

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

(ภาษาไทย) การศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรแก้ และพืชเหล็กต่อการตายของพยาธิ
ตัวกลมในกระเพาะแห่งของวัว *Mecistocirrus digitatus*

(ภาษาอังกฤษ) Study the killing potential of crude extract from *Murraya paniculata* and
Cassia siamea on *Mecistocirrus digitatus*.

ได้ทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551 จำนวนเงิน 300,000 บาท

ระยะเวลาการทำวิจัย 1 ปี เริ่มการทำวิจัยเมื่อ 1 ตุลาคม 2551

รายงานความก้าวหน้าของงานวิจัย ครั้งที่ 2 ระหว่าง ธันวาคม 2551 ถึงธันวาคม 2552

รายนามคณะวิจัย

หัวหน้าโครงการ

นางมณัญญา ปรียวิชญภักดี

วท.บ. , วท.ม.

Mrs.Mananya Preyavitchayapugdee

B.Sc., M.Sc.

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

เลขที่ 38 หมู่ 8 ต.นาวิ่ง อ.เมือง จ.เพชรบุรี 76000

โทรศัพท์ 084-6488835 โทรสาร 032-493270

ผู้ร่วมวิจัย

1. นรินทร์ ปรียวิชญภักดี

สพ.บ. , ประ.ด.

Narin Preyavichyapugdee

DVM, Ph.D.

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร

วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

อำเภอสามพระยา อำเภอสทิงพระ จังหวัดเพชรบุรี

โทร. 032-594043 โทรสาร. 032-594037-8

โทร. 032-228419

2.นางสาวยุภา ปู้แตงอ่อน

Miss Yupa Pootang-on

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร

วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

อำเภอสามพระยา อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

โทร. 032-594043 โทรสาร. 032-594037-8, 032-228419

3. ศิริวรรณ แดงน้ำ

Siriwan Dangcham

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ต. นาุ้ง อ. เมือง จ. เพชรบุรี 76000

โทรศัพท์ 089 492 6420, 032 493 270

4. วนิดา มากศิริ

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ต. นาุ้ง อ. เมือง จ. เพชรบุรี 76000

โทรศัพท์ 089 492 6420, 032 493 270

5. มหิสร ประภาสะโนบล

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ต. นาุ้ง อ. เมือง จ. เพชรบุรี 76000

โทรศัพท์ 089 492 6420, 032 493 270

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

ปรสิตหนอนพยาธิตัวกลมในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง เป็นปัญหาที่สำคัญในอันดับต้นๆ ของการเลี้ยงปศุสัตว์แบบปล่อยทุ่งทั้งในประเทศที่พัฒนาแล้วและกำลังพัฒนา (Perry and Randolph, 1999; Perry et al., 2002) ซึ่งความสูญเสียที่เกิดขึ้นมีทั้งโดยตรงต่อสุขภาพสัตว์ ทำให้ผลผลิตลดลง หรือการติดเชื้อพยาธิที่รุนแรงมีผลทำให้สัตว์ตาย ส่วนผลกระทบทางอ้อมทำให้เกิดการสิ้นเปลืองงบประมาณในการลงทุนจัดซื้อยาถ่ายพยาธิ การจ้างแรงงานเพื่อจัดการทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ ตลอดจนสูญเสียงบประมาณไปกับค่าอาหารสัตว์โดยไม่คุ้มกับผลผลิตที่ได้และสัตว์ให้คุณภาพซากที่ไม่ดี (Dareje, 2009) ส่งผลให้แต่ละปี ทั่วโลกมีการสูญเสียงบประมาณจำนวนมากต่อความพยายามในการกำจัดพยาธิ (Jabar et al., 2006)

ยาถ่ายพยาธิที่มีในปัจจุบัน มีการใช้อย่างแพร่หลาย แต่รายงานการดื้อต่อยาของปรสิตหนอนพยาธิตัวกลมยังคงมีอยู่ต่อเนื่อง (Van Wyk et al., 1997; Waller, 2003; Jabbar et al., 2006; Saddiqi et al., 2006; Saeed et al., 2007) ประกอบกับปัจจุบันผู้บริโภคห่วงใยต่อสุขภาพมากขึ้น ผู้บริโภคมีความวิตกกังวลในเรื่องยาตกค้างในอาหาร และความต้องการบริโภคอาหารอินทรีย์ (organic food) ที่ผลิตจากกระบวนการธรรมชาติทั่วโลกเพิ่มขึ้นซึ่ง จากการศึกษาของสมาพันธ์เกษตรอินทรีย์นานาชาติ (International Federation of Organic Agriculture Movements-IFOAM) พบว่าตลาดผลิตเกษตรอินทรีย์ปี พ.ศ. 2547 มีมูลค่าสูงถึง 27,800 ล้านดอลลาร์ (ประมาณ 1.05 ล้านล้านบาท) (<http://www.dld.go.th/organic/organic/principle/principle.html>) โดยผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และนม เป็นสินค้าปศุสัตว์อินทรีย์ที่สำคัญ ซึ่งประเทศไทยได้มีการดำเนินโครงการพัฒนาปศุสัตว์อินทรีย์ โดยกรมปศุสัตว์มาตั้งแต่ปี 2549 เป็นต้นมา (<http://www.dld.go.th/organic/organic/principle/principle.html>) ซึ่งรูปแบบการเลี้ยงสัตว์ที่ตอบสนองต่อการผลิตแบบปศุสัตว์อินทรีย์ ใช้ระบบการเลี้ยงปศุสัตว์แบบปล่อยทุ่ง ดังนั้น เกษตรกรยังคงเผชิญปัญหาจากการที่ปศุสัตว์ถูกเลี้ยงแบบปล่อยทุ่งดังกล่าว ติดพยาธิ ดังนั้นเพื่อแก้ไขการดื้อยาของพยาธิที่ใช้ในปัจจุบัน และทำให้การเลี้ยงสัตว์แบบปศุสัตว์อินทรีย์บรรลุผล ทำให้การวิจัยเพื่อมองหาทางเลือกใหม่สำหรับการใช้ยากำจัดพยาธิที่ไม่ใช่การใช้สารเคมี แต่มีต้นกำเนิดมาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ หรือสมุนไพร เป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งนอกจากเป็นทางเลือกใหม่สำหรับเกษตรกรและผู้บริโภคแล้ว ยังเป็นแนวทางที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมด้วย

โรคปรสิตหนอนพยาธิในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องเกิดจากหนอนพยาธิตัวกลมที่สำคัญ ได้แก่พยาธิสตรองกายกลุ่มที่อยู่ใน superfamily Tricoststrongyloidea ซึ่งเป็นปรสิตที่อาศัยอยู่ในส่วนของกระเพาะแท้ ก่อให้เกิดอันตรายในสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยเฉพาะโค กระบือ และแกะ เนื่องจากถูกพยาธิดูดเลือด แย่งอาหาร และ/หรือรบกวนโฮสต์ ทำให้ร่างกายอ่อนแอ เจริญเติบโตช้า โลหิตจาง ชุ่มพอม เกิดโรคแทรกซ้อนได้ง่าย และสัตว์อาจถึงตายได้ (Kaufmann, 1996) ปรสิต

หนอนพยาธิในกลุ่มนี้ที่ทำอันตรายต่อโคและมีความสำคัญทางปศุสัตว์ในประเทศไทยมี 2 สกุล ได้แก่ เฮมอนคัส เฟลซิชัย (*Haemonchus placei*) เมซิสโตเซอร์ส ดิจิตาตัส (*Mecistocirrus digitatus*) ซึ่งทั้งสองชนิดเป็นพยาธิที่อยู่ในกระเพาะแท้ (สนธยา, 2000) และมีการก่อโรคที่คล้ายกัน (วีรพล ทวีนนท์, 2547) ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างพยาธิจากโรงฆ่าสัตว์ในพื้นที่ อ.ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี พบว่าพยาธิที่พบเป็น *M. digitatus* จึงได้ใช้พยาธิดังกล่าวเป็นตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ และพืชสมุนไพรที่นำมาทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าพยาธิได้เลือกใช้ส่วนของพืชจากพืชสองชนิด คือ ต้นแก้ว และต้นขี้เหล็ก ซึ่งพืชทั้งสองได้มีรายงานโดย ชโลบลและคณะ (2005, 2007) พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของรากขี้เหล็กและแก้วมีต่อการฆ่าพยาธิ *Stellantchasmus falcatus* และ *Haplorchis taichui* ได้ตามลำดับ และเมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงพื้นผิวลำตัว ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด (Scanning Electron microscope) พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรทั้งสองชนิด ส่งผลให้เกิดการบวมของผนังลำตัวเป็นกระเปาะ (Bleb) และแตกออกเป็นบาดแผล และลอกหลุดในที่สุด ในการทดลองนี้จึงนำ สารสกัดจากรากขี้เหล็กและแก้วมาทดสอบกับพยาธิตัวกลมใน Superfamily Trichostrongyloid โดยใช้ *M. digitatus*. ซึ่งเป็นพยาธิตัวกลมในกระเพาะแท้ของวัว เป็นตัวอย่างทดสอบ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดจากพืชสมุนไพร ใบแก้ว รากขี้เหล็ก และ ใบขี้เหล็ก ในการฆ่าพยาธิตัวกลมในกระเพาะแท้ของวัว *M. digitatus*
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงผิวพยาธิ *M. digitatus* โดยสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการฆ่าพยาธิ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope)

1.3 คำสำคัญ (Keyword) ของการวิจัย

รากขี้เหล็ก (*Cassia siamea* Britt. Root) แก้ว (*Murraya poniculat*) พยาธิตัวกลมในกระเพาะแท้ของวัว (*M. digitatus*.)

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาสารสกัดจากพืชสมุนไพร รากขี้เหล็กและแก้วมีฤทธิ์ในการฆ่าพยาธิ *M. digitatus*. นอกตัวสัตว์ (*in vitro*) ได้หรือไม่ โดยศึกษาสัดส่วนจำนวนพยาธิที่ตายเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัด
2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่ผิวพยาธิ โดยศึกษาด้วยเทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope)

1.5 ทฤษฎี สมมติฐาน และหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

ปัจจุบันการควบคุมและกำจัดพยาธิตัวกลมในสัตว์เคี้ยวเอื้อง มีการใช้ยาในกลุ่ม anthelmintics drugs ซึ่งเป็นสารเคมี เช่น Albendazole, Fenbendazole และ Levamisole เป็นต้น แต่มีรายงานว่าเมื่อใช้ไปนานๆ พยาธิอาจดื้อต่อยาได้ (Van Wyk *et al.*, 1997; Lane, 1998, Waller, 2003; Jabbar *et al.*, 2006; Saddiqi *et al.*, 2006; Saeed *et al.*, 2007) และการใช้ยาต้องกระทำสม่ำเสมอ จึงทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง และมีสารปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ขึ้น ดังนั้นการมองหาทางเลือกในการใช้ยากำจัดพยาธิที่มาจากผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เช่น สมุนไพร เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ควรมีการศึกษาในการทดลองนี้เป็นการทดลองใช้สารสกัดจากพืชสองชนิด คือ รากขี้เหล็กและแก้ว เพื่อศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรทั้งสองชนิดว่าสามารถฆ่าพยาธิตัวกลมได้หรือไม่ ชโลบลและคณะ (2005) พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของรากขี้เหล็กและแก้วมีต่อการฆ่าพยาธิ *Stellantchasmus falcatus* และ *Haplorchis taichui* ได้ตามลำดับ และเมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงพื้นผิวลำตัว ด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron microscope) พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรทั้งสองชนิด ส่งผลให้เกิดการบวมของผนังลำตัวเป็นกระเปาะ (Bleb) และแตกออกเป็นบาดแผล และลอกหลุดในที่สุด ในการทดลองนี้จึงนำสารสกัดจากรากขี้เหล็กและแก้วมาทดสอบกับพยาธิตัวกลมในกระเพาะตัวของวัวใน Superfamily Trichostrongyloid โดยใช้ *M. digitatus* เป็นตัวอย่างพยาธิที่นำมาทดสอบ

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรรากขี้เหล็ก และแก้วสามารถฆ่าพยาธิตัวกลมในกระเพาะวัว *M. digitatus*. ได้หรือไม่
2. ทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นบนผิวพยาธิ (*Tegumental surface*) อันเป็นผลจากการสารสกัดจากพืชสมุนไพร รากขี้เหล็กและแก้ว
3. เป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการพัฒนายาฆ่าพยาธิ

2. ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ลักษณะทั่วไปของพยาธิตัวกลม *Mecistocirrus digitatus* (Linstow, 1906)

สำหรับหนอนพยาธิตัวกลมชนิดนี้จัดเป็นพยาธิที่พบในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง จัดอยู่ใน Phylum Nematoda, Class Secernentea ซึ่งมีการจำแนกไว้ดังนี้

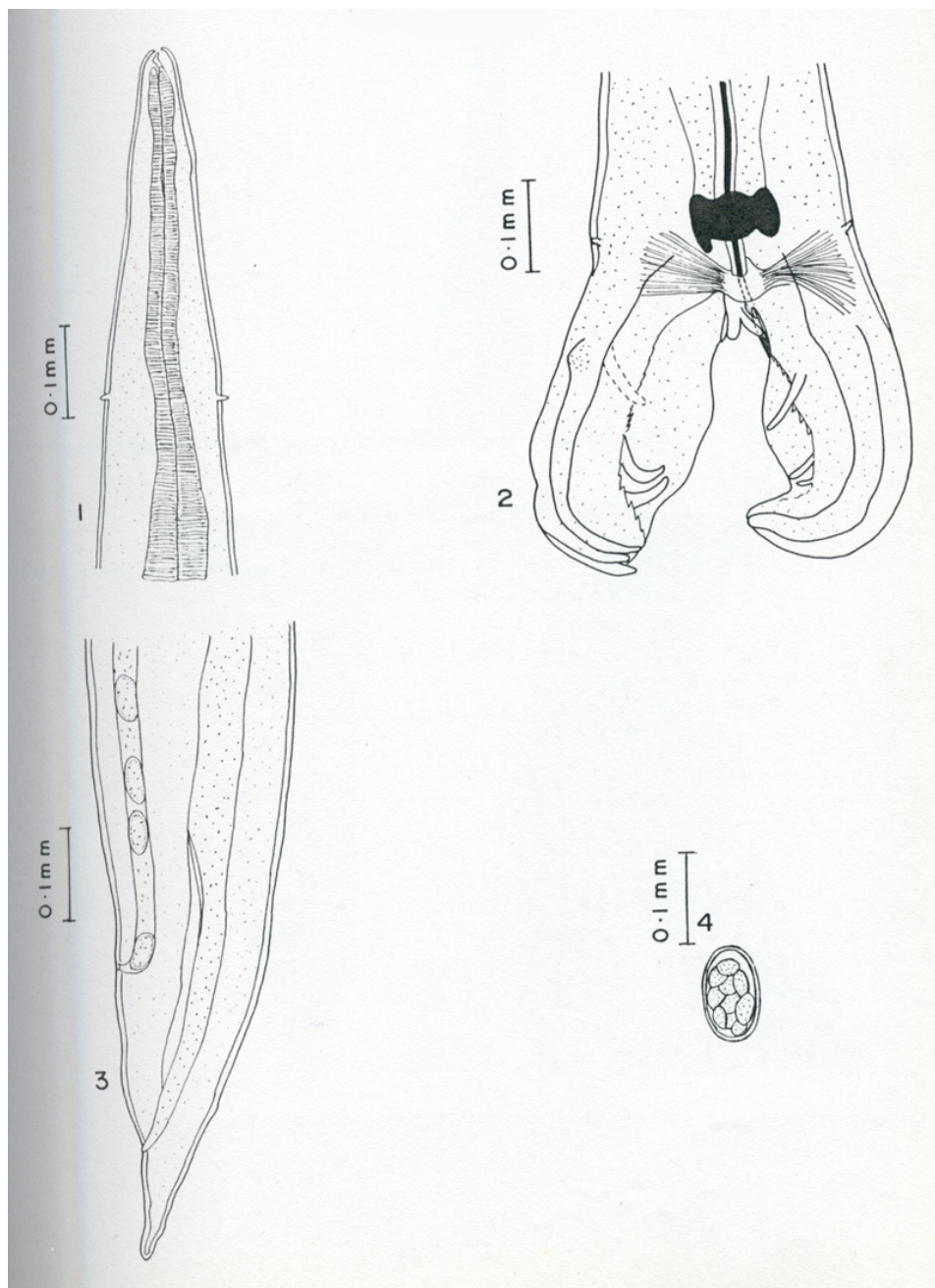
Phylum	Nematoda
Class	Secernentea
Order	Strongylida
Superfamily	Tricoststrongyloidea
Family	Haemonchinae
Genus	<i>Mecistocirrus</i>
Species	<i>Mecistocirrus digitatus</i>

M. digitatus (large stomach worm) เป็นปรสิตหนอนพยาธิตัวกลมในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ที่พบใน abomasum ของแกะ แพะ โค และพวกสัตว์เคี้ยวเอื้องอีกหลายชนิด พยาธิชนิดนี้เป็นปัญหาที่พบทั้งในเอเชีย อเมริกากลาง และอียิปต์ และรัสเซีย (Soulsby, 1982; Fernando, 1965; Fukumoto *et al.*, 1990; Lichtenfels and Pillitt, 2000; Van *et al.*, 1997; Van *et al.*, 1998)

2.1.1 รูปร่างลักษณะ

พยาธิตัวเต็มวัย (ภาพที่ 1) มีช่องปากเล็ก ภายในช่องปากมี dorsal lancet และมี cervical papillae เห็นได้ชัด ตัวผู้ยาว 31 ม.ม. กว้าง 0.35-0.52 ม.ม. มีแผนหางเจริญดี ประกอบด้วย dorsal lobe เล็ก แต่ lateral lobe ใหญ่ มี ventro-ventral ray สั้น ในขณะที่ latero-lateral ray ยาวและยาวกว่า ray อื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด มี spicule 2 อัน ลักษณะยาวเรียวและติดกันเกือบตลอดความยาวของมัน ไม่มี gubernaculum

ตัวเมีย ยาวประมาณ 43 ม.ม. กว้าง 0.38-0.8 ม.ม. มีรังไข่พันรอบลำไส้ โดยมีตำแหน่งของ vulva ซึ่งเปิดห่างจากปลายหางประมาณ 0.6-0.9 ม.ม. ไม่มี vulva flap ไข่มีขนาด 95 - 120 × 56 - 60 ไมครอน



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของ *M. digitatus*

หมายเลข 1 ส่วนหัวแสดงช่องปากที่มีฟัน และเห็นคู่ของ cervical papillae

หมายเลข 2 ส่วนของ bursa ของตัวผู้ spicules มีลักษณะเรียวยาว และ เห็นกลีบต่างๆภายในเบอร์ซ่า

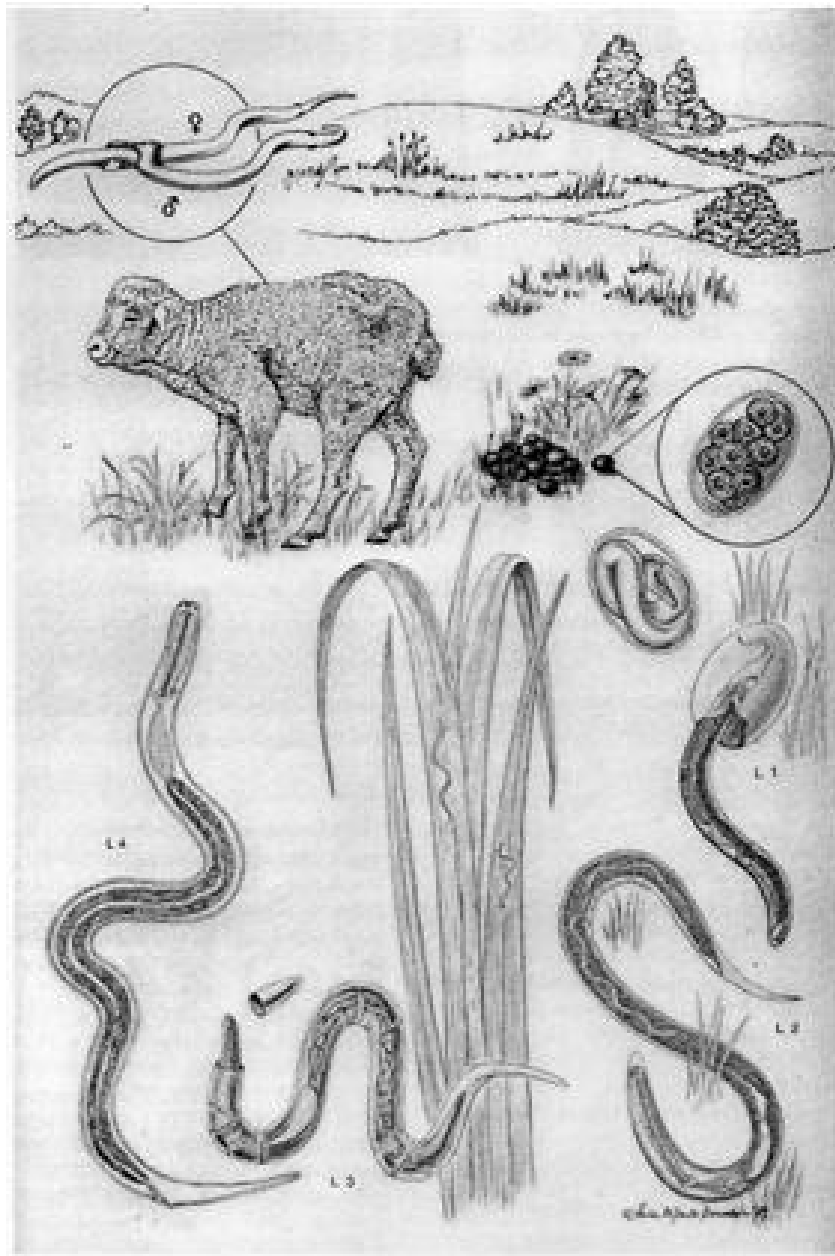
หมายเลข 3 ส่วนท้ายลำตัวของตัวเมีย แสดงช่องเปิดของ vulva และ anus

หมายเลข 4 ไข่พยาธิ *M. digitatus*

(http://www.nehu.ac.th.in/BIC/HelMinth_Parasite_NE/Mecistocirrus%20digitatus.html)

2.1.2 วงจรชีวิต

ไข่ของพยาธิที่ปนออกมากับอุจจาระของโฮสต์ ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ไข่จะฟักเป็นพยาธิตัวอ่อนระยะที่ 1 และลอกคราบอีก 2 ครั้ง เจริญเป็นพยาธิตัวอ่อนระยะติดต่อ (ensheathed infective stage) ใน 7 วัน ตัวอ่อนระยะนี้มีความทนทานต่อความแห้งแล้งและความหนาวเย็น โฮสต์เป็นพยาธิโดยกินพยาธิตัวอ่อนระยะติดต่อเข้าไป หลังจากพยาธิตัวอ่อนเข้าไปถึงกระเพาะ พยาธิจะสลัดเปลือกหุ้มตัวของพยาธิตัวอ่อนระยะที่ 3 ทิ้งไป และไข่เข้าผนังกระเพาะลอกคราบเป็นพยาธิตัวอ่อนระยะที่ 4 และตัวอ่อนระยะที่ 5 ในเวลาประมาณ 21 - 28 วัน และ 28 - 31 วัน ตามลำดับ เริ่มพบไข่พยาธิออกมากับอุจจาระ ประมาณ 59 - 82 วัน หลังจากกินพยาธิระยะติดต่อ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของ *M. digitatus* ไข่ของพยาธิออกมากับอุจจาระของโฮสต์ ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ภายใน 7 วัน ไข่จะฟักเป็นพยาธิตัวอ่อนระยะที่ 1 (Larva 1, L1) และลอกคราบอีก 2 ครั้งเจริญเป็นพยาธิตัวอ่อนระยะติดต่อกัน (L3) โฮสต์ได้รับพยาธิโดยกินพยาธิตัวอ่อนระยะติดต่อกันเข้าไป หลังจากพยาธิตัวอ่อนเข้าไปถึงกระเพาะ พยาธิจะสลัดเปลือกหุ้มตัวของพยาธิตัวอ่อนระยะที่ 3 ทิ้งไปและไชเข้าผนังกระเพาะลอกคราบเป็นพยาธิตัวอ่อนระยะที่ 4 (L4) และตัวอ่อนระยะที่ 5 (L5) ตามลำดับ เริ่มพบไข่พยาธิออกมากับอุจจาระ ประมาณ 59 – 82 วัน หลังจากกินพยาธิระยะติดต่อกัน

2.1.3 ความร้ายแรงและอาการของโรค

M. digitatus เป็นปรสิตหนอนพยาธิตัวกลมใน superfamily Trichostrongyloidea ที่สามารถก่อโรคได้รุนแรง (Gaur and Dutt, 1973; Van Aken *et al.*, 1997) โดยก่อโรคต่อสัตว์ทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง โดยพยาธิตัวอ่อนระยะที่ 4 และพยาธิตัวเต็มวัยจะเกาะผนัง abomasum และใช้ lancet เจาะผนังกระเพาะและ ดูดกินเลือดจากโฮสต์ การเกาะดูดเลือดที่ผนังกระเพาะอาหาร ทำให้เนื้อเยื่อส่วน mucosal surface เกิดปฏิกิริยาอักเสบ ถ้ามีการติดพยาธิจำนวนมาก อาจทำให้ผนังกระเพาะอาหารเกิดแผลหลุม มีเนื้อตายเกิดขึ้น และมีเลือดออก ภายในกระเพาะ (Rieko Mochizuki *et al.*, 2006) ภาวะโลหิตจางที่เกิดขึ้นจำนวนเม็ดเลือดแดงจะลดลง แต่ระดับฮีโมโกลบินสูงขึ้น ส่วน Pack cell จะลดลงด้วยในรายที่ติดโรคเข้าไปเป็นจำนวนมาก สัตว์ป่วยจะมีโลหิตจางอย่างหนัก และอาจถึงตายได้ก่อนที่จะตรวจพบไข่ในอุจจาระ การเสียเลือดอย่างหนักเกิดจากตัวอ่อนระยะที่ 4 นั้นเอง

อาการทางคลินิก ในรายที่เป็นอย่างเฉียบพลันซึ่งส่วนมากจะพบในลูกสัตว์ เช่น ลูกแพะ ลูกแกะ เป็นต้น ในรายนี้เช่นลูกสัตว์จะเกิดการเสียเลือดอย่างรวดเร็ว และจะตายโดยมิได้แสดงอาการของโรคโลหิตจาง ปรากฏให้เห็นเลย ในรายที่เป็นอย่างเรื้อรัง อาการของโลหิตจางเป็นอาการที่สำคัญที่แสดงให้เห็นว่า มีอาการบวมที่ต่าง ๆ เช่นที่ได้กล่าวเรียกว่า โรคคางบวม (bottle jaw) หรือมีการบวมที่บริเวณส่วนล่าง ๆ ของส่วนท้องสัตว์ป่วยแสดงอาการอ่อนเพลียอย่างหนัก เวลาเดินตัวจะเป๋ไปเป๋มา ผิวหนังมีสีซีดและที่มีขนหนา ๆ ขนร่วงเป็นกระจุก ๆ อุจจาระร่วงหรืออุจจาระผูก สัตว์ป่วยแสดงอาการเบื่ออาหาร ก่อนตายเล็กน้อยสัตว์แสดงอาการหมดกำลังใจเนื่องจากอ่อนเพลียอย่างหนัก

การผ่าซาก เชื้อเมื่อผ่าตามที่ตั้งต่าง ๆ และผิวหนังมีสีซีด ร่างกายบางส่วนมีการบวม น้ำ อวัยวะภายในมีสีซีด เช่นกัน มีน้ำในช่องอก เยื่อหุ้มหัวใจ และในช่องท้อง ซากสัตว์จะพองแฉ่งส่วนที่เป็นไขมันจะถูกแทรกด้วยพวกเนื้อเยื่อเจลาติน ดับมีสีน้ำตาลอ่อน ยุ่ย และมีการเปลี่ยนแปลงของไขมัน ที่กระเพาะอาหารส่วนอโอบมาซุมจะมีของเหลวสีแดงปนน้ำตาล ภายในนั้นจะมีตัวพยาธิอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งจะเห็นได้อย่างชัดเจน ตัวพยาธิเหล่านี้จะว่ายไปมาอยู่ในน้ำใส ๆ ที่อยู่ในกระเพาะอาหาร เยื่อเมือกแสดงอาการบวมและปกคลุมด้วยจุดเลือดเล็ก ๆ จุดเลือดเหล่านี้เกิดจากกัดของตัวอ่อนและตัวเต็มวัย บางครั้งจะพบแผลอัลเซอร์ที่มีขอบขาดกระรุ่งกระริ่งและเห็นตัวพยาธิเกาะติดอยู่กับแผลอัลเซอร์นี้ บางครั้งอาจจะพบตัวพยาธิอยู่ที่ลำไส้เล็กได้ซึ่งเกิดจากการที่โฮสต์พยายามขับตัวพยาธิออกจากร่างกาย

การตรวจวินิจฉัย อาการทางคลินิกที่แสดงออกแต่เพียงอย่างเดียวอาจทำให้สงสัยว่าเป็นโรคปรสิตหนอนพยาธิตัวกลมในกระเพาะ แต่การยืนยันที่แน่นอนจะต้องกระทำโดยการผ่าซากสัตว์ที่ได้คัดเลือกแล้ว หรือโดยการนำอุจจาระของสัตว์ป่วยมาเพาะหาตัวอ่อนระยะที่ 3

2.2 พืชสมุนไพรที่ทำการศึกษา

2.2.1 แก้ว *Murraya paniculata* (L.) Jack (ราชบัณฑิตยสถาน, 2003 ; วุฒิ, 1997)

ชื่อพ้อง *Chalcas Paniculata* L.

วงศ์ Rutaceae

ชื่ออื่นๆ แก้วขาว (กลาง), แก้วขี้ไก่ (ยะลา), แก้วพริก, ตะไหลแก้ว (เหนือ), จ้าพริก (ลำปาง)

ชื่อสามัญ Andaman satinwood, Chinese Box wood, Orange jasmine

ไม้ต้นใบประกอบแบบขนนกปลายคี่ เรียงสลับใบย่อย ๕-๘ ใบ สีเขียวเข้มเป็นมัน มีต่อมน้ำมัน ช่อดอกแบบช่อกระจุกสั้น ๆ ออกตามง่ามใบ ดอกสีขาว กลิ่นหอม จากฐานดอกเป็นวงรูปรีหรือรูปไข่ ผลแบบผลเนื้อ ผลแก่สีแดงอมส้ม

แก้วเป็นไม้พุ่ม หรือไม้ต้น สูงถึง ๑๐ ม. เปลือกต้นสีเทา แตกเป็นร่อง (ภาพที่ 3)

ใบประกอบแบบขนนกปลายคี่ (ภาพที่ 4) เรียงสลับ แกนกลางยาว ๓-๑๕ ซม. ก้านใบประกอบยาว ๑-๓ ซม. มีใบย่อย ๕-๘ ใบ เรียงสลับกันจากเล็กไปหาใหญ่ สีเขียวเข้มเป็นมัน ใบย่อยที่ปลายรูปไข่ รูปรี หรือรูปไข่กลับ กว้าง ๑-๓ ซม. ยาว ๒-๓ ซม. ปลายแหลม โคนแหลม หรือสอบ ขอบเป็นคลื่นหรือหยักมนเส้นแขนงใบข้างละ ๔-๘ เส้น ใบย่อยที่เหลือนขนาดเล็กลดหลั่นลงมา โคนใบเบี้ยวเล็กน้อย

ช่อดอกแบบช่อกระจุกสั้น ๆ (ภาพที่ 4) ออกตามง่ามใบ ก้านช่อดอกยาว ๑-๒ ซม. ดอกสีขาว กลิ่นหอม ก้านดอกสั้น กลีบเลี้ยง ๕ กลีบ เล็กมาก กลีบดอก ๕ กลีบ ร่วงง่าย รูปไข่กลับแกมรูปขอบขนาน กว้าง ๔-๖ มม. ยาว ๑-๑.๕ ซม. ฐานดอกรูปวงแหวนเล็ก ๆ เกสรตัวผู้ ๑๐ อัน ก้านชูอับเรณูเรียวและยาวไม่เท่ากัน ก้านชูอับเรณูที่ยาว ๕ อัน เรียงสลับกับก้านชูอับเรณูที่สั้น ๕ อัน อับเรณูเล็ก รังไข่เล็ก อยู่เหนือวงกลีบ มี ๑ ช่อง มีอวุล ๑ เม็ด ก้านยอดเกสรเพศเมียยาวประมาณ ๓ มม. ยอดเกสรเพศเมียเป็นแผ่นกลมเล็ก ขอบหยักเว้าเล็กน้อย

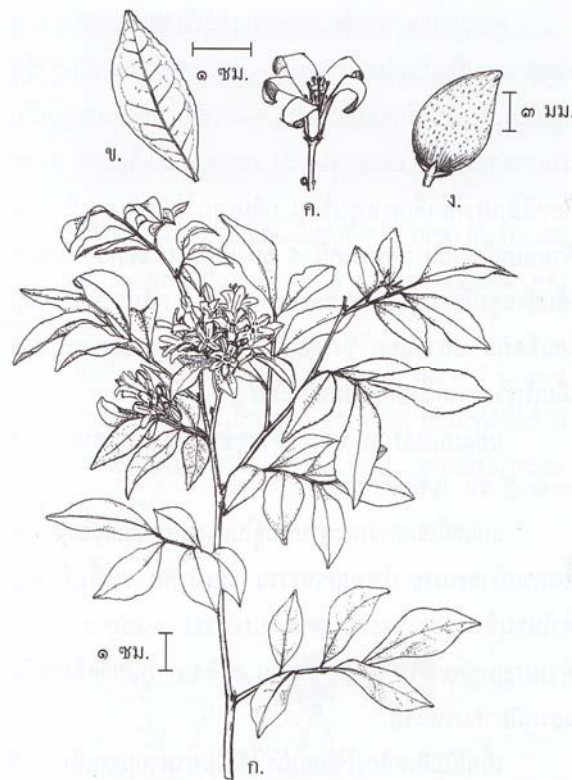
ผลแบบผลมีเนื้อ รูปรีหรือรูปไข่ กว้าง ๕-๘ มม. ยาว ประมาณ ๑ ซม. ผลแก่สีแดงอมส้ม ต่อมน้ำมันเห็นได้ชัด เมล็ดรูปไข่ กว้าง ๔-๖ มม. ยาวประมาณ ๘ มม. มีขนหนา และเหนียว หุ้มรอบเมล็ด

แก้วมีเขตการกระจายพันธุ์ในประเทศไทยทั่วทุกภาค พบในป่าดิบแล้งและตามเขาหินปูนบนพื้นที่ราบระดับต่ำไป จนถึงที่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ ๖๐๐ ม. ในต่างประเทศพบที่จีน ญี่ปุ่น เกาหลี อินเดีย ศรีลังกา พม่า ภูมิภาคอินโดจีน และภูมิภาคมาเลเซีย

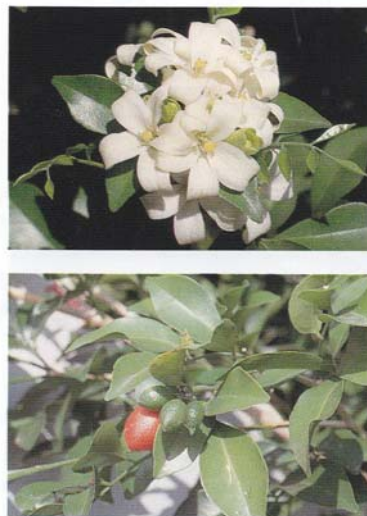
นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ สมัยหนึ่งนิยมใช้ทำไม้เท้าและแกนเพลากวียน ใบใช้เป็นยาฟาดสมาน

สรรพคุณ

- ใบ** รสร้อนเผ็ดขม ขับโลหิตระดูสตรี บำรุงธาตุ แก้จุกเสียด แน่นท้อง ขับผายลม
 ใบสด ตำป่นใส่ทวารหนัก ประมาณ 5 นาที ตัวจะร้อนเหมือนเป็นไข้
- ราก** รสเผ็ดขมสุขุม แก้ปวดสะเอว แก้ผื่นคันที่เกิดจากความชื้น แก้ฝีฝักบัวที่แต่นม ฝี
 ในมดลูก แก้แผลคัน แก้พิษแมลงสัตว์กัดต่อย



ภาพที่ 3 แผนภาพต้นแก้วแสดง ก. กิ่ง ข. ใบ ค. ดอก ง. ผล



ภาพที่ 4 ภาพต้นแก้วแสดง ใบ ดอก และ ผล

2.2.2 จี้เหล็ก *Cassia Siamea* (Lam.) Irwin & Barneby (ราชบัณฑิตยสถาน, 2003 ; วุฒิ, 1997)

ชื่อพ้อง Leguminosae Caesalpinioideae

ชื่ออื่น ๆ จี้เหล็กบ้าน , จี้เหล็กหลวง (เหนือ) , จี้เหล็กใหญ่ (กลาง)

ชื่อสามัญ Kassod tree, Thai copper pod

ใบดั้น ใบประกอบแบบขนนกปลายคู่ เรียงเวียนใบย่อยรูปไข่แกมรูปขอบขนาน ช่อดอกแบบช่อแยกแขนงออกที่ปลายกิ่ง ดอกสีเหลือง ผลแบบผลแห้งแตกสองแนวรูปคลื่นทรงกระบอก มีเมล็ดมาก

จี้เหล็กเป็นไม้ดั้น (ภาพที่ 5) สูงถึง ๒๐ ม. เปลือกสีเทาอม น้ำตาลอ่อน กิ่งอ่อนมีขน ใบประกอบแบบขนนกปลายคู่ เรียงเวียน แกนกลางยาว ๑๒-๓๐ ซม. ก้านใบประกอบยาว ๒-๓ ซม. หูใบเรียวเล็กและสั้น ร่วงง่าย มีใบย่อย ๙-๑๐ คู่ อาจพบ ๔-๑๒ คู่ ใบย่อยรูปไข่แกมรูปขอบขนาน กว้าง ๑-๒ ซม. ยาว ๓-๕ ซม. ปลายมนหรือเว้าตื้นและมีติ่งแหลม โคนมนขอบเรียบ แผ่นใบมีขนประปราย ด้านล่างสีจางกว่าด้านบน ก้านใบย่อยสั้น

ช่อดอกแบบช่อแยกแขนงใหญ่ ออกที่ปลายกิ่ง ยาว ๑๕-๓๐ ซม. ก้านช่อดอกยาว ๕-๗ ซม. ดอกสีเหลือง ก้านดอกยาว ๒-๓ ซม. โคนก้านดอกมีใบประดับรูปไข่กลับปลายแหลม กว้าง ๕-๘ มม. ยาว ๐.๔-๑ ซม. กลีบเลี้ยง ๕ กลีบ มีทั้งรูปไข่จนถึงเกือบกลม แต่ละกลีบมีขนาดไม่เท่ากัน กว้าง ๓-๘ มม. กลีบดอก ๕ กลีบ รูปไข่กลับเกือบกลม แต่ละกลีบขนาดไม่เท่ากัน กว้าง ๐.๖-๑ ซม. ยาว ๐.๘-๑.๒ ซม. ปลายมนโคนแคบคล้ายก้าน เกสรเพศผู้ ๑๐ อัน มี ๓ ขนาด กลุ่มขนาดใหญ่มี ๒ อัน ก้านชูอับเรณูยาว ๐.๗-๑ ซม. อับเรณูยาว ๖-๗ มม. กลุ่มขนาดกลางมี ๕ อัน ก้านชูอับเรณูยาว ๒-๔ มม. อับเรณูยาว ๔-๖ มม. กลุ่มขนาดเล็กมี ๓ อัน ก้านชูอับเรณูยาว ๒-๓ มม. อับเรณูยาว ๒-๓ มม. รังไข่อยู่เหนือวงกลีบ รูปคลื่นทรงกระบอก ปลายเรียวแหลม ยาวประมาณ ๑ ซม. มีขนสั้นนุ่ม มี ๑ ช่อง มีอวุลจำนวนมาก ก้านยอดเกสรเพศเมียสั้น

ผลแบบผลแห้งแตกสองแนวแบน ปลายแหลมกว้าง ๑-๑.๕ ซม. ยาว ๑๕-๒๕ ซม. ฝักแก่โค้งงอเป็นคลื่นมีเมล็ดมาก เมล็ดแบน สีน้ำตาล รูปไข่แกมรูปขอบขนาน กว้าง ๕-๗ มม. ยาว ๐.๖-๑ ซม. ผิวเป็นมัน

จี้เหล็กมีเขตการกระจายพันธุ์ในประเทศไทยทั่วทุกภาค ในต่างประเทศพบตั้งแต่อินเดีย พม่า ภูมิภาคอินโดจีน และภูมิภาคมาเลเซีย

ดอกอ่อนและใบอ่อนปรุงเป็นอาหารและเป็นยาระบาย เนื้อไม้ใช้ทำเครื่องเรือน พม่าใช้ดอกเป็นยาบำรุงและแก้ปวดท้อง

สรรพคุณ

ใบ	รสขม ถ่ายพรรรคึก ถ่ายกระษัย ถ่ายพิษไข้ พิษเสมหะ ขับปัสสาวะ แก้ระดูขาว แก้ไข้ ตำพอกแก้เหน็บชา แก้บวม บำรุงโลหิต ดับพิษโลหิต ดองสุราดื่มก่อนนอน แก้ร้อนไม่หลับ
ดอก	รสขม แก้โรคประสาท แก้ร้อนไม่หลับ แก้หืด แก้รังแค เป็นยาระบาย
ฝัก	รสขม แก้ไขพิษเพื่อปิดตะ ไขเพื่อเสมหะ
เปลือกฝัก	รสขมฝื่อน แก้เส้นเอ็นตึง แก้กระษัย
เปลือกต้น	รสขม แก้กระษัย แก่ริดสีดวงทวาร
กระพี้	รสขมฝื่อน ถอนพิษไข้ แก้ไข้เพื่อดี แก้กระษัยเส้นเอ็น
แก่น	รสขมฝื่อน ถ่ายพิษ ถ่ายเส้น ถ่ายม้าม แก้กระษัย แก้เหน็บชา แก้ไขเพื่อกระษัย ขับโลหิต แก้เตโชธาตุพิการทำให้ตัวเย็น แก้เสบตา แก้กามโรคหนองใน
ราก	รสขม แก้ไข แก้ไขกลับ ไข้ซ้ำ รักษาแผลกามโรค
ทั้งห้า	รสขม ถ่ายพิษกระษัย พิษไข้ พิษเสมหะ ถ่ายเส้น แก้พิษทั้งปวง

สารสำคัญ

ใบและเมล็ด มี toxic alkaloids ซึ่งออกฤทธิ์กดระบบประสาทส่วนกลาง สมอง ไข่สันหลัง
 ใบอ่อนและดอก มีสารพวก chromone ชื่อ barakol
 ใบ, เปลือก, แก่น มี 2,2-dianthraquinone derivative ชื่อ cassiamin นอกจากนี้ยังมี saponin



ภาพที่ 5 ภาพต้นจีเหล็ก ด้านซ้ายแสดงต้นจีเหล็ก ภาพด้านขวาแสดงส่วนของใบ และ ดอก

2.3 การศึกษาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการเป็นยาถ่ายพยาธิต่อพยาธิตัวกลม Superfamily Trichostrongyloid

พืชสมุนไพรเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ที่สำคัญ ต่อการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาหรือเกสรภัณฑ์ใหม่ๆ จากรายงานของ Pieters และ Vlietinck (2005) พบว่าเพียง 5-15% ของพืชในโลกนี้ที่มีการศึกษาเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างเป็นระบบ และกว่า 80% ของพืชในโลกพบว่ามีความโดดเด่นจากเขตร้อนชื้น ซึ่งเขตร้อนชื้นดังกล่าวมีพื้นที่เพียง 7-8% เท่านั้นของพื้นดินในโลก และประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศที่ดั่งบนภูมิภาคนี้อย่างแน่นอน ดังนั้นความหลากหลายทางชีวภาพของพืชในประเทศไทยเป็นเป็นต้นทุนทางธรรมชาติที่เป็นข้อได้เปรียบและมีศักยภาพที่รอการค้นพบ ด้วยภูมิปัญญาของแพทย์แผนไทย ดังที่บันทึกไว้ในสารานุกรมสมุนไพรรวมหลักเภสัชกรรมไทย (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 1997) พบว่ามีพืชที่มีสรรพคุณทางยามากถึง 170 ชนิด จากพืช 61 วงศ์ โดยมีพืชหลากหลายชนิดที่มีข้อบ่งใช้สำหรับการกำจัดพยาธิ แต่อย่างไรก็ตาม ยังขาดการศึกษาอย่างเป็นระบบอย่างจริงจัง เพื่อค้นหาพืชที่มีสารออกฤทธิ์

ในต่างประเทศพืชหลายชนิดได้ถูกนำมาทดสอบเพื่อหาศักยภาพในการฆ่าพยาธิปรสิตหนอนพยาธิตัวกลม superfamily Trichostrongyloid โดยส่วนใหญ่ทดสอบกับพยาธิ *Haemonchus contortus* ซึ่งเป็นพยาธิที่มีวงจรชีวิต การก่อโรคและการก่อความรุนแรงคล้ายกับ *M. digitatus* (วีรพล ทวีนนท์, 2547) สมุนไพรที่ทำการทดสอบเป็นพืชในท้องถิ่นของผู้วิจัย Hounzangbe-Adote (2005) ได้แสดงให้เห็นว่า เมล็ดของพืชในตระกูล Caricaceae ชื่อ *Corica papaya* ซึ่งเป็นพืชในตระกูลมะละกอ มีฤทธิ์ทำให้พยาธิตัวเต็มวัยของ *H. contortus* เริ่มหยุดการเคลื่อนไหวเมื่อสัมผัสกับสารสกัดจากเมล็ดพืชดังกล่าว ที่ความเข้มข้น 2.4 mg/ml ที่ 24 ชั่วโมง และพยาธิทุกตัวหยุดการเคลื่อนไหวที่ 48 ชั่วโมง

Egualle (2007) ได้ศึกษาพืชท้องถิ่นที่มีการบันทึกในตำรายาโบราณของประเทศเอธิโอเปียว่ามีฤทธิ์ในการกำจัดพยาธิ ชื่อ *Hedera helix* โดยผลศึกษาในสภาพทดลองนอกตัวสัตว์ (*in vitro*) พบว่า สารสกัดจากผลของพืชดังกล่าวทำให้มีจำนวนพยาธิหยุดการเคลื่อนไหวถึง 65% จากจำนวนทั้งหมดของพยาธิในกลุ่มทดลอง หลังจากพยาธิสัมผัสสารที่ความเข้มข้น 8 mg/ml นาน 24 ชั่วโมง และสารสกัดตัวเดียวกันเมื่อนำไปทดลองในตัวสัตว์ (*in vivo*) โดยป้อนให้แก่ที่ติดพยาธิ *H. contortus* ในขนาด 2.25 g/kg พบว่ากลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดมีจำนวนพยาธิเพศผู้และเพศเมียที่ตรวจพบในกระเพาะ abomasums มีจำนวนลดลงถึง 60.02% และ 30.8% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบว่าเมล็ดของพืชชื่อ *Coriandrum sativum* ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นในเอธิโอเปียเช่นกัน ที่สกัดด้วย hydro-alcoholic มีผลยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิ *H. contortus* ตัวเต็มวัยได้ โดยสารสกัดจากเมล็ดของพืชดังกล่าวที่ความเข้มข้น 8 mg/ml ทำให้มีจำนวนพยาธิหยุดการเคลื่อนไหวถึง 85% จากจำนวนทั้งหมดของพยาธิในกลุ่มทดลอง ที่ 24 ชั่วโมง โดยเมื่อทดลองป้อนสารสกัดตัวเดียวกันให้แก่ที่ติดพยาธิ *H. contortus*

ในขนาด 0.9 g/kg พบว่าจำนวนของพยาธิ *H. contortus* ที่ตรวจพบในกระเพาะ abomasums มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของพยาธิเพศผู้และเพศเมียเป็น 43.09% และ 12.88 % ตามลำดับ

นอกจากนี้ Marie-Magdeleine (2009) ศึกษาในสภาพทดลองนอกตัวสัตว์ (*in vitro*) พบว่า สารสกัดจากเมล็ดฟักทอง (*Curcubita moschata*) เมื่อสกัดด้วย Dichloromethane และ Methanolic มีผลทำให้ตัวอ่อนของพยาธิ *H. contortus* หยุดการพัฒนา จากพยาธิตัวอ่อนระยะ L1 ไม่พัฒนาต่อไปเป็นตัวอ่อนระยะ L2 และ L3 ถึง 90% และยังมีผลทำให้มีจำนวนพยาธิหยุดการเคลื่อนไหวถึง 59% จากจำนวนทั้งหมดของพยาธิในกลุ่มทดลอง ที่ 24 ชั่วโมง จากผลดังกล่าวบ่งชี้ถึงศักยภาพของเมล็ดฟักทองที่มีฤทธิ์ในการทำลายพยาธิ ซึ่งน่าสนใจที่ผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับสรรพคุณของเมล็ดฟักทองที่บันทึกไว้ในตำรายาแผนไทย (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 1997) ที่บ่งชี้ถึงฤทธิ์ในการขับพยาธิ

สำหรับการทดลองนี้ ได้ทำการทดลองโดยใช้สกัดจากแก้วและขี้เหล็กมาทดสอบ เนื่องจากรายงานของชโลบลและคณะ (2005, 2007) พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของแก้วและขี้เหล็กมีผลต่อการฆ่าพยาธิ *Stellantchasmus falcatus* และ *Haplorchis taichui* ได้ตามลำดับ และมีเปลี่ยนแปลงพื้นผิวลำตัว เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด (Scanning Electron microscope) พบว่าเกิดการบวมของผนังลำตัวเป็นกระเปาะ (Bleb) และแตกออกเป็นบาดแผล และลอกหลุดในที่สุด ในการทดลองนี้จึงนำ สารสกัดจากรากขี้เหล็กและแก้วมาทดสอบกับพยาธิตัวกลม *M. digitatus*. ซึ่งเป็นพยาธิในกระเพาะแทะใน Superfamily Trichostrongyloid ที่พบในจังหวัดเพชรบุรี

3. ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร

3.1.1 สารสกัดจากใบแก้ว

ใบแก้วถูกเก็บในช่วงเดือนมีนาคม ถึงเมษายน พ.ศ. 2552 มาล้างทำความสะอาด แล้วผึ่งให้แห้ง นำใบแก้วหนัก 200 กรัม มาปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียด กับน้ำกลั่นปริมาตร 700 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง นำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนซูเปอร์นาแทนที่ได้มาระเหย้าน้ำออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน ที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส โดยผสมกับนอร์มอลบิวทานอลอัตราส่วน 2 : 1 เพื่อช่วยลดจุดเดือดของน้ำ ได้สารสกัดมีลักษณะเป็นของแข็งผง นำสารสกัดที่แห้งไปชั่งน้ำหนักแล้วนำไปบรรจุในขวดแก้ว เก็บสารสกัดไว้ในตู้ดูดความชื้น เพื่อนำไปใช้ต่อไป

3.1.2 สารสกัดจากรากขี้เหล็ก

เตรียมโดยนำรากขี้เหล็กที่ถูกเก็บในช่วงเดือนมีนาคม ถึงเมษายน พ.ศ. 2552 จำนวน 1.5 กิโลกรัม มาต้มในน้ำปริมาตร 5 ลิตร จนเดือดแล้วนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนซูเปอร์นาแทนที่ได้มาระเหย้าน้ำออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน ที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส โดยผสมกับนอร์มอลบิวทานอลอัตราส่วน 2 : 1 เพื่อช่วยลดจุดเดือดของน้ำ ได้สารสกัดมีลักษณะเป็นของแข็งผง นำสารสกัดที่แห้งไปชั่งน้ำหนักแล้วนำไปบรรจุในขวดแก้ว เก็บสารสกัดไว้ในตู้ดูดความชื้น เพื่อนำไปใช้ต่อไป

3.1.3 สารสกัดจากใบขี้เหล็ก

ใบขี้เหล็กถูกเก็บในช่วงเดือนมีนาคม ถึงเมษายน พ.ศ. 2552 มาล้างทำความสะอาด แล้วผึ่งให้แห้ง นำใบขี้เหล็กหนัก 200 กรัม มาปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียด กับน้ำกลั่นปริมาตร 700 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง นำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนซูเปอร์นาแทนที่ได้มาระเหย้าน้ำออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน ที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส โดยผสมกับนอร์มอลบิวทานอลอัตราส่วน 2 : 1 เพื่อช่วยลดจุดเดือดของน้ำ ได้สารสกัดมีลักษณะเป็นของแข็งผง นำสารสกัดที่แห้งไปชั่งน้ำหนักแล้วนำไปบรรจุในขวดแก้ว เก็บสารสกัดไว้ในตู้ดูดความชื้น เพื่อนำไปใช้ต่อไป

3.2 การทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อพยาธิ *M. digitatus*

พยาธิ *M. digitatus* ที่เก็บจากกระเพาะ abomasum ของวัวที่โรงฆ่าสัตว์ นำมาล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85% แล้วเลือกเฉพาะตัวที่แข็งแรงจำนวน 2040 ตัว มาแบ่งเป็น 5 กลุ่มที่สัมผัสกับสารที่ต่างความเข้มข้นต่างกัน คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่สัมผัสกับยา Levamisole กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบแก้ว กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่ทดสอบกับสารสกัดจาก

รากชี้เหล็ก กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบชี้เหล็ก โดยใช้ความเข้มข้นของยา Levamisole ที่ 0.25, 0.5, 1 และ 2mg/ml และใช้ความเข้มข้นของสารสกัดต่างๆ ที่ 1, 10, 20 และ 40 mg/ml โดยแต่ละกลุ่มการทดลองใช้พยาธิกลุ่มละ 30 ตัว โดยแบ่งเลี้ยงใน petridish ละ 10 ตัว ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ (M199, sigma) 20 ml โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C คาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และให้คะแนนการเคลื่อนไหวของพยาธิที่เวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (Grady and Kotze, 2004)

3.3 การประเมินผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเคลื่อนไหวและการตายของพยาธิ *M. digitatus*

การประเมินการมีชีวิตของพยาธิ พิจารณาโดยดูจากคะแนนการเคลื่อนไหวและการตายของพยาธิการติดสี methylene blue ดังนี้

3 = พยาธิเคลื่อนที่ทั้งตัว

2 = พยาธิเคลื่อนที่บางส่วน of ตัว

1 = พยาธิไม่มีการเคลื่อนไหว (ไม่มีการติดสี methylene blue) (ภาพที่ 6)

0 = พยาธิไม่มีการเคลื่อนไหว (มีการติดสี methylene blue) (ภาพที่ 7)

หมายเหตุ : พยาธิที่ไม่เคลื่อนไหวจะถูกย้อมด้วยสี 1 % methylene blue เป็นเวลา 1 นาที โดย สีสันเกินถูกล้างออกด้วย 0.85 % NaCl

จากค่าคะแนนการเคลื่อนไหวของแต่ละกลุ่มการทดลองจะนำมาคำนวณหาค่าสัดส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว (Relative Mobility, RM value)

โดยค่าสัดส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว หมายถึง อัตราการเคลื่อนไหวของพยาธิ ณ ที่เวลาและความเข้มข้นนั้น โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมของช่วงเวลานั้น

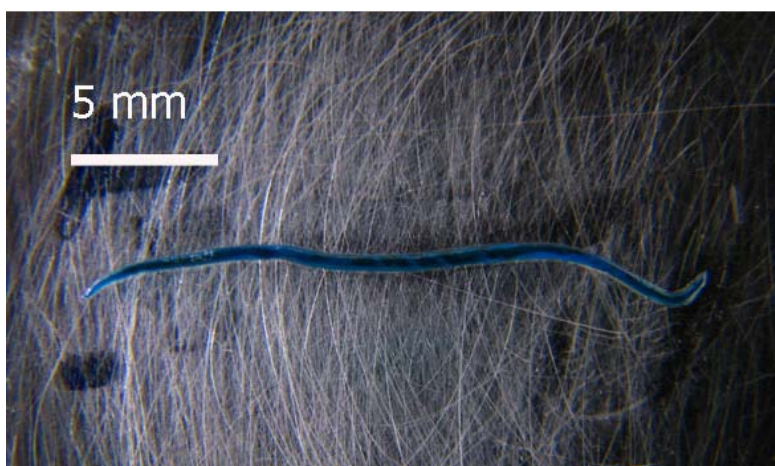
$$\text{RM value} = \frac{\text{MI}_{\text{test}}}{\text{MI}_{\text{control}}} \times 100$$

$$\text{Mobility index (MI)} = \frac{\sum nN_n}{\sum N_n}$$

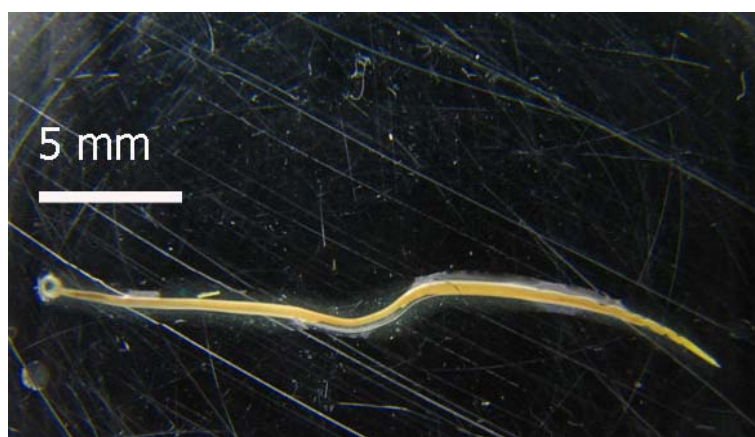
$$n = \text{score}$$

$$N_n = \text{number of flukes with the score of } n$$

ในกลุ่มที่มีการตายของพยาธิเกิดขึ้นที่ 24 ชั่วโมง มีการคำนวณค่าความเข้มข้นที่ทำให้พยาธิเกิดการตายที่ 50% (50% Lethal Dose, LD₅₀)



ภาพที่ 6 พยาธิ *M. digitatus* ที่มีคะแนนเป็น “0” ติดสี methylene blue



ภาพที่ 7 พยาธิ *M. digitatus* ที่มีคะแนนเป็น “1” ไม่ติดสี 1% methylene blue

3.4 การศึกษาสภาพพื้นผิวของพยาธิตัวกลม *M. digitatus* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

การศึกษาในครั้งนี้ได้เลือกศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาพพื้นผิวของพยาธิตัวกลม *M. digitatus* ที่สัมผัสกับสารสกัดชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสูงสุดของแต่ละกลุ่มการทดลอง มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสภาพพื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยนำหนอนพยาธิมาล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 เพื่อล้างเอาสิ่งปนเปื้อนที่เกาะที่ผนังลำตัวพยาธิออก จากนั้นดองด้วยสารละลาย 2.5% glutaraldehyde ร่วมกับ 2% paraformaldehyde แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยสารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 แล้ว post fixed ด้วย 1% osmium tetroxide เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการขจัดน้ำออกจากเซลล์ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 30% , 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, และ 100% ขึ้นตอนละ 30 นาที ตามด้วยอะซิโตน อีก 30 นาที จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Critical Point Dryer โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเป็นตัวดึงน้ำ (transitional fluid) จากนั้นนำพยาธิมาติดบนแท่นโลหะรองรับตัวอย่าง (stub) แล้วนำไปฉาบผิวตัวอย่างด้วยทอง ด้วยเครื่อง Fine coater sputting แล้วตัวอย่างพยาธิไปส่องดูพื้นผิวลำตัวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด Hitachi model S-2500 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสภาพผิวลำตัวพยาธิ โดยใช้กำลังขยายต่าง ๆ

4. ผลการทดลอง

4.1 ผลของสารสกัดน้ำของใบแก้ว ใบขี้เหล็ก และ รากขี้เหล็ก ต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิตัวกลม

M. digitatus

ทุกกลุ่มการทดลองมีการเคลื่อนไหวของพยาธิลดลงสัมพันธ์กับเวลาและปริมาณความเข้มข้นของยาที่เพิ่มขึ้นดังแสดงใน ภาพที่ 8 พบว่าทุกกลุ่มการทดลองมีการเคลื่อนไหวลดลงหลังสัมผัสยา ซึ่งเริ่มเห็นได้ชัดที่เวลา 6 ชั่วโมง และค่อยๆ ลดการเคลื่อนไหวลง จนถึงเวลาที่ 12 ชั่วโมง เริ่มมีพยาธิหยุดการเคลื่อนไหว (มีคะแนนการเคลื่อนไหวเป็น 1) และที่เวลา 24 ชั่วโมงเริ่มมีการตายของพยาธิ (มีคะแนนการเคลื่อนไหวเป็น 0) โดยพบว่ากลุ่มที่สัมผัสกับยา Levamisole มีการตายของพยาธิที่ทุกความเข้มข้น มีค่า LD₅₀ ที่ 0.32 mg/ml สำหรับกลุ่มที่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพร พบว่ามีเพียงสารสกัดใบแก้วที่มีการตายของพยาธิที่ทุกความเข้มข้น มีค่า LD₅₀ ที่ 32.99 mg/ml สำหรับสารสกัดรากและใบขี้เหล็ก ไม่สามารถคำนวณหาค่า LD₅₀ ได้ (ตารางที่ 3)

4.1.1 กลุ่มควบคุม

การเคลื่อนไหวของพยาธิ *M. digitatus* ในกลุ่มควบคุม พยาธิทุกตัวมีคะแนนการเคลื่อนไหวเป็น 3 ที่เวลา 3 ชั่วโมง เวลาผ่านไป 6, 12 และ 24 ชั่วโมง คะแนนการเคลื่อนไหวอยู่ในช่วงคะแนน 2 - 3

4.1.2 กลุ่มที่ทดสอบกับยา Levamisole

การเคลื่อนไหวของพยาธิ *M. digitatus* ในกลุ่มที่สัมผัสกับยา levamisole พบว่าการเคลื่อนไหวของพยาธิลดลงสัมพันธ์กับเวลาและปริมาณความเข้มข้นของยาที่เพิ่มขึ้น คะแนนการเคลื่อนไหวของพยาธิ *M. digitatus* ของกลุ่มที่สัมผัสกับยา levamisole ที่ความเข้มข้น 0.25-2 mg/ml ที่เวลา 3 ชั่วโมง มีคะแนนการเคลื่อนไหวอยู่ในช่วงคะแนน 2-3 โดยมีค่าสัดส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวในช่วง 89-99% เทียบกับกลุ่มควบคุม

ที่เวลา 6 ชั่วโมง การเคลื่อนไหวอยู่ในช่วงคะแนน 2 และ 3 โดยมีค่าสัดส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวลดลงต่ำกว่าที่ 3 ชั่วโมง มีค่าอยู่ในช่วง 67-97% เทียบกับกลุ่มควบคุม

ที่เวลา 12 ชั่วโมง ที่ทุกความเข้มข้น การเคลื่อนไหวของพยาธิลดลง โดยเริ่มมีพยาธิหยุดการเคลื่อนไหวซึ่งมีคะแนนการเคลื่อนไหวเป็น 1 โดยความเข้มข้นของยาสูงสุดที่ 2 mg/ml มีค่าสัดส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวลดลง มีค่าต่ำสุดอยู่ที่ 41% เทียบกับกลุ่มควบคุม

ที่เวลา 24 ชั่วโมง ที่ทุกความเข้มข้น เริ่มมีการตายของพยาธิ ซึ่งมีคะแนนการเคลื่อนไหวเป็น 0 โดยที่ความเข้มข้นของยาสูงสุด 2 mg/ml มีค่าสัดส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวลดลงต่ำสุดอยู่ที่ 8% เทียบกับกลุ่มควบคุม

4.1.3 กลุ่มที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบแก้ว

การเคลื่อนไหวนของพยาธิ *M. digitatus* ในกลุ่มที่สัมผัสกับสารสกัดจากใบแก้ว พบว่าการเคลื่อนไหวนของพยาธิลดลงสัมพันธ์กับเวลาและปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น คะแนนการเคลื่อนไหวนของพยาธิ *M. digitatus* ของกลุ่มที่สัมผัสกับสารสกัดจากใบแก้ว ที่ความเข้มข้น 1-40 mg/ml ที่เวลา 3 ชั่วโมง มีคะแนนการเคลื่อนไหวนอยู่ในช่วงคะแนน 2-3 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนในช่วง 90-93% เทียบกับกลุ่มควบคุม

ที่เวลา 6 ชั่วโมง การเคลื่อนไหวนอยู่ในช่วงคะแนน 2 และ 3 โดยมีค่าสัดส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนลดลงต่ำกว่าที่ 3 ชั่วโมง มีค่าอยู่ในช่วง 76-87% เทียบกับกลุ่มควบคุม

ที่เวลา 12 ชั่วโมง ที่ทุกความเข้มข้น การเคลื่อนไหวนของพยาธิลดลง พยาธิหยุดการเคลื่อนไหวนโดยความเข้มข้นของสารสกัดสูงสุดที่ 40 mg/ml มีค่าสัดส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนต่ำสุดอยู่ที่ 42% เทียบกับกลุ่มควบคุม

ที่เวลา 24 ชั่วโมง ที่ทุกความเข้มข้น เริ่มมีการตายของพยาธิ โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบแก้วสูงสุดที่ 40 mg/ml มีค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนลดลงต่ำสุดอยู่ที่ 14% เทียบกับกลุ่มควบคุม

4.1.4 กลุ่มที่ทดสอบกับสารสกัดจากรากขี้เหล็ก

การเคลื่อนไหวนของพยาธิ *M. digitatus* ในกลุ่มที่สัมผัสกับสารสกัดจากรากขี้เหล็ก พบว่าการเคลื่อนไหวนของพยาธิลดลงสัมพันธ์กับเวลาและปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น คะแนนการเคลื่อนไหวนของพยาธิ *M. digitatus* ของกลุ่มที่สัมผัสกับสารสกัดจากรากขี้เหล็กที่ความเข้มข้น 1-40 mg/ml ที่เวลา 3 ชั่วโมง มีคะแนนการเคลื่อนไหวนอยู่ในช่วงคะแนน 2-3 โดยมีค่าสัดส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนในช่วง 93-98% เทียบกับกลุ่มควบคุม

ที่เวลา 6 ชั่วโมง การเคลื่อนไหวนอยู่ในช่วงคะแนน 2 - 3 โดยมีค่าสัดส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนลดลงต่ำกว่าที่ 3 ชั่วโมง มีค่าอยู่ในช่วง 85-92% เทียบกับกลุ่มควบคุม

ที่เวลา 12 ชั่วโมง ที่ทุกความเข้มข้น การเคลื่อนไหวนของพยาธิลดลง โดยเริ่มมีพยาธิหยุดการเคลื่อนไหวน โดยความเข้มข้นของสารสกัดสูงสุดที่ 40 mg/ml มีค่าสัดส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนต่ำสุดอยู่ที่ 66% เทียบกับกลุ่มควบคุม

ที่เวลา 24 ชั่วโมง ที่ทุกความเข้มข้น เริ่มมีการตายของพยาธิ โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากรากขี้เหล็กสูงสุดที่ 40 mg/ml มีค่าสัดส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนลดลงต่ำสุดอยู่ที่ 44% เทียบกับกลุ่มควบคุม

4.1.5 กลุ่มที่ทดสอบกับสารสกัดจากใบขี้เหล็ก

การเคลื่อนไหวนของพยาธิ *M. digitatus* ในกลุ่มที่สัมผัสกับสารสกัดจากใบขี้เหล็ก พบว่าการเคลื่อนไหวนของพยาธิลดลงสัมพันธ์กับเวลาและปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น

คะแนนการเคลื่อนไหวของพยาธิ *M. digitatus* ของกลุ่มที่สัมผัสกับสารสกัดจากใบขี้เหล็ก ที่ความเข้มข้น 1-40 mg/ml ที่เวลา 3 ชั่วโมง มีคะแนนการเคลื่อนไหวอยู่ในช่วงคะแนน 2-3 โดยมีค่าสัดส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวในช่วง 92-97% เทียบกับกลุ่มควบคุม

ที่เวลา 6 ชั่วโมง การเคลื่อนไหวอยู่ในช่วงคะแนน 2 - 3 โดยมีค่าสัดส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวลดลงต่ำกว่าที่ 3 ชั่วโมง มีค่าอยู่ในช่วง 84-94% เทียบกับกลุ่มควบคุม

ที่เวลา 12 ชั่วโมง ที่ทุกความเข้มข้น การเคลื่อนไหวของพยาธิลดลง โดยเริ่มมีพยาธิหยุดการเคลื่อนไหว ความเข้มข้นของสารสกัดสูงสุดที่ 40 mg/ml มีค่าสัดส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวลดลง มีค่าต่ำสุดอยู่ที่ 80% เทียบกับกลุ่มควบคุม

ที่เวลา 24 ชั่วโมง ที่ทุกความเข้มข้น เริ่มมีการตายของพยาธิ โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบขี้เหล็ก สูงสุดที่ 40 mg/ml มีค่าสัดส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวลดลงต่ำสุดอยู่ที่ 49% เทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 1 แสดงคะแนนการเคลื่อนไหวของพยาธิ *M. cistocirrus*

กลุ่มทดลอง / คะแนนการเคลื่อนไหว		ระยะเวลา (ชั่วโมง)															
		3				6				12				24			
		3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
กลุ่มควบคุม		30	0	0	0	29	1	0	0	19	11	0	0	17	13	0	0
levamisole (mg/ml)	0.25	29	1	0	0	27	3	0	0	17	11	2	0	0	11	6	13
	0.5	29	1	0	0	26	4	0	0	13	6	11	0	0	3	11	16
	1	24	6	0	0	9	21	0	0	5	5	20	0	0	0	8	22
	2	20	10	0	0	0	0	0	0	-	2	28	0	0	0	6	24
แก้ว (mg/ml)	1	24	6	0	0	17	13	0	0	13	9	8	0	0	8	15	7
	10	23	7	0	0	16	14	0	0	11	5	14	0	0	0	22	8
	20	22	8	0	0	14	16	0	0	2	12	16	0	0	0	21	9
	40	21	9	0	0	8	22	0	0	0	3	27	0	0	0	0	19
รากชี้เหล็ก (mg/ml)	1	28	2	0	0	22	8	0	0	12	9	9	0	0	10	20	0
	10	26	4	0	0	21	9	0	0	11	9	10	0	0	10	18	2
	20	25	5	0	0	18	12	0	0	9	11	10	0	0	9	19	2
	40	24	6	0	0	16	14	0	0	6	10	14	0	0	7	20	3
ใบชี้เหล็ก (mg/ml)	1	27	3	0	0	20	10	0	0	18	9	3	0	0	15	15	0
	10	25	5	0	0	19	11	0	0	14	12	4	0	0	12	17	1
	20	24	6	0	0	17	13	0	0	14	11	5	0	0	11	18	1
	40	23	7	0	0	15	15	0	0	10	12	10	0	0	10	18	2

3 = พยาธิเคลื่อนที่ทั้งตัว

2 = พยาธิเคลื่อนที่บางส่วนของตัว

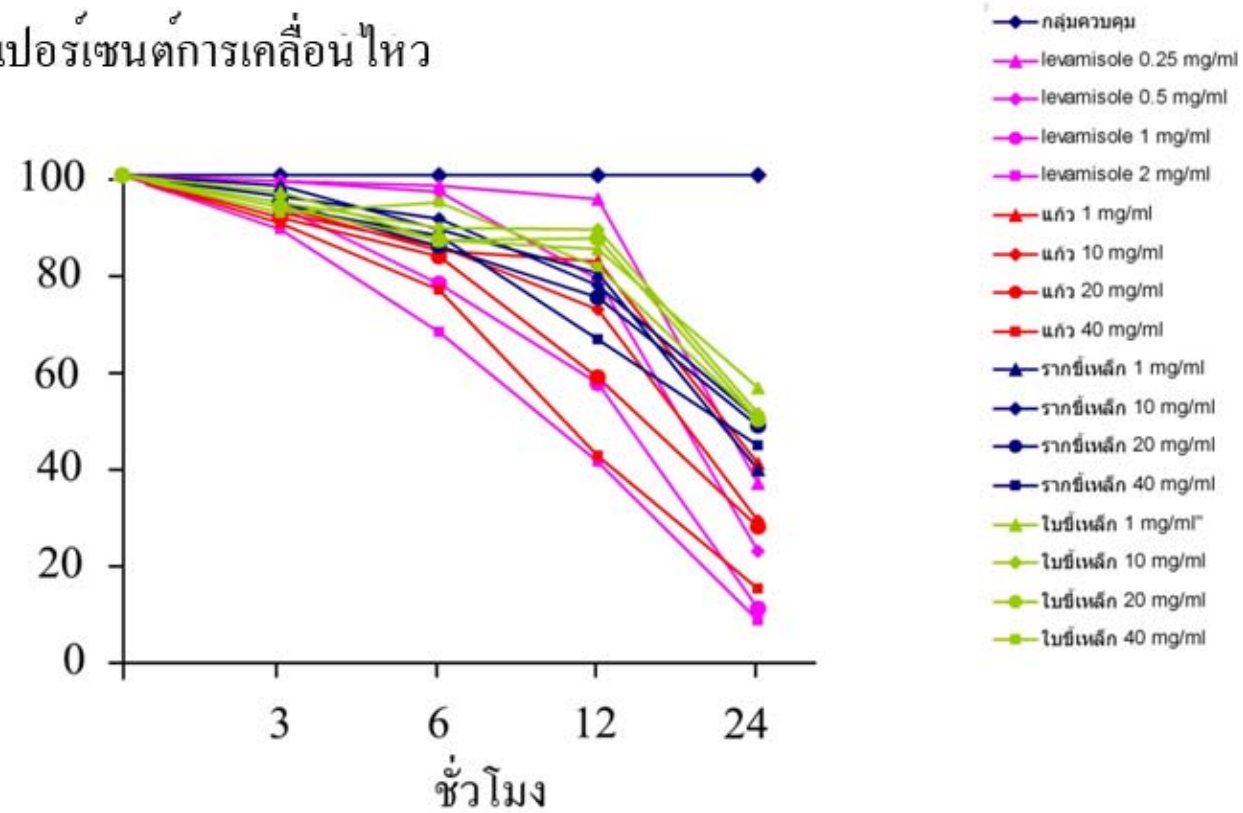
1 = พยาธิไม่มีการเคลื่อนไหว (ไม่มีการติดสี methylene blue)

0 = พยาธิไม่มีการเคลื่อนไหว (มีการติดสี methylene blue)

ตารางที่ 2 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของพยาธิ *M. cistocirrus*

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	กลุ่มควบคุม	levamisole (mg/ml)				แก้ว (mg/ml)				รากชี้เหล็ก (mg/ml)				ใบชี้เหล็ก (mg/ml)			
		0.25	0.5	1	2	1	10	20	40	1	10	20	40	1	10	20	40
3	100	99	99	93	89	93	92	91	90	98	96	94	93	97	94	93	92
6	100	98	97	78	67	87	85	83	76	92	91	88	85	94	92	90	84
12	100	95	78	57	41	82	72	58	42	80	77	75	66	92	89	86	80
24	100	36	22	10	8	40	29	27	14	52	49	48	44	58	53	52	49

ค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว



ภาพที่ 8 กราฟแสดงสัดส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 3 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การตายที่ 50% ของพยาธิ *M. cistocirrus* (LD50)

IC50 (mg/ml)	ระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง
Levamisole	0.32
แก้ว	32.99
รากชี้เหล็ก*	-
ใบชี้เหล็ก*	-

* รากชี้เหล็กและใบชี้เหล็กไม่สามารถหาค่า IC50 ได้

4.2 ผลการศึกษาสภาพพื้นผิวของพยาธิตัวกลม *M. digitatus* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

การศึกษาในครั้งนี้ได้เลือกศึกษา การเปลี่ยนแปลงสภาพพื้นผิวของพยาธิตัวกลม *M. digitatus* ที่สัมผัสกับสารสกัดชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสูงสุดของแต่ละกลุ่มการทดลอง มาศึกษาผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพพื้นผิว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยการนำตัวอย่างพยาธิ ในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่สัมผัสกับยา Levamisole ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml กลุ่มที่สัมผัสกับสารสกัดสมุนไพรทั้งสามชนิดคือ แก้ว รากขี้เหล็ก ใบขี้เหล็ก ที่ความเข้มข้นเดียวกันคือที่ 40 mg/ml โดยนำตัวอย่างที่ทดลองเป็นเวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง โดยมีผลการศึกษาดังนี้

ที่เวลา 3 ชั่วโมง พื้นผิวของพยาธิในทุกกลุ่มการทดลอง ทั้งที่สัมผัสกับ Levamisole และ สารสกัด แก้ว รากขี้เหล็ก ใบขี้เหล็ก พบว่าพื้นผิวของพยาธิยังคงเป็นปกติ ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 9)

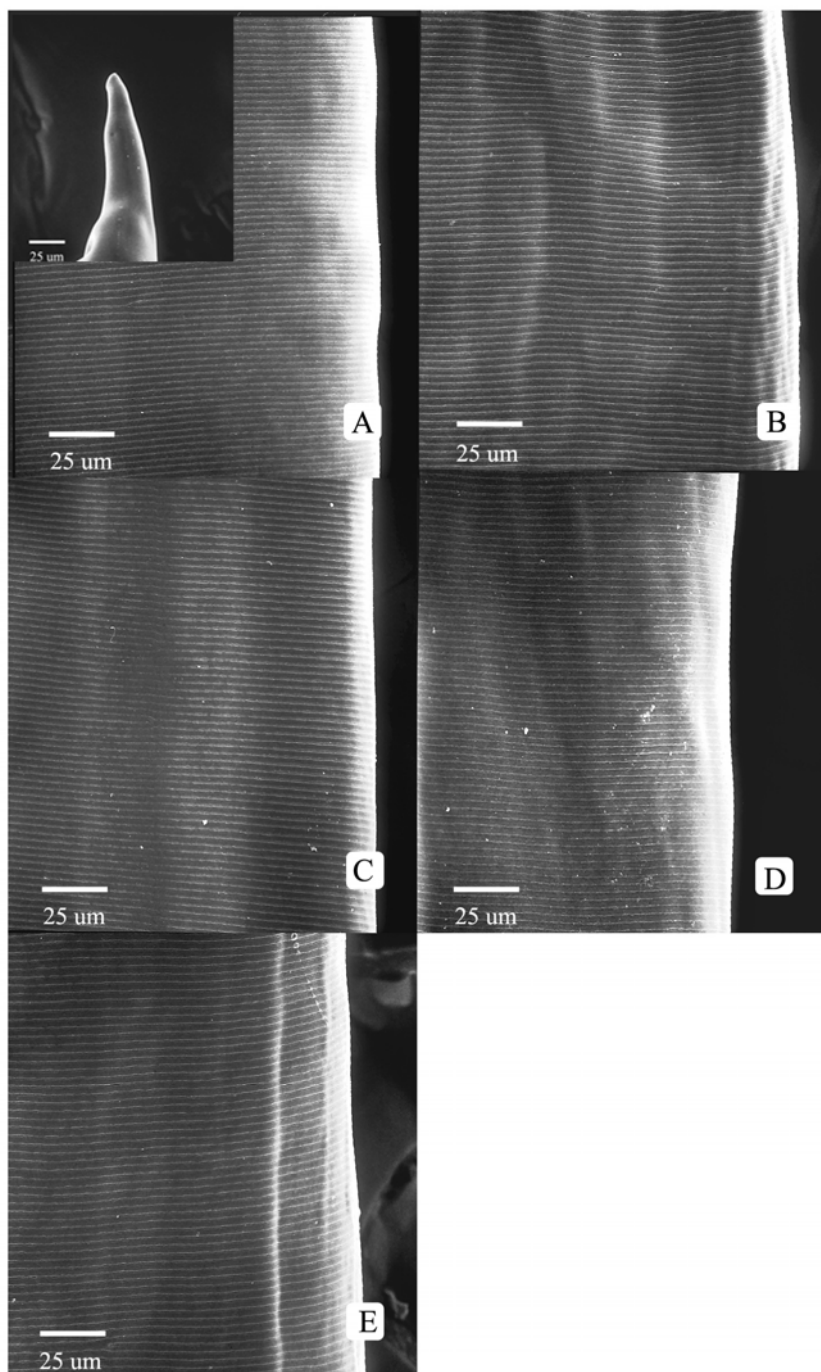
ที่เวลา 6 ชั่วโมง พบว่าพื้นผิวของพยาธิในทุกกลุ่มการทดลองยังคงไม่มีการเปลี่ยนแปลง กลุ่มที่สัมผัสกับ Levamisole และ สารสกัด แก้ว รากขี้เหล็ก ใบขี้เหล็ก พบว่า พื้นผิวของพยาธิยังคงเป็นปกติ ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 10)

ที่เวลา 12 ชั่วโมง พบว่าพื้นผิวของพยาธิในกลุ่มการทดลองที่สัมผัสกับสารสกัด แก้ว และ รากขี้เหล็ก มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นที่ผิวพยาธิ โดยที่ลำตัวพยาธิมีลักษณะของพื้นผิวที่เกิดการบวมขึ้น (ภาพที่ 11 C และ D) ขณะที่กลุ่มที่สัมผัสกับ Levamisole และ ใบขี้เหล็ก พบว่าพื้นผิวของพยาธิ ยังคงเป็นปกติ ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม

ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าพื้นผิวของพยาธิในกลุ่มการทดลองที่สัมผัสกับสารสกัด แก้ว มีการเปลี่ยนแปลง มีลักษณะพื้นผิวที่บวมขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 12 C) และมีพื้นผิวบางส่วนมีการหลุดลอก (ภาพที่ 12 D) ส่วนกลุ่มการทดลองที่สัมผัสกับรากขี้เหล็กพบว่ามีลักษณะพื้นผิวที่บวมขึ้นเช่นกัน (ภาพที่ 12 E) ขณะที่กลุ่มที่สัมผัสกับ Levamisole และ ใบขี้เหล็ก พบว่าพื้นผิวของพยาธิยังคงเป็นปกติ ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม

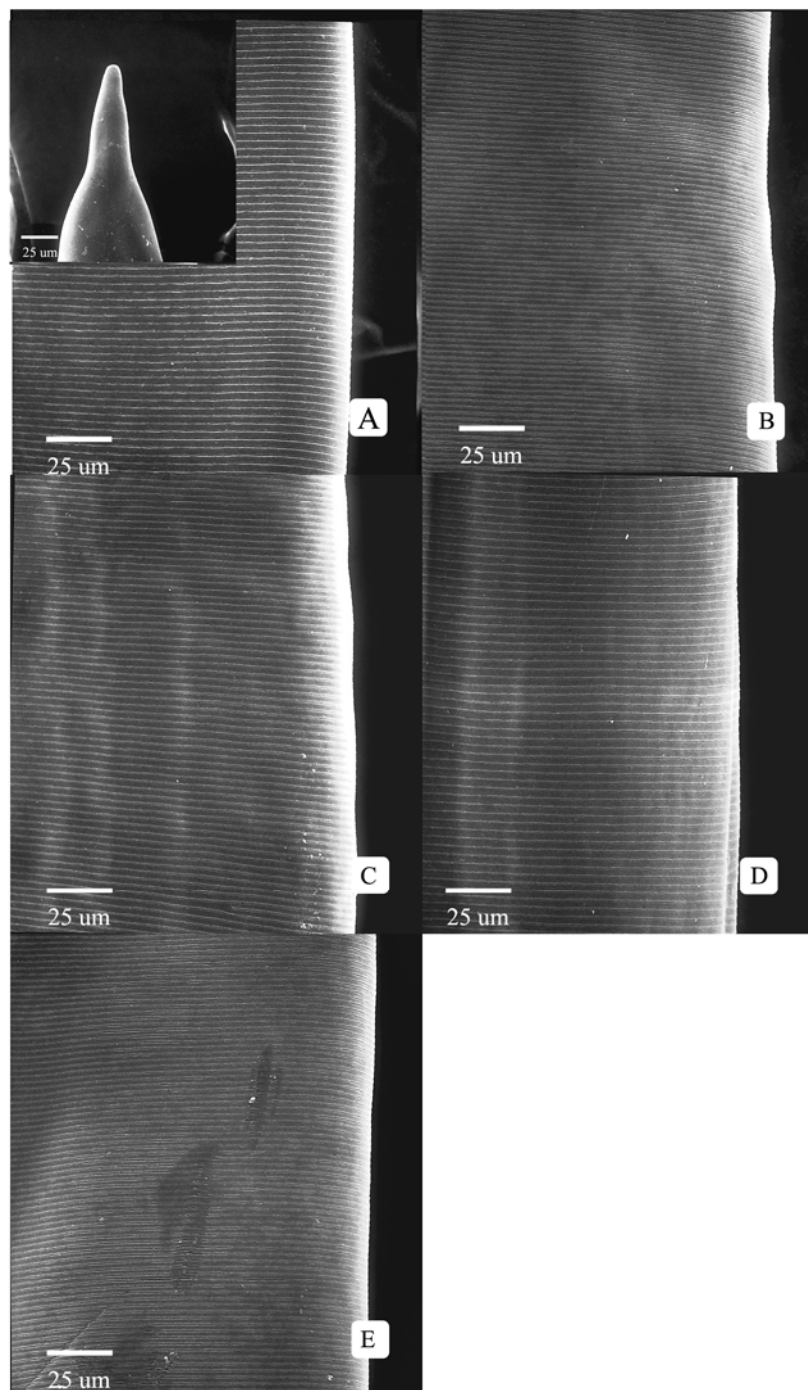
ภาพที่ 9 ภาพถ่ายพยาธิ *M. cistocirrus* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่สัมผัสสารสกัดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่เวลา 3 ชั่วโมง

- A. ภาพส่วนหัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มควบคุม (ภาพหัวมุม) มีลักษณะพยาธิภายนอกเป็นปกติ
- B. ภาพส่วนลำตัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มที่สัมผัสยา Levamisole ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml ลักษณะพยาธิภายนอกเป็นปกติ
- C. ภาพส่วนลำตัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มที่สัมผัสสารสกัดแก้ว ที่ความเข้มข้น 40 mg/ml ลักษณะพยาธิภายนอกเป็นปกติ
- D. ภาพส่วนลำตัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มที่สัมผัสสารสกัดรากขี้เหล็ก ที่ความเข้มข้น 40 mg/ml ลักษณะพยาธิภายนอกเป็นปกติ
- E. ภาพส่วนลำตัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มที่สัมผัสสารสกัดใบขี้เหล็ก ที่ความเข้มข้น 40 mg/ml ลักษณะพยาธิภายนอกเป็นปกติ



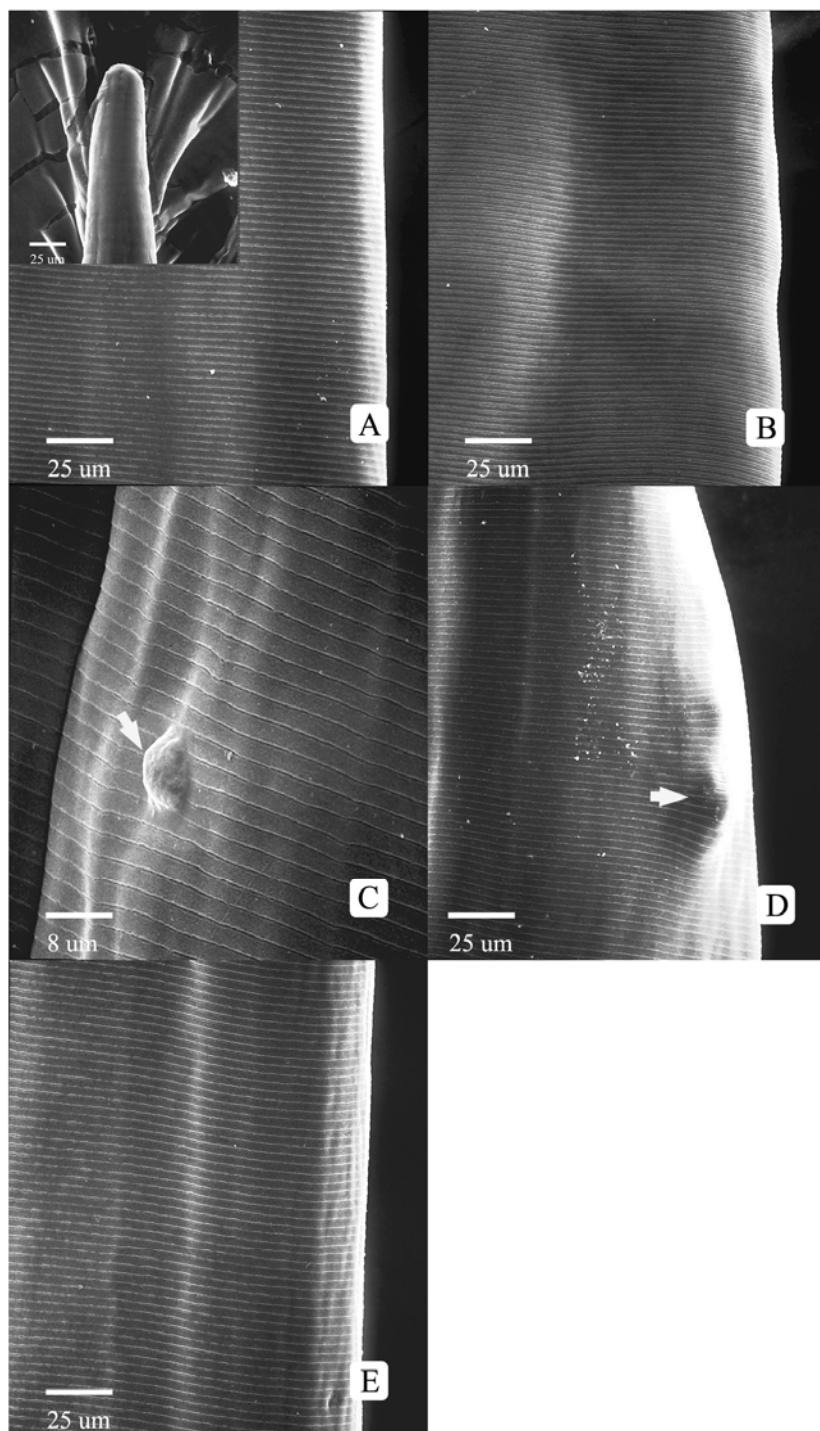
ภาพที่ 10 ภาพถ่ายพยาธิ *M. cistocirrus* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่สัมผัสสารสกัดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่เวลา 6 ชั่วโมง

- A. ภาพส่วนหัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มควบคุม (ภาพหัวมุม) มีลักษณะพยาธิภายนอกเป็นปกติ
- B. ภาพส่วนลำตัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มที่สัมผัสยา Levamisole ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml ลักษณะพยาธิภายนอกเป็นปกติ
- C. ภาพส่วนลำตัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มที่สัมผัสสารสกัดแก้ว ที่ความเข้มข้น 40 mg/ml ลักษณะพยาธิภายนอกเป็นปกติ
- D. ภาพส่วนลำตัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มที่สัมผัสสารสกัดรากขี้เหล็ก ที่ความเข้มข้น 40 mg/ml ลักษณะพยาธิภายนอกเป็นปกติ
- E. ภาพส่วนลำตัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มที่สัมผัสสารสกัดใบขี้เหล็ก ที่ความเข้มข้น 40 mg/ml ลักษณะพยาธิภายนอกเป็นปกติ



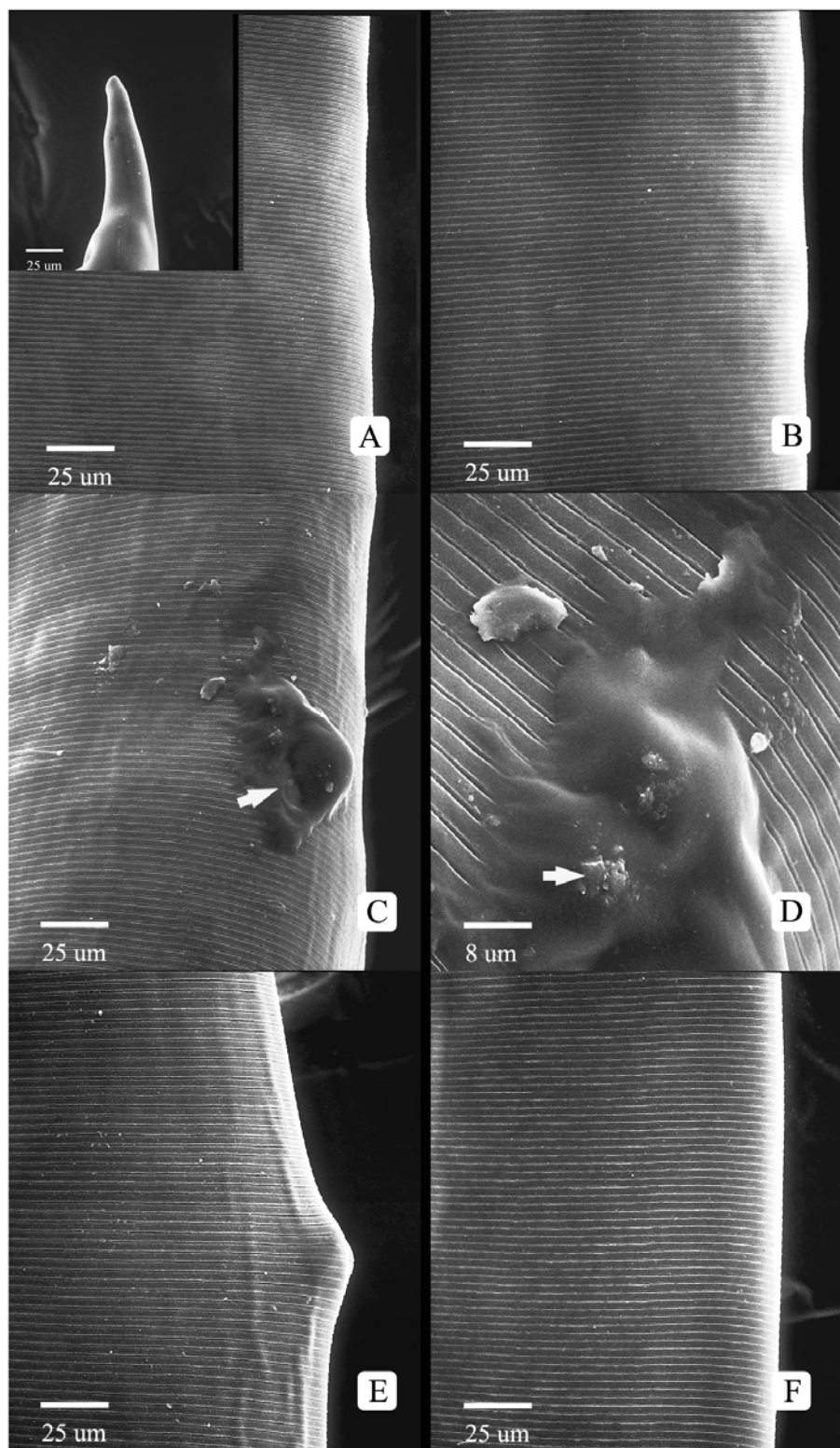
ภาพที่ 11 ภาพถ่ายพยาธิ *M. cistocirrus* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่สัมผัสสารสกัดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง

- A. ภาพส่วนหัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มควบคุม (ภาพหัวมุม) มีลักษณะพยาธิภายนอกเป็นปกติ
- B. ภาพส่วนลำตัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มที่สัมผัสยา Levamisole ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml ลักษณะพยาธิภายนอกเป็นปกติ
- C. ภาพส่วนลำตัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มที่สัมผัสสารสกัดแก้ว ที่ความเข้มข้น 40 mg/ml ลักษณะพยาธิภายนอกมีส่วนที่บวม ลักษณะเป็นตุ่มปรากฏ (ลูกศร)
- D. ภาพส่วนลำตัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มที่สัมผัสสารสกัดรากขี้เหล็ก ที่ความเข้มข้น 40 mg/ml ลักษณะพยาธิภายนอกที่บวม ลักษณะเป็นตุ่มปรากฏ (ลูกศร)
- E. ภาพส่วนลำตัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มที่สัมผัสสารสกัดใบขี้เหล็ก ที่ความเข้มข้น 40 mg/ml ลักษณะพยาธิภายนอกเป็นปกติ



ภาพที่ 12 ภาพถ่ายฝัวยพยาธิ *M. cistocirrus* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่สัมผัสสารสกัดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง

- A. ภาพส่วนหัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มควบคุม (ภาพหัวมุม) มีลักษณะฝัวยพยาธิภายนอกเป็นปกติ
- B. ภาพส่วนลำตัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มที่สัมผัสยา Levamisole ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml ลักษณะฝัวยพยาธิภายนอกเป็นปกติ
- C. ภาพส่วนลำตัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มที่สัมผัสสารสกัดแก้ว ที่ความเข้มข้น 40 mg/ml ลักษณะฝัวยพยาธิภายนอกที่บวมจนปรากฏเห็นเด่นชัด (ลูกศร)
- D. ภาพกำลังขยายสูงส่วนลำตัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มที่สัมผัสสารสกัดแก้ว ที่ความเข้มข้น 40 mg/ml ลักษณะฝัวยพยาธิภายนอกที่บวม มีลักษณะเกิดการลอกหลุดของฝัวยภายนอก (ลูกศร)
- E. ภาพส่วนลำตัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มที่สัมผัสสารสกัดรากขี้เหล็ก ที่ความเข้มข้น 40 mg/ml ลักษณะฝัวยพยาธิภายนอกมีลักษณะบวมขึ้น
- F. ภาพส่วนลำตัวของพยาธิ *M. cistocirrus* จากกลุ่มที่สัมผัสสารสกัดใบขี้เหล็ก ที่ความเข้มข้น 40 mg/ml ลักษณะฝัวยพยาธิภายนอกเป็นปกติ



5. อภิปรายและวิจารณ์ผล

การศึกษาผลของสารสกัดจากใบแก้ว รากของต้นจี่เหล็ก และใบของต้นจี่เหล็กต่อการตายของพยาธิตัวกลมในกระเพาะแท้งของวัว *M. digitatus* ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษานอกตัวสัตว์ (in vitro) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดทั้งสามชนิด กับยาถ่ายพยาธิตัวกลม Levamisole โดยพบว่า สารสกัดใบแก้วเป็นสารสกัดชนิดเดียวที่ทำให้เกิดการตายของพยาธิมากกว่า 50 % ที่ 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามยา Levamisole มีฤทธิ์ดีกว่า โดยมีค่า LD₅₀ ที่ 0.32 mg/ml ขณะที่สารสกัดใบแก้ว มีค่า LD₅₀ ที่ 32.99 mg/ml แตกต่างจากยา levamisole ประมาณ 100 เท่า อย่างไรก็ตาม จากผลดังกล่าวบ่งบอกศักยภาพของสารสกัดหยาบจากใบแก้ว ซึ่งมีผลทำให้พยาธิ *M. digitatus* ลดการเคลื่อนไหวและเกิดการตายของพยาธิ และจากผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นที่พื้นผิวลำตัวพยาธิ เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron microscope) พบว่าสารสกัดใบแก้วส่งผลให้เริ่มเกิดการบวมของผนังลำตัวที่ 12 ชั่วโมง และการบวมมีมากขึ้นที่ 24 ชั่วโมง โดยมีการหลุดลอกของผนังบางส่วนร่วมด้วย ซึ่งอธิบายได้ว่าสารสกัดหยาบจากใบแก้วมีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อการทำลายผิวพยาธิ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในลักษณะดังกล่าวได้พบในพยาธิใบไม้ *H.taichui* ที่สัมผัสกับสารสกัดด้วยน้ำของแก้วเช่นกัน (ชโลบล 2005) สำหรับกลุ่มที่สัมผัสยา Levamisole แม้มีการตายของพยาธิเกิดขึ้น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ผิวของพยาธิ ทั้งนี้เนื่องจากยามีกลไกการออกฤทธิ์โดยไปกระตุ้น nicotinic receptor ทำให้พยาธิเป็นอัมพาต และถูกขับออกจากทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยายังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ของคาร์โบไฮเดรตของพยาธิ ทำให้พยาธิขาดพลังงานและตายในที่สุด (ปิยะรัตน์ 2552) ซึ่งยาที่ใช้ในการกำจัดพยาธิตัวกลมที่มีใช้ในปัจจุบัน นอกจาก Levamisole แล้วได้แก่ ยาในกลุ่ม Benzimidazole เช่น Thiabendazole Mebendazole และ Albendazole โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ทำให้ยับยั้งการ polymerization ของ tubulin และ ยับยั้งการทำงานของ microtubule ในการนำ glucose เข้าสู่เซลล์ ซึ่งทำให้พยาธิขาดพลังงานและตายเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ Ivermectin ยังเป็นยากำจัดพยาธิตัวกลมอีกตัวหนึ่งโดยมี ฤทธิ์ต่อ glutamate-gated chloride channel ในเซลล์กล้ามเนื้อ ซึ่งมีผลทำให้พยาธิเป็นอัมพาต (Leo and Peter, 1996) จากข้อมูลดังกล่าว ยาที่ใช้ในการกำจัดพยาธิตัวกลมที่ใช้ในปัจจุบันยังไม่มียาตัวใดที่มีฤทธิ์ต่อผิวพยาธิโดยตรง

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าสารสกัดหยาบจากใบแก้วมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงต่อโครงสร้างของผิวพยาธิ ซึ่งผิวของพยาธิตัวกลมเรียกว่า cuticle มีบทบาทเป็นโครงสร้างภายนอกที่ปกป้องตัวพยาธิจากสิ่งแวดล้อมภายนอก รักษาภาวะธำรงดุล (homeostasis) และยังทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนไหวของพยาธิด้วย นอกจากนี้ได้มีรายงานว่า cuticle ของหนอนพยาธิตัวกลมบางชนิดมีบทบาทเกี่ยวกับการดูดซึมสารอาหารจากโฮสต์ (host) เข้าสู่ตัวพยาธิด้วย (Rutherford and Webster, 1974) ดังนั้นผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผิวพยาธิ ที่ cuticle นี้เป็นการอธิบาย

กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบแก้ว ซึ่งสอดคล้องกับการที่พยาธิลดการเคลื่อนไหวและพยาธิมีการตายเกิดขึ้น ซึ่งแปรตามขนาดความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และระยะเวลาที่สัมผัสพยานานขึ้น

สำหรับสารสกัดจากรากของต้นจี่เหล็ก และใบของต้นจี่เหล็กพบว่าสารสกัดทั้งสองมีผลต่อการตาย และลดการเคลื่อนไหวของพยาธิตัวกลมด้วย ที่เวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดทั้งสองทำให้เกิดการตายของพธิน้อยกว่า 50 % โดยมีการตายของพธินเพียง 10 และ 6.66% ตามลำดับ และมีค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวที่ 44 และ 49% ตามลำดับ จากผลดังกล่าวแสดงว่าส่วนประกอบของรากและใบของต้นจี่เหล็ก มีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ที่มีผลลดการเคลื่อนไหวของพยาธิ โดยฤทธิ์ดังกล่าวไม่ทำให้ถึงกับเกิดการตายของพยาธิชัดเจนเหมือนที่พบในสารสกัดจากใบแก้ว แต่อย่างไรก็ตาม มีการเปลี่ยนแปลงที่เกิดที่พื้นผิวลำตัวพยาธิที่สัมผัสกับสารสกัดจากรากของต้นจี่เหล็ก โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะดังกล่าวในพยาธิที่สัมผัสสารสกัดจากใบของต้นจี่เหล็ก แสดงว่าองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์จากรากของต้นจี่เหล็ก มีองค์ประกอบที่ต่างกับที่มีในใบของต้นจี่เหล็ก

เมื่อพิจารณาลำดับศักยภาพของการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเคลื่อนไหวและการทำให้พยาธิเกิดการตายโดยสารสกัดทั้งสามชนิดข้างต้น โดยเรียงจากศักยภาพของการออกฤทธิ์สูงไปต่ำเป็นดังนี้คือ สารสกัดจากใบแก้ว สารสกัดจากรากของต้นจี่เหล็ก และสารสกัดจากใบของต้นจี่เหล็ก ตามลำดับโดยสารสกัดจากใบแก้วเป็นสารสกัดที่มีศักยภาพที่สุดที่จะนำไปพัฒนาเพื่อหาสารออกฤทธิ์ จากผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นแนวทางเบื้องต้นโดยได้นำสารสกัดหยาบมาทำการแยกหาสารประกอบย่อย แล้วนำสารประกอบต่าง ๆ มาทดสอบเพื่อหาองค์ประกอบของสารที่ออกฤทธิ์ต่อไป

6. สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าสารสกัดจากใบแก้วเป็นสารสกัดที่มีศักยภาพที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากรากและใบขี้เหล็ก โดยสารสกัดจากใบแก้วมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผิวของพยาธิ ดังนั้นสารสกัดจากใบแก้วเป็นสารสกัดที่ควรมีการศึกษาต่อไป เพื่อนำไปแยกองค์ประกอบเพื่อหาสารออกฤทธิ์ การที่สารสกัดจากใบแก้วมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อโครงสร้างของผิวพยาธิ (cuticle) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สำคัญต่อการมีชีวิตอยู่รอดของพยาธิ เป็นกลไกที่แตกต่างจากการออกฤทธิ์ของยา (drug target) ที่มีอยู่ในปัจจุบัน ที่ตัวยามีผลต่อ metabolism ภายในตัวพยาธิ ถ้าเราสามารถได้สารออกฤทธิ์จากใบแก้ว ที่เป็นสารบริสุทธิ์ เราก็สามารถนำมาใช้เป็นยากำจัดพยาธิหรือ ใช้ร่วมกับยาตัวอื่นที่มีเป้าหมายของการออกฤทธิ์ต่างกัน เพื่อเสริมฤทธิ์ในการกำจัดพยาธิ ซึ่งจะเป็นการส่งเสริมให้มีการใช้ยากำจัดพยาธิที่มีต้นกำเนิดมาจากธรรมชาติ ลดการใช้ยากำจัดพยาธิที่มีต้นกำเนิดจากสารเคมี เป็นไปตามแนวโน้มความต้องการของตลาดผู้บริโภคที่ต้องการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนสารเคมีให้น้อยที่สุด

นอกจากนี้ยังควรมีการศึกษาต่อว่าสารสกัดจากใบแก้วมีฤทธิ์ในการกำจัดพยาธิตัวอื่นที่พบในปศุสัตว์หรือไม่เช่นพยาธิในกลุ่มตัวแบนและตัวตัดเพื่อศึกษาความกว้างในการออกฤทธิ์ของสารสกัดชนิดนี้

สำหรับรายละเอียดวิธีการทดลองที่ผู้ทรงคุณวุฒิได้ให้คำแนะนำมีประเด็นที่สำคัญ คือ ระยะเวลาที่พยาธิสัมผัสกับยาหรือสารสกัดในการทดลองนอกตัวสัตว์ต้องสอดคล้องกับเวลาที่พยาธิสัมผัสกับยาหรือสารสกัดเมื่ออยู่ในตัวสัตว์

พยาธิที่นำมาศึกษาเป็นพยาธิที่อาศัยอยู่ในกระเพาะ abomasum ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ซึ่งสัตว์เคี้ยวเอื้องมีกระเพาะ 4 กระเพาะโดยอาหารจะผ่านเรียงตามลำดับต่อไปนี้ คือ กระเพาะ rumen กระเพาะ reticulum กระเพาะ omasum และ กระเพาะแท้ abomasum ตามลำดับ สารสกัดหรือยาที่ทำการศึกษาเมื่อนำไปใช้กับสัตว์จะอยู่ในส่วนที่เป็นของเหลวในกระเพาะหมัก ซึ่งอัตราการไหลของอาหารที่เป็นของเหลวจากกระเพาะ omasum ไปยัง กระเพาะแท้ abomasum มีอัตราการไหลเท่ากับ 810 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง โดยปริมาตรที่ไหลผ่านเป็นปริมาตรเดียวกับที่ตั้งต้นในกระเพาะแรกคือกระเพาะ rumen ซึ่งมีความจุ 47 ลิตร ดังนั้นอาหารส่วนของเหลวจะผ่านกระเพาะ abomasum ไปได้หมดที่ 57 ชั่วโมง หรือ ประมาณ 2 วัน (Michael, 1989)

ซึ่งการทดลองที่ใช้ในครั้งนี้ เป็นการทดลองนอกตัวสัตว์ระยะเวลาที่พยาธิสัมผัสกับยาหรือสารสกัดที่ใช้ในการทดลองคือ 24 ชั่วโมง ซึ่งการทดลองในลักษณะเดียวกันมีอ้างอิงได้จาก Hounzangbe-Adote (2005) ได้ทดสอบฤทธิ์สารสกัดจากเมล็ด *Corica papaya* ซึ่งเป็นพืชในตระกูลมะละกอ ต่อพยาธิตัวเต็มวัยของ *H. contortus* ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง Eguale (2007) ได้ทดสอบฤทธิ์สารสกัดจาก *Hedera helix* ต่อพยาธิตัวเต็มวัยของ *H. contortus* ที่ 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ Marie-

Magdeleine (2009) ศึกษาในสภาพทดลองนอกตัวสัตว์ (*in vitro*) ทดสอบฤทธิ์สารสกัดจากเมล็ดฟักทอง (*Curcubita moschata*) ต่อตัวอ่อนของพยาธิ *H. contortus* ที่ 24 ชั่วโมง

สำหรับการทดลองนี้ได้มีการปรับวิธีการการศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่ผิวพยาธิจาก การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope) เป็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) เนื่องจากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาทำให้ตัวพยาธิสภาพ ไม่สามารถตัดเนื้อเยื่อเพื่อตรวจสอบได้ ดังนั้น จึงเป็นประโยชน์กับนักวิจัยที่จะศึกษาในต่อไปควรใช้เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ ส่องกราดแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้

เอกสารอ้างอิง

- ชโลบล วงศ์สวัสดิ์ พิระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์. 2005 (2548) ผลของพืชสมุนไพรต่อการเปลี่ยนแปลงพื้นผิวของพยาธิใบไม้ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด. การประชุมทางวิชาการ ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ครั้งที่ 31. 8-12 ตุลาคม 2548. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.
- ชโลบล วงศ์สวัสดิ์ พิระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์ 2007 (2550) ผลของสารสกัดด้วยน้ำจากรากขี้เหล็กต่อการตายและการเปลี่ยนแปลงพื้นผิวพยาธิใบไม้ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ปีที่ 2 ฉบับที่ 1 หน้า 24-30
- ปิยะรัตน์ จันทรศิริพรชัย 2009 (2552) ยาต้านปรสิตทางสัตวแพทย์ พิมพ์ครั้งที่ 2 ตีรณสาร กรุงเทพฯ หน้า 15
- ราชบัณฑิตยสถาน 2003 (พ.ศ. 2547) หนังสืออนุกรมวิธานพืช อักษร ก อรุณการพิมพ์ กรุงเทพฯ หน้า 394-395
- ราชบัณฑิตยสถาน 2003 (พ.ศ. 2547) หนังสืออนุกรมวิธานพืช อักษร ข อรุณการพิมพ์ กรุงเทพฯ หน้า 134-135
- วีรพล ทวีนนท์ 2003 (2547) อายุรศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง ปรสิตที่สำคัญในโคนม คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หน้า 2.
- วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 1997 (พ.ศ. 2540) สารานุกรมสมุนไพรไทย โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮาส์ หน้า 110, 138
- สนธยา เตียวศิริทรัพย์ อมรเทพ คูประทุมศิริ สุวรรณ นิธิอุทัย นิคม ชัยศิริ ธีรายุทธ์ โฆสิตะมงคล สุดจิตต์ จุงพิวัฒน์ 2000 (2543) การศึกษารูปแบบโปรตีนสกัดจากตัวเต็มวัยของพยาธิเฮมอนคัส เฟลชอีย เมซิสโตเซอร์ส คิจิตาตัส และ คูเปอเรีย ในโคโดยวิธี SDS-PAGE เวชสารสัตวแพทย์ ปีที่ ฉบับที่ 3 หน้า 41-50.
- Dareje, T., Tadesse E, Mirutse, G., Abiy M., 2009 Ovicidal and larvacidal activity of crude extracts of *Maesa lanceolat* and *Plectranthus punctatus* against *Haemonchus contortus* Journal of Ethnopharmacology 122 240-244.
- Egual, T., Tilahun, G., Debella, A., Feleke, A., Makonnen E., 2007 *Haemonchus contortus*: In vitro and in vivo anthelmintic activity of aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Hedera helix*. Experimental Parasitology 116: 340-345
- Egual, T., Tilahun, G., Debella, A., Feleke, A., Makonnen E., 2007 In vitro and in vivo anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. Journal of Ethnopharmacology 110: 428-433

- Fernando, S.T., 1965 Morphology, systemic, and geographic distribution of *Mecistocirrus digitatus*, a Trichostrongylid parasite of ruminants. *Journal of Parasitology* 51: 149-155.
- Fukumoto, S., Etani, K., Toi, K., Hanadate, M., Hidaka, M., Yokoya, K., Hiramatsu, T., Iguchi, T., Kudo, S., Miyamoto, K., Bando, G., 1990 Epidemiology of abomasal nematodes of dairy cattle in Hokkaido, Northern Japan. *Japanese Journal of Veterinary Science*. 52: 358-379.
- Gaur, S.N.S., Dutt, S.C., 1973 Tissue responses to *Mecistocirrus digitatus* infection in cattle. *Philippine Journal of Veterinary Medicine* 12: 64-68.
- Grady, J.O., Kotze, A.C., 2004 *Haemonchus contortus*: in vitro drug screening assays with the adult life stage. *Experimental parasitology* 106: 164-172.
- Hounzangbe-Adote, M.S., Paolini, V., Fouraste, I., Moutairou, K., Hoste H., 2005 In vitro effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science* 78: 155–160.
- Jabar, A., Iqbal, Z., Kerboeuf, D., Muhammad, G., Khan, M.N., Afaq, M., 2006 Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Sciences* 79: 2413–2431.
- Jabbar, A., Iqbal, Z., Kerboeuf, D., Muhammad, G., Khan, M.N., Afaq, M., 2006 Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Sciences* 79, 2413-2431.
- Lane, G., 1998. Anthelmintic resistance. *Veterinary Record* 143:232
- Leo, XL., Peter, F. W., 1996 Antiparasitic Drugs: *The New England Journal of Medicine*. 2:1178-1184
- Kaufmann, J., 1966. Parasites of cattle. In: *Parasitic Infections of Domestic Animals*. Birkhauser verlag, Basel pp. 29-54.
- Lichtenfels, J.R., Pillitt, P.A., 2000 Synlophe patterns of the Haemonchinae of ruminants (nematode: Trichostrongylidae) *Journal of Parasitology* 85: 1093-1098.
- Linstow, O.V., 1906 Helminthes from the collection of the Colombo Museum, *Spolia Zeylanica*. 3: pp 163-188.
- Marie-Magdeleine, C., Hoste, H., Mahieu, M., Varo, H., Archimede H., 2009 In vitro effects of *Cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 161: 99–105
- Michael, G., 1989 *Laboratory Procedures in Animal Nutrition Research*, New Mexico State University, Department of Animal and Range Sciences. Pp. 141.
- Perry, B.D., Randolph, T.F., 1999 Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. *Veterinary Parasitology* 84, 145–168.

- Perry, B.D., Randolph, T.F., McDermott, J.J., Sones, K.R., Thornton, P.K., 2002 Investing in Animal Health Research to Alleviate Poverty. ILRI, International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya, pp. 148
- Pieters, L., Vlietinck, A.J., 2005 Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? *Journal of Ethnopharmacology* 100: 57–60
- Rieko, M., Daiji, E., Manabu, O., Shin-ichiro, F., 2006 PCR-based Specific Amplification of ITS of *Mecistocirrus digitatus* and Its Application in Identification of GI Nematode Eggs in Bovine Faeces. *Journal of Veterinary Medical Science* 68(4): 345-351
- Rutherford, T.A., Webster, J.M., 1974 Transcuticular uptake of glucose by the entomophilic nematode, *Mermis Nigrescens*. *The Journal of Parasitology*. 60(5): 804-808
- Saddiqi, H.A. Jabbar, A., Iqbal, Z., Babar, W., Sindhu, Z.D., Abbas, R.Z., 2006 Comparative efficacy of five anthelmintics against trichostrongylid nematodes in sheep. *Canadian Journal of Animal Science* 86, 471-477.
- Saeed, M., Iqbal, Z., Jabbar, A., 2007. Oxfendazole resistance in gastrointestinal nematodes of beetal goats at livestock farms of Punjab (Pakistan). *Acta Veterinaria Brno* 76, 79-85.
- Soulsby, E.J.L., 1982. *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*. Seventh edition. Bailliere Tindall. London. pp. 809.
- Van Aken, D., Vercruysse, J., Dargantes, A.P., Lagapa, J.T., Raes, S., Shaw, D.J., 1997. Pathophysiological aspects of *Mecistocirrus digitatus* infection in calves. *Veterinary Parasitology* 69, 255-263.
- Van, A. D., Vercruysse, J., Dargantes, A., Valdez, L., Flores, A., Shaw, D.J., 1998 Development of immunity of *Mecistocirrus digitatus* (nematode: Trichostrongylidae) in calves. *Parasitology* 117: 83-87.
- Van, A. D., Vercruysse, J., Dargantes, A., Valdez, L., Raes, A., Shaw, D.J., 1998 Development of immunity of *Mecistocirrus digitatus* (nematode: Trichostrongylidae) in calves. *Parasitology* 69: 255-263.
- Van, W. J.A., Malan, F.S., Randles, J.L., 1997 How long before resistance makes it impossible to control some field strains of resistance *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? *Veterinary Parasitology* 70, 111-122.
- Waller, P.J., 2003 The future of anthelmintics in sustainable parasite control programs for livestock. *Helminthologia* 40, 97-102.

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม 0.2 M Phosphate buffer

โดยการเตรียม Stock solution ของสาร A และ สาร B จากนั้นผสมสาร A และ B ในอัตราส่วน 23:77 ซึ่งจะได้ 0.2 M Phosphate buffer pH=7.3 หากต้องการทำให้เป็น 0.1 M phosphate buffer ก็ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

สาร A 0.2 M Sodium phosphate monobasic

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 กรัม

หรือ

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.21 กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

สาร B 0.2 M Sodium phosphate dibasic

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.61 กรัม

หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 กรัม

หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.64 กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

การเตรียมน้ำยาคงสภาพของออสเมียมเทรตทอโรกไซด์ (Osmic acid fixative)

เตรียมสารละลาย stock ของ 4% OsO_4 (ทำในตู้ดูดไอสารเคมี)

1. นำหลอดแก้วที่มีผลึก OsO_4 บรรจุอยู่ (ขนาด 1 กรัม) มาทำความสะอาดโดยล้างน้ำ เช็ดให้สะอาดและแห้ง
2. ห่อหลอดแก้วที่มี OsO_4 อยู่ ด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ตามยาว
3. ทับหลอดแก้วในข้อ 2 ให้แตก และแกะห่อออก ถ่ายลงในเออร์เลนไมเออร์ฟลาสก์ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 ml.
4. เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร (เพื่อจะได้สารละลาย OsO_4 ที่มีความเข้มข้น 4%) เขย่าให้ดี ปิดปากภาชนะด้วยแผ่นพาราฟิล์ม (parafilm) 2 ชั้น นำฟลาสก์นี้ไปใส่ในขวดแก้วปากกว้างมีฝาปิดอีกชั้นหนึ่ง แช่ในตู้เย็นทิ้งไว้ข้ามคืน OsO_4 จะละลายน้ำได้ช้า

5. วันรุ่งขึ้นกรองเศษแก้วออกจากสารละลายดังกล่าว ด้วยกระดาษกรองเนื้อหยาบ เทสารละลายลงในขวดแก้วมีจุก เก็บขวดแก้วในภาชนะขนาดใหญ่มีฝาปิดอีกชั้นหนึ่ง และเขียนป้ายหรือทำสลาก เก็บไว้เป็นสารละลายสำรองเพื่อเตรียมน้ำยาคงสภาพต่อไป แต่ต้องเก็บไว้ในตู้เย็นตลอดเวลา

การเตรียมสารละลายของ 1% OsO_4

โดยการผสมของดังสารละลายดังนี้

4% OsO_4 1 ส่วน

0.1 M phosphate buffer 2 ส่วน

น้ำกลั่น 1 ส่วน

การเตรียม 10% Paraformaldehyde solution

โดยชั่ง paraformaldehyde(powder) 2.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและอุ่นให้ถึงอุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ เติม 1N NaOH ลงในสารละลาย 2 – 3 หยด จนสารละลายใน ึ่งไว้ให้ เย็นที่อุณหภูมิห้อง

Paraformaldehyde-glutaraldehyde fixative (Karnovsky's fixative) {2.5% glutaraldehyde}

0.1 M phosphate buffer	50 มิลลิลิตร
10% paraformaldehyde	20 มิลลิลิตร
25% glutaraldehyde	10 มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่น	20 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารสกัดสมุนไพร



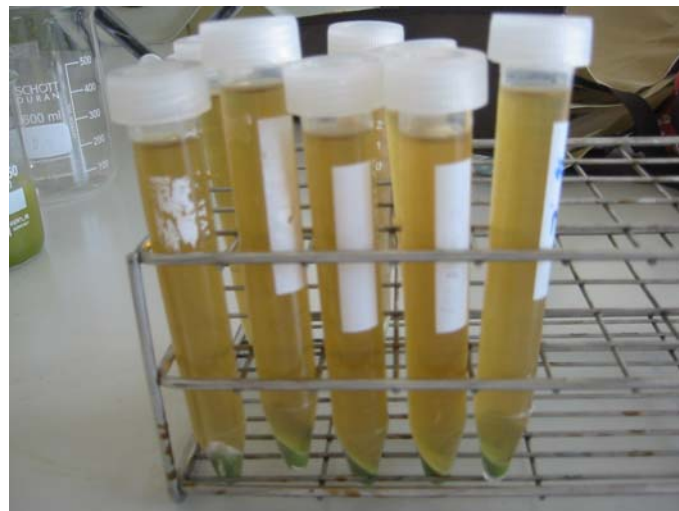
ภาพที่ 1 ภาพขณะเตรียมใบแก้ว โดยเด็ดส่วนของใบออกจากก้าน



ภาพที่ 2 ภาพขณะเตรียมใบแก้ว โดยชั่งน้ำหนักใบแก้วหนัก 200 กรัม เพื่อนำไปเตรียมสารสกัด



ภาพที่ 3 ภาพสารสกัดจากใบแก้วก่อนการปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน



ภาพที่ 4 ภาพสารสกัดจากใบแก้วหลังจากการปั่นเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที



ภาพที่ 5 ภาพรากขี้เหล็กที่ถูกสับเป็นชิ้นเล็กๆ จำนวน 1.5 กิโลกรัม พร้อมที่จะถูกนำไปต้ม



ภาพที่ 6 ภาพรากขี้เหล็กที่ถูกสับเป็นชิ้นเล็กๆ หลังผ่านการต้มแล้ว นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง



ภาพที่ 7 ภาพสารสกัดจากรากขี้เหล็กหลังจากการปั่นเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที



ภาพที่ 8 ภาพแสดงเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน ซึ่งใช้ระเหยทั้งสารสกัดจากใบแก้ว และสารสกัดจากใบและรากขี้เหล็ก



ภาพที่ 9 ภาพแสดงพยาธิ *M. digitatus* ขณะอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ M 199