสารสกัดพืชเชิงพาณิชย์)	7.20 ± 0.96^{a}

[a,b] ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

* ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

UD = จำนวนโคโลนีต่ำกว่า 100 CFU/ml, หรือตรวจไม่พบ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

อภิปรายผลการทดลอง

จากผลการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่าไก่ที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเพื่อการค้า และเพื่อเป็นอาหารภายในครัวเรือน (หลังบ้าน) ต่างเป็นแหล่งสะสมเชื้อ Campylobacter ซึ่งไก่ไม่แสดงอาการแต่งอย่างใดลักษณะภายในดูแล้วปกติมีสุขภาพดี จึงเป็นเหตุผลให้จะต้องมีการเฝ้าระวังเชื้อและควบคุมเชื้อนี้ในไก่เนื้อ เนื่องจากเมื่อเชื้อนี้ยังคงอยู่ในไก่และไก่ตัวที่มีเชื้อสามารถแพร่เชื้อสู่ไก่ตัวอื่นรวมทั้งสิ่งแวดล้อมด้วย ขณะเดียวกันเมื่อไก่ถูกนำเข้ามาสู่กระบวนการบริโภคไก่ยังสามารถปลดปล่อยเชื้อในกระบวนการฆ่าไก่ และมีการปนเปื้อนอย่างหนักในโรงฆ่าหรือกระบวนการฆ่า ทำให้เนื้อไก่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนที่ผิวหนัง และเมื่อนำไปบริโภคแล้วจะทำให้ผู้บริโภคเจ็บป่วยด้วยอาการ Campylobacteriosis ได้ การค้นหาสารหรือจุลชีพที่สามารถยับยั้ง Campylobacter จึงเป็นความต้องการอย่างเร่งด่วน

ไก่เนื้อที่เลี้ยงหลังบ้านและเลี้ยงในฟาร์มในระดับอุตสาหกรรมนั้นมีจำนวนมากในประเทศไทย การค้นหาสิ่งที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อ จึงมีความจำเป็นอย่างมากโดยการทดลองของผู้วิจัย ได้ตั้งสมมุติฐานของการทดลองนี้อยู่บนพื้นฐานที่ถ้าไก่ปลอดเชื้อ Campylobacter แล้วไก่ตัวนั้นน่าจะมีบางสิ่งในตัวไก่นั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้และในการทดลองของเราพบว่า Normal flora profile ในไก่ที่มีความแตกต่างกันในสภาพแวดล้อมและแหล่งการเลี้ยงแตกต่างกันจะมีความแตกต่างกันโดยที่ไก่ที่เลี้ยงหลังบ้านถูกแยกออกจากไก่ที่เลี้ยงในอุตสาหกรรมโดยวิธี RAPD และ Phytogenetic tree ซึ่งผลการทดลองนี้พบจำนวนแถบ DNA ของไก่ทั้ง 2 กลุ่มถูกแยกออกจากกันอย่างชัดเจน อาจจะเป็นเพราะไก่ถูกเลี้ยงแตกต่างกันโอกาสสัมผัสกันกับสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ พื้นดิน แมลง อาหาร น่าจะมีผล Normal flora ในไก่ทั้ง 2 กลุ่มนี้

เมื่อคัดแยกกลุ่ม Normal flora เพื่อเสาะหาจุลชีพที่ดีในการยับยั้งเชื้อCampylobacter จากผลการทดลองพบว่าเชื้อกลุ่ม lactobacillus และ Anaerobic นั้นมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโต Campylobacter ได้เป็นจำนวนหลายๆกลุ่มและหลายเชื้อที่ได้คัดแยกออกมาจากไก่ที่ปลอดเชื้อ Campylobacter ตามสมมุติฐานข้างต้น และเมื่อนำกลุ่มเชื้อที่ดีนั้นมาทดสอบฤทธิ์ต่อเชื้อ Campylobacter ในสภาวะต่างๆ แล้วปรากฏว่าเชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Lactobacillus) จึงไม่สามารถนำเชื้อนี้นำมาพัฒนาต่อไปได้ เนื่องจากมีข้อจำกัดบางประการ โดยตามสมมุติฐานข้างต้นที่ผลการปลอดเชื้อ Campylobacter ในไก่นั้นน่าจะเกิดจากทำงานร่วมกันผลของแบคทีเรียดีหลายๆ ชนิด หรือ หลายๆ กลุ่มแบคทีเรียในตัวไก่ (ไม่ใช่ชนิดเดียว) ช่วยกันทำงานต่อต้านเชื้อ Campylobacter ได้ ซึ่งข้อส่วนนี้งานนี้ยังไม่มีข้อสรุป และยังเป็นการยากต่อการพิสูจน์ตามความเชื่อนี้ได้ จึงต้องมีการพัฒนาแนวคิดนี้ต่อไป

ส่วนเชื้อ Campylobacter ที่สามารถคัดแยกออกมาได้จากไก่หลังบ้านและไก่ที่เลี้ยงในอุตสาหกรรม เพื่อศึกษาความเหมือนหรือความแตกต่างของเชื้อในแง่การระบาดของเชื้อในไก่เนื้อที่เลี้ยงโดย 2 ระบบ พบว่า Campylobacter จาก 2 แหล่งหรือระบบการผลิตมีความแกต่างกันและถูกจัดกลุ่ม

แยกออกจากกันอย่างเห็นได้ชัดจากการวิเคราะห์โดย Phytogenetic tree โดยใช้วิธีของ RAPD ซึ่งพอสรุปได้ว่าเชื้อ Campylobacter ที่ระบาดในกลุ่มของไก่หลังบ้าน และไก่เลี้ยงแบบอุตสาหกรรม เป็น

จากผลการศึกษา เมื่อทำการทดสอบสารสกัดสมุนไพรจำนวน 60 ชนิด พบว่า สารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ethanol) จากพืชสมุนไพร 6 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ*Campylobacter* ที่แยกได้จากลำไส้ไก่ได้ เมื่อพิจารณาจากสารสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีรายงานการแยกพบในส่วนต่าง ๆ ของพืช พบว่ามีหลายชนิดส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม 6 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ alkaloids,flavonoids, terpenoids, lectins, polyphenols และ tannins ซึ่งสารประกอบทั้งหมดนี้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญที่สกัดได้จากพืชจะแตกต่างกันไป เช่นสารกลุ่ม alkaloids จะออกฤทธิ์ขัดขวางหรือยับยั้งการสร้าง nucleic acid สารกลุ่ม flavonoids จะออกฤทธิ์ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์และออกฤทธิ์ต่อเซลล์เมมเบรน (Tsuchiya et al., 1996) สารกลุ่ม terpenoids จะออกฤทธิ์ต่อเซลล์เมมเบรน (Ramar PerumalSamy, Ponnampalam Gopalakrishnakone, 2008) สารกลุ่ม lectins จะออกฤทธิ์แบบแข่งขัน หรือขัดขวางการสร้างmetabolite ที่จำเป็นต่อเซลล์แบคทีเรีย ทำให้เซลล์แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตและหยุดการแบ่งตัว สารกลุ่ม polyphenols จะออกฤทธิ์ขัดขวางการสร้างmetabolite ที่จำเป็นต่อเซลล์แบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อสงสัยถึงเงื่อนไขหรือปัจจัยที่จะทำให้ได้สารสำคัญดังกล่าวนี้จากพืช รวมทั้งกรรมวิธีในการสกัดเพื่อสกัดเอาสารสำคัญดังกล่าวออกมาเพราะฉะนั้น จึงได้มีการใช้ตัวทำละลายหลาย ๆ ชนิดในการสกัดสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากพืช ซึ่งตัวทำละลายที่นิยมใช้ได้แก่ เมทานอล (methanol) หรือ เอทานอล (ethanol)ใช้สำหรับสกัดสารจำพวก อัลคาลอยด์, ตัวทำละลายอะซิโตน (acetone) สำหรับสกัดสารจำพวกฟลาโวนอยด์ และสเตอรอยด์, ตัวทำละลายเฮกเซนไดเอทิธอีเทอร์ (hexane diethyl ether) และคลอโรฟอร์ม (chloroform) สำหรับสกัดสารจำพวก ไขมันที่ละลายในน้ำมัน ขี้ผึ้ง ไลปิด และ อีสเตอร์, ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) สำหรับสกัดสารจำพวก เทอฟีนอยด์, ตัวทำละลายเอทิธอะซิเตรท (ethyl acetate) สำหรับสกัดสารจำพวกอีสเตอร์, ตัวทำละลายเอทานอล(ethanol) สำหรับสกัดสารจำพวก สเตอรอล โพลีฟีนอล แทนนิน และน้ำสำหรับสกัดสารประกอบ
ที่ละลายในน้ำได้ เช่น ไกลโคไซด์ โพลีแซคคาไรด์ โพลีเปปไตท์ และ แลคติน ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายเนื่องจากมีความสามารถในการสกัดสารได้กว้างมากทั้ง flavonoids, tannins และ alkaloids สามารถละลายได้ในตัวทำละลายชนิดนี้ เมื่อนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 60 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Campylobacter* พบว่า สารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลจากพืช 6 ชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Campylobacter* เมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ สารสกัดจากลูกสมอไทย สารสกัดจากมะขามป้อม สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ สารสกัดจากดอกสารภี สารสกัดจากผลยอดิบ และสารสกัดจากใบพลู ถึงแม้ว่าจะมีความแตกต่างกันในด้านประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของสารสกัดจากพืชทั้ง 6 ชนิด โดยที่สารสกัดจากลูกสมอไทย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดโดยให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสรอบ ๆ ปากหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อกว้างที่สุด และให้ระดับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ต่ำที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 25 มก./มล. มีหลายงานวิจัยที่ได้รายงานผลการศึกษาถึประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมอไทย ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ก่อโรคหลาย ๆ ตัว เมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ อาทิเช่น สารสกัดจากลูกสมอไทยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ อย่างเช่นเชื้อ *Salmonella* Typhi, *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* จากรายงานการศึกษาข้างบนและจากผลการวิจัยนี้ สารสกัดจากลูกสมอไทยที่สกัดโดยเอทานอลน่าจะมีสาร flavonoids, tannins และ alkaloids สามารถฆ่าเชื้อ *Campylobacter* ได้ จึงเป็นจุดที่น่าสนใจนำไปศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดจากลูกสมอไทยนี้มาใช้ทดแทนสารเคมีหรือยาปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบัน อย่างไรก็ตาม เนื่องจากมีความแตกต่างกันในหลายปัจจัยที่ทำการศึกษาดังเช่น ปริมาณเชื้อที่ให้, ช่วงระยะการเจริญเติบโตของเชื้อ, อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้, ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งระยะเวลาและอุณหภูมิในการเพาะเชื้อ การเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลที่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของสารสกัดลูกสมอไทย จึงเป็นเรื่องยากการออกฤทธิ์ในสมุนไพร ดังจะเห็นได้จากสมุนไพรสูตรผสมที่มีสมอไทย ซึ่งมีสารออกฤทธิ์สำคัญคือ แทนนิน (tannin) เป็นส่วนผสมหลักและมีสมุนไพรตัวอื่นผสมอยู่ในอัตราส่วนที่ต่ำกว่าจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าสูตรผสมอื่น ๆ เมื่อดูจากขนาดโซนใสที่กว้างกว่าผลที่ได้จากการศึกษาที่ได้ทดสอบในห้องปฏิบัติการถึงแม้ว่าสารสกัดจากลูกสมอไทยจะให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *Campylobacter* ได้ดีที่สุด จากจำนวนสารสกัดจากพืชทั้งหมด 60 ชนิด เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในตัวไก่จะเห็นว่า การให้สารสกัดจากลูกสมอไทยก่อนให้เชื้อสามารถลดจำนวนเชื้อลงได้ ทั้งนี้เชื่อว่าฤทธิ์ในการทำลายเชื้อส่วนหนึ่งน่าจะมาจาก แทนนิน (tannins) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในผลสมอไทย และการออกฤทธิ์ของแทนนิน (tannins) นั้นเกิดขึ้นจากการเข้าทำปฏิกิริยากับโปรโตพลาสม (protoplasm) ของแบคทีเรียทำให้เกิดการตกตะกอนแต่การออกฤทธิ์ของแทนนิน (tannins) ไม่ได้เฉพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรียเท่านั้น เพราะสามารถทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อที่สัมผัสได้ โดยพบว่าเมื่อให้โดยการกินในขนาดที่ต่ำจะทำให้เนื้อเยื่อทางเดินอาหารชั้นนอกตกตะกอนทำให้การซึมผ่านลดลงและช่วยป้องกันเนื้อเยื่อชั้นในจากปฏิกิริยาของเชื้อแบคทีเรีย แต่ถ้าให้ในขนาดที่สูงขึ้นจะทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนในชั้นที่ลึกลงไปของผนังทางเดินอาหาร เกิดการอักเสบ และท้องเสียได้ นอกจากนั้นยังมีข้อมูลว่า การให้แทนนิน (tannins) ในรูปอิสระไม่เหมาะที่จะให้โดยการป้อนทางปาก เพราะว่าคุณสมบัติความเป็นกรดอ่อนนอกจากจะมีฤทธิ์จับกับโปรตีนของเยื่อบุของทางเดินอาหารแล้ว ยังถูกทำลายได้โดยเร็วจากสภาพด่างในบริเวณลำไส้เล็กอย่างไรก็ตามเนื่องจากการเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพรครั้งนี้ ใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย ซึ่งนอกจากแทนนิน (tannins) แล้วย่อมมีสารสำคัญชนิดอื่น ๆ เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียของสาระสำคัญเหล่านั้นภายในตัวไก่ยังไม่ทราบ จึงต้องมีการศึกษาในเชิงลึกต่อไป

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

---

1. **ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ**

1.1ได้ส่งผลงานไปตีพิมพ์ที่ Elsevier publisher for International Journal of Food Microbiology **ใน เรื่อง** Antibacterial activity of medicinal plant crude extracts against *Campylobacter* spp. isolated from chickens ผลไม่ถูกรับเข้าตีพิมพ์ เหตุผลตามจดหมายแนบ และอยู่ในขั้นตอนการปรับปรุงแล้วส่งไปยังวรสารระดับนานาชาติอื่นแทน

1.2 กำลังอยู่ในขั้นตอนการเตรียมต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์เรื่อง

Broiler commercial or Backyard Chickens as a potential source of developing probiotic bacteria for combating Campylobacter spp.

2. **การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์**

   ยังไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์

3. **นำพื้นฐานความรู้และความชำนาญในการสอนนักศึกษาระดับปริญญาโทสาขาสัตวแพทย์สาธารณสุข ที่ทำงานและวิทยานิพนธ์ภายใต้หัวข้อ Campylobacter จำนวน 3 คน**

3.1 Risk factors of Campylobacter contamination on pig carcasses from slaughterhouse นักศึกษาชื่อ นายสุธิดล ไชยชิน สถานะ จบการศึกษาและมีผลงานตีพิมพ์ใน วรสาร สัตวแพทย์ มข. (ตามมาตรฐานของสกอ. TCI)

3.2 Efficacy of medicinal plant crude extracts on growth inhibition of *Campylobacter* spp. isolated from chickens. นักศึกษาชื่อ นายชัยพร สร้อยคำ สถานะ จบการศึกษา(กำลังอยู่ในการเตรียมส่งตีพิมพ์)

3.3 Prevalence and Risk Factors of *Campylobacter spp.* Contamination on Organic and Conventional Broiler Flocks นักศึกษาชื่อ นายเทวิน แสวงสิน สถานะ จบการศึกษาและมีผลงานตีพิมพ์ใน วรสาร สัตวแพทย์ มข. (ตามมาตรฐานของสกอ. TCI)

4. **การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ**