

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสารสกัดจากพืชสมุนไพรเพิ่มเติมจากการทดลองในปีแรก 20 ชนิด รวมเป็น 40 ชนิด ซึ่งทำการสกัดสารจากพืชด้วยน้ำ และ 75% เอทานอล รวมเป็นตัวอย่างในการศึกษาทั้งสิ้น 80 ตัวอย่างในการศึกษาเบื้องต้นด้วยวิธี agar well diffusion assay ของสารสกัดทั้งหมดต่อการยับยั้งแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาติดโรคที่ใช้เป็นโมเดล 2 ชนิด คือ *Aeromonas caviae* และ *A. sobria* พบว่าสารสกัดจำนวน 35 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* และมีสารสกัดจำนวน 23 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. sobria* โดยสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้สูงที่สุด 3 อันดับแรก คือ สารสกัดด้วยน้ำจากทับทิม ชมพู และมะค่าไก่ ซึ่งให้ค่าการยับยั้งแบคทีเรียสูงกว่าสารสกัดจากพืชที่ศึกษาในปีที่ 1

เมื่อทำการศึกษาผลของสารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิดต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่แยกได้จากปลาติดโรคอีก 12 ชนิด คือ *A. caviae*, *A. sobria*, *A. hydrophila*, *Streptococcus agalacatiae* KKU 01002, *S. agalacatiae* KKU 04003, *S. agalacatiae* KKU 04024, *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05055, *S. agalacatiae* KKU 05056, *S. agalacatiae* KKU 05057, *S. agalacatiae* KKU 06036 และ *S. agalacatiae* KKU 06059 ด้วยวิธี agar well diffusion assay พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากทับทิมสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 7 ชนิด คือ *A. caviae*, *A. sobria*, *S. agalacatiae* KKU 01002, *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05055, *S. agalacatiae* KKU 05056 และ *S. agalacatiae* KKU 06059 ส่วนสารสกัดน้ำจากชมพูสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 7 ชนิด คือ *A. caviae*, *A. sobria*, *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05055, *S. agalacatiae* KKU 05056, *S. agalacatiae* KKU 06036, และ *S. agalacatiae* KKU 06059 สำหรับสารสกัดด้วยน้ำจากมะค่าไก่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 7 ชนิดซึ่งเป็นชนิดเดียวกับผลของสารสกัดจากทับทิม

จากการศึกษาค่า MBC ของสารสกัดดังกล่าวต่อแบคทีเรียทั้ง 12 ชนิด พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกทับทิมมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย 6 ชนิดได้ดีที่สุดโดยพิจารณาจากค่า MBC ที่มีค่าต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิด โดยแบคทีเรียดังกล่าวคือ *A. caviae*, *A. sobria*, *S. agalacatiae* KKU 01002, *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05055 และ *S. agalacatiae* KKU 06059 ซึ่งมีค่า MBC เท่ากับ 6.25, 12.5, 6.25, 12.5, 12.5 และ 6.25 mg/ml ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันสารสกัดด้วยน้ำจากชมพูมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย 4 ชนิดได้ดีที่สุดโดยพิจารณาจากค่า MBC ที่มีค่าต่ำสุดต่อแบคทีเรีย *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05055, *S. agalacatiae* KKU 05056 และ *S. agalacatiae* KKU 06036 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 12.5 mg/ml ต่อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด สำหรับแบคทีเรีย *A. hydrophila*, *S. agalacatiae* KKU 04003, *S. agalacatiae* KKU 04024 และ *S. agalacatiae* KKU 05057 พบว่าสารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิด ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้

เมื่อศึกษาผลของยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดคือ ออกซิเตตราซัยคลินและคลอแรมเฟนิคอล ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 12 ชนิด พบว่ายาปฏิชีวนะออกซิเตตราซัยคลินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ 6 ชนิดคือ *A. caviae*, *A. hydrophila*, *S. agalacatiae* KKU 04003, *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05056, และ *S. agalacatiae* KKU 06036 และคาดว่าเชื้อแบคทีเรียอีก 6 ชนิดคือ *A. sobria*, *S. agalacatiae* KKU

01002, *S. agalacatiae* KKU 04024, *S. agalacatiae* KKU 05055, *S. agalacatiae* KKU 05057 และ *S. agalacatiae* KKU 06059 คือตัวยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ 5 คือ *A. caviae*, *A. sobria*, *A. hydrophila*, *S. agalacatiae* KKU 04024, และ *S. agalacatiae* KKU 05053 และเชื้อแบคทีเรียที่กล่าวคือตัวยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียคือ *S. agalacatiae* KKU 01002, *S. agalacatiae* KKU 04003, *S. agalacatiae* KKU 05055, *S. agalacatiae* KKU 05056, *S. agalacatiae* KKU 05057, *S. agalacatiae* KKU 06036, และ *S. agalacatiae* KKU 06059

เมื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดด้วยน้ำจากทับทิม ชมพู และมะค่าไค้ ทั้งแบบ *in vitro* (เซลล์ NIH 3T3) และ *in vivo* (โรน้าเค็ม) พบว่าค่า Lethal concentration (LC_{50}) ต่อเซลล์ NIH 3T3 มีค่าต่ำกว่าค่า LC_{50} ต่อโรน้าเค็มมาก ทั้งนี้ค่า LC_{50} ต่อโรน้าเค็มของสารสกัดด้วยน้ำจากทับทิมและชมพูมีค่าสูงกว่าค่า MBC ดังนั้นสารสกัดจากพืชทั้งสองจึงน่าจะสามารถใช้ในการศึกษาการควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียในปลาได้

สำหรับการวิเคราะห์เบื้องต้นถึงกลุ่มของสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด พบว่าเป็นกลุ่มของสารเคมีที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในสารสกัดทับทิม เป็นสารเคมีในกลุ่ม sterol glycoside, proanthocyanidins, และ phenolic compounds ส่วนกลุ่มของสารเคมีที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในสารสกัดชมพูและมะค่าไค้ เป็นสารเคมีในกลุ่ม sterol glycoside และ proanthocyanidins

In this second year of study, 20 additional plant species were included and the total plant species of 40 were used throughout the study. Eighty samples of water- and 75% ethanol- plant extracts were screened for their antibacterial activity by agar well diffusion assay against 2 bacterial strains, *Aeromonas caviae* and *A. sobria*, which were isolated from lesions of bacterial infected catfish. The results showed 35 samples possessed antibacterial activity against *A. caviae* and 23 samples were active against *A. sobria*. Among these, the highest antibacterial activity of plant extracts were from pomegranate (*Punica granatum* Linn.), rose apple (*Syzygium javanica*), and Ma-kam-kai (*Drypetes roxburghii*), respectively, with the activity higher than the result of plant species selected in the first year.

The antibacterial activity of these 3 plant extracts were investigated on a total of 12 bacterial strains isolated from bacterial-infected fish lesions, which were *A. caviae*, *A. sobria*, *A. hydrophila*, *Streptococcus agalacatiae* KKU 01002, *S. agalacatiae* KKU 04003, *S. agalacatiae* KKU 04024, *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05055, *S. agalacatiae* KKU 05056, *S. agalacatiae* KKU 05057, *S. agalacatiae* KKU 06036, and *S. agalacatiae* KKU 06059. Crude water-extract derived from pomegranate possessed antibacterial activity against 7 bacterial strains; *A. caviae*, *A. sobria*, *S. agalacatiae* KKU 01002, *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05055, *S. agalacatiae* KKU 05056, and *S. agalacatiae* KKU 06059. Crude water-extract derived from rose apple also possessed antibacterial activity against 7 bacterial strains; *A. caviae*, *A. sobria*, *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05055, *S. agalacatiae* KKU 05056, *S. agalacatiae* KKU 06036, and *S. agalacatiae* KKU 06059. For crude water-extract of Ma-kam-kai could inhibited same bacterial strains as pomegranate did.

MBC results of these 3 plant extracts against 12 bacterial strains showed that the crude extract of pomegranate showed highest activity against 6 bacterial strains as seen from the lowest concentrations of MBC. These bacteria were *A. caviae*, *A. sobria*, *S. agalacatiae* KKU 01002, *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05055, and *S. agalacatiae* KKU 06059, whose their MBCs were 6.25, 12.5, 6.25, 12.5, 12.5, and 6.25 mg/ml, respectively. The crude extract of rose apple was highly active against 4 bacterial strains; *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05055, *S. agalacatiae* KKU 05056, and *S. agalacatiae* KKU 06036, whose their MBCs were equally at 12.5 mg/ml. Out of 12 bacterial strains, only 4 bacterial strains were not inhibited by the plant extracts; *A. hydrophila*, *S. agalacatiae* KKU 04003, *S. agalacatiae* KKU 04024, and *S. agalacatiae* KKU 05057.

In addition, antibacterial activity of oxytetracyclin and chloramphenicol were studied against 12 bacterial strains. The results showed that oxytetracyclin could inhibited 6 bacterial strains; *A. caviae*, *A. hydrophila*, *S. agalacatiae* KKU 04003, *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05056, and *S. agalacatiae* KKU 06036. The rest 6 bacterial strains were probably resistant to oxytetracyclin; *A. sobria*, *S.*

agalacatiae KKU 01002, *S. agalacatiae* KKU 04024, *S. agalacatiae* KKU 05055, *S. agalacatiae* KKU 05057, and *S. agalacatiae* KKU 06059. For chloramphenicol, it was active against 5 bacterial strains; *A. caviae*, *A. sobria*, *A. hydrophila*, *S. agalacatiae* KKU 04024, and *S. agalacatiae* KKU 05053. The other 7 bacterial strains were resistant to chloramphenicol; *S. agalacatiae* KKU 01002, *S. agalacatiae* KKU 04003, *S. agalacatiae* KKU 05055, *S. agalacatiae* KKU 05056, *S. agalacatiae* KKU 05057, *S. agalacatiae* KKU 06036, and *S. agalacatiae* KKU 06059.

Cytotoxicity of these 3 plant extracts were also investigated using the NIH 3T3 cell line (*in vitro*) and brine shrimp (*in vivo*). It found that lethal concentrations (LC_{50}) of all plant extracts to NIH 3T3 cells were lower than those to brine shrimp. Among 3 plant extracts, pomegranate and rose apple extracts had LC_{50} to brine shrimp lower than their MBC values, suggesting that these 2 extracts were potentially applied to control fish-infected bacteria.

Primary analyses of active chemicals in plant extracts were also investigated and found that sterol glycoside, proanthocyanidins, and phenolic compounds were chemical groups with antibacterial activity in pomegranate extract. For rose apple and Ma-kam-kai extracts, their chemicals with antibacterial activity were sterol glycoside and proanthocyanidins.