หอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยขอนแก่น
วค SH 177 .B3 ส747

บทที่ 3 ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การคัดเลือกและการเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพร

การทดลองในปีที่ 2 ได้ศึกษาสรรพคุณและคัดเลือกพืชสมุนไพรเพิ่มเติมจากการศึกษาในปีแรก จำนวน 20 ชนิด รวมเป็น 40 ชนิด ซึ่งทำการสกัดสารโดยใช้น้ำและเอธานอล ดังนั้นจึงมีสารสกัดที่ใช้ทดสอบทั้งสิ้นจำนวน 80 ตัวอย่าง สำหรับสมุนไพรที่ใช้มีเกณฑ์การคัดเลือกคือ พืชสมุนไพรต้องมีสรรพคุณในการรักษาโรคผิวหนังและแผลอักเสบ รวมถึงอยู่ในวงศ์เดียวกับฝรั่ง ลูกใต้ใบ หรือน้ำนมราชสีห์ ซึ่งเป็นพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas caviae* และ *A. sobria* ได้ดีที่สุดจากการทดลองในปีแรก หรือมีรายงานการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคน พืชสมุนไพรทั้ง 40 ชนิดที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 พืชสมุนไพรพื้นบ้าน 40 ชนิด ที่ใช้ในการวิจัย โดยพืชดังกล่าวมรสรรพคุณในการรักษาโรคผิวหนัง อาการอักเสบ โรคท้องเสีย และ/หรือ มีรายงานการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคน

วงศ์	ชื่อท้องถิ่น	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	สรรพคุณ	อ้างอิง
Acanthaceae	ฟ้าทลายโจร	*Andrographis paniculata*	ใบ	รักษาแผลสดและยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	ประเวศ วะสี (2537)
	รางจืด	*Thunbergia laurifolia* L.	ใบ	ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	กัญจนา ดีวิเศษ (2547)
	เสลดพังพอนตัวเมีย	*Clinacathus mutans* Lindau	ใบ	แก้รักษาโรคผิวหนัง	กัญจนา ดีวิเศษ (2547)
Apiaceae	บัวบก	*Centella asiatica*	ใบ	รักษาแผลสดและยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	กัญจนา ดีวิเศษ (2547)
Asteraceae	สาบเสือ	*Eupatorium odoratum* L.	ใบ	สมานแผล	กัญจนา ดีวิเศษ (2547)
Bignoniaceae	เพกา	*Oroxylum indicum* (Linn.) Vent	ฝัก	ลดการอักเสบ	กัญจนา ดีวิเศษ (2547)
Euphorbiaceae	กระบือเจ็ดตัว	*Excoccaria cochinchinensis* Lour. Var	ใบ	ลดการอักเสบ	กัญจนา ดีวิเศษ (2547)
	ขันทองพยาบาท	*Suregada multoflorum* (A. Juss.) Baill	เปลือกต้น	แก้รักษาโรคผิวหนัง และ	กัญจนา ดีวิเศษ (2547)

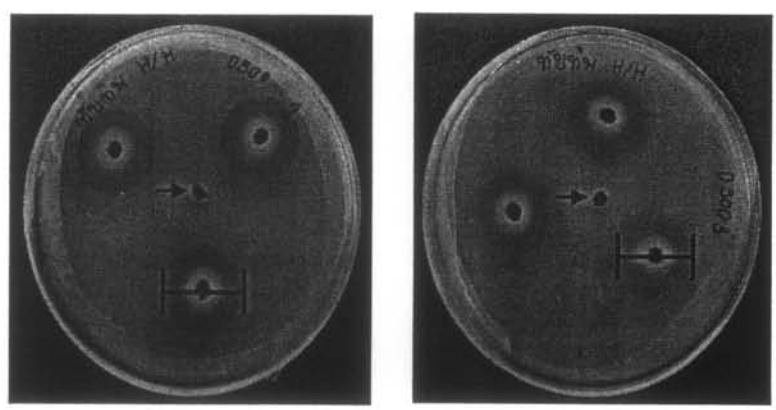
				รักษากลาก เกลื้อน	
	น้ำนมราชสีห์	*Euphorbia hirta* L.	ราก	รักษาแผลสด และ อีสุกอีใส	สำลี ใจดี และ คณะ (2525)
	น้ำนมราชสีห์เล็ก	*Euphorbia thymifolia* L.	ทั้งต้น	แก้ท้องเสีย รักษาโรคผิวหนัง และ รักษากลาก เกลื้อน	สำลี ใจดี และ คณะ (2525)
Euphorbiaceae	เปล้าน้อย	*Croton sublyratus* Kurz	ใบ	แก้ท้องเสีย	พยอม ตันติวัฒน์ (2521)
	ผักหวานบ้าน	*Sauropus androgyrus* L	ใบ	แก้อีสุกอีใส	ประเวศ วะสี (2537)
	มะขามป้อม	*Phyllanthus emblica* L.	เปลือกต้น	รักษาแผลสด	กัญจนา ดีวิเศษ (2547)
	มะคำไก่	*Drypetes roxburghii*	ใบ	แก้อีสุกอีใส	ประเวศ วะสี (2537)
	มะยม	*Phyllanthus acidus* Skeels	ใบ	แก้อีสุกอีใส และ ผื่นคัน	นิจศิริ เรืองรังสี และ พยอม ตันติวัฒน์ (2534)
	ลูกใต้ใบ	*Phyllanthus urinaria*	ทั้งต้น	ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเชื้อรา และไวรัส และ ลดการอักเสบ	กัญจนา ดีวิเศษ (2547)
	ว่านธรณีสาร	*Phyllanthus pulcher* Wall.	ใบ	แก้อีสุกอีใส และ ผื่นคัน	นิจศิริ เรืองรังสี และ พยอม ตันติวัฒน์ (2534)
	สบู่แดง	*Jatropha gossypifolia*	ใบ	แก้อีสุกอีใส และ ผื่นคัน	นิจศิริ เรืองรังสี และ พยอม ตันติวัฒน์ (2534)
	หนุมานนั่งแท่น	*Jastropha podagrica* Herk. f.	ทั้งต้น	รักษาแผลสด และ อีสุกอีใส	นิจศิริ เรืองรังสี และ พยอม ตันติวัฒน์ (2534)
	หญ้ายาง	*Euphorbia heterophylla* Linn	ทั้งต้น	แก้อีสุกอีใส	สำลี ใจดี และ คณะ (2525)

	หูปลาช่อน	*Acalypha hispida* Burm. f.	ราก	-	-
Guttiferae	มังคุด	*Garcinia mangostana* L.	เปลือกผล	รักษาแผลสด และยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	กัญจนา ดีวิเศษ (2547)
Leguminosae	คูน	*Cassia fistula L.*	ใบ	รักษาโรคผิวหนัง	กัญจนา ดีวิเศษ (2547)
Leguminosae-mimosoideae	ไมยราบ	*Mimosa pudica L.*	ทั้งต้น	ลดการอักเสบ	วุฒิ วุฒิธรรมเวช (2546)
Liliaceae	ว่านหางจระเข้	*Aloe vera* (Limm.) Burm. f.	วุ้นจากใบ	รักษาแผลสด และลดการอักเสบ	กัญจนา ดีวิเศษ (2547)
Menispermaceae	บอระเพ็ด	*Tinospora crispa Miers*	เถา	ลดการอักเสบ	ประเวศ วะสี (2537)
Moringaceae	มะรุม	*Moringa oleifera* Lamk.	ใบ	ลดการอักเสบ	นิจศิริ เรืองรังสี และ พยอม ตันติวัฒน์ (2534)
Myrsinaceae	พิลังกาสา	*Ardisia colorata* (Roxb.) Syn.	เปลือกต้น	ลดพิษ แก้โรคเรื้อน และแก้ท้องเสีย	กัญจนา ดีวิเศษ (2547)
	รามใหญ่	*Ardisia elliptaca* Thumb.	เปลือกต้น	แก้โรคเรื้อน	พยอม ตันติวัฒน์ (2521)
Myrthaceae	ชมพู่	*Syzygium javanica*	ใบ	-	-
Myrthaceae	ฝรั่ง	*Psidium guajava* L.	ใบ	แก้ท้องเสีย และยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	กัญจนา ดีวิเศษ (2547)
	มะไฟ	*Baccaurea ramiflora* Lour	ราก	แก้ท้องเสีย และแก้บิด	อภิชาติ สุติคา (2538)
	ม่าเหมี่ยว	*Syzygium malaccensis* L.	ใบ	-	-
	ยูคาลิปตัส	*Eucalyptus citriodora*	ใบ	ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	อภิชาติ สุติคา (2538)
	หว้า	*Syzygium cumini* (L.) Skeels	ใบ	แก้ท้องเสีย และแก้บิด	ภาณุทรรศน์ (2547)

Piperaceae	ผักกระสัง	*Peperomia pellucida* (L.) Humb.	ทั้งต้น	ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	กัญจนา ดีวิเศษ (2547)
Punicaceae	ทับทิม	*Punica granatum* Linn.	เปลือกผล	ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	ภาณุทรรศน์ (2547)
Saururaceae	พลูคาว	*Houttuynia cordata* Thunb.	ใบ	ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และลดการอักเสบ	นิจศิริ เรืองรังสี และ พยอม ตันติวัฒน์ (2534)
Zingiberaceae	ไพล	*Zingiber cassumunar* Roxb.jj	เหง้า	ลดการอักเสบ และมีฤทธิ์ antihistamine	ประเวศ วะสี (2537)
	เอื้องหมายนา	*Costus speciosus*	เหง้า	ลดการอักเสบ	อภิชาติ สุติคา (2538)

3.2 การตรวจสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas caviae* และ *Aeromonas sobria* เบื้องต้น ของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี Agar well diffusion assay

เทคนิค agar well diffusion assay ถูกใช้ในการตรวจสอบชนิดของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุก 2 ชนิด คือ *Aeromonas caviae* และ *A. sobria* โดยสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ จะสังเกตได้จากการเกิด inhibition zone รอบหลุมที่ใส่สารสกัดพืชสมุนไพรหลังการบ่ม 30° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยบริเวณ inhibition zone เป็นบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจะเห็นเป็นบริเวณใส ในขณะที่บริเวณที่มีเชื้อแบคทีเรียจะมีลักษณะขุ่น ในการศึกษานี้ ทำการสกัดสารจากพืชสมุนไพรรวม 40 ชนิด ด้วยน้ำ และ 75% เอทานอล (รวมสารสกัดทั้งสิ้น 80 ตัวอย่าง) และใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 1.5 mg/หลุม โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ยของ inhibition zone ภาพตัวอย่างของ inhibition zone แสดงดังภาพ 3.1



รูปที่ 3.1 การยับยั้งแบคทีเรีย (inhibition zone) ของสารสกัดด้วยน้ำจากทับทิม ต่อเชื้อ *A. caviae* (ซ้าย) และ *A. sobria* (ขวา) และ ลูกศร คือ negative control (ตัวทำละลาย) เส้นทึบแสดงขนาด inhibition zone ซึ่งเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone

จากการศึกษาพบว่า จากสารสกัดจากพืชสมุนไพร 80 ตัวอย่าง มีสารจากพืชสมุนไพรที่สกัดด้วยน้ำและ 75% เอทานอล รวม 35 ตัวอย่าง มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas caviae* (ตารางที่ 3.2 รูปที่ 3.2) โดยเป็นสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ทำการศึกษาปีแรก 16 ชนิด และพืชที่ทำการศึกษาเพิ่มเติมในปีที่ 2 อีก 19 ชนิด เมื่อพิจารณาจากวิธีการสกัด พบว่าสารสกัดที่ออกฤทธิ์จัดเป็นสารสกัดด้วยน้ำ 18 ชนิด คือ ทับทิม หนุมารนั่งแท่น ชมพู่ ฝรั่ง มะคำไก่ น้ำนมราชสีห์ น้ำนมราชสีห์เล็ก มะเหมี่ยว ยูคาลิปตัส ฟ้าทลายโจร หูปลาช่อน ลูกใต้ใบ ไมยราบ มะยม บัวบก สาบเสือ รางจืด และมะขามป้อม และสารที่สกัดด้วย 75% เอทานอล จากพืชสมุนไพร 17 ชนิด คือ ทับทิม หนุมารนั่งแท่น ชมพู่ ฝรั่ง มะคำไก่ น้ำนมราชสีห์ น้ำนมราชสีห์เล็ก มะเหมี่ยว สาบเสือ รางจืดผักหวานบ้าน ผักกะสัง คูน เอื้องหมายนา มะขามป้อม ว่านธรณีศาล และมังคุด

สำหรับสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่สกัดด้วยน้ำและ 75% เอทานอลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. sobria* พบว่ามี 23 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.2 รูปที่ 3.3) โดยเป็นสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ทำการศึกษาปีแรก 6 ชนิด และพืชที่ทำการศึกษาเพิ่มเติมในปีที่ 2 อีก 17 ชนิด เมื่อพิจารณาจากวิธีการสกัด พบว่าสารสกัดที่ออกฤทธิ์จัดเป็นสารสกัดด้วยน้ำ 13 ชนิด คือ ทับทิม ชมพู่ ฝรั่ง มะคำไก่ น้ำนมราชสีห์ มะเหมี่ยว ยูคาลิปตัส หูปลาช่อน ลูกใต้ใบ ไมยราบ มะยม น้ำนมราชสีห์เล็ก และมะขามป้อม และสารที่สกัดด้วย 75% เอทานอล จากพืชสมุนไพร 10 ชนิด คือ ทับทิม หนุมารนั่งแท่น ชมพู่ ฝรั่ง มะคำไก่ น้ำนมราชสีห์ น้ำนมราชสีห์เล็ก มะเหมี่ยว ยูคาลิปตัส และบอระเพ็ด

สารสกัดจากพืชสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด มี 15 ชนิด คือ ทับทิม มะคำไก่ ชมพู่ ฝรั่ง หนุมารนั่งแท่น น้ำนมราชสีห์ น้ำนมราชสีห์เล็ก มะเหมี่ยง ยูคาลิปตัส ฟ้าทลายโจร ชมพู่ หูปลาช่อน ลูกใต้ใบ มะยม และมะขามป้อม โดยสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้สูงที่สุด 3 อันดับแรก คือ สารสกัดด้วยน้ำจาก ทับทิม ชมพู่ และมะคำไก่ ซึ่งสารสกัดทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ที่ใช้ในการทดสอบ ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำจาก ฝรั่ง น้ำนมราชสีห์ และ ลูกใต้ใบ ซึ่งเป็นสารสกัดที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสูงที่สุดจากการศึกษาในปีแรก อีกทั้งสารสกัดทั้ง 3 ชนิดนี้ ยังแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของ inhibition zone มากกว่า 14 mm ดังนั้นจึงเลือกพืชทั้ง 3 ชนิดข้างต้นไปใช้ในการทดลองต่อไป

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากพืชชนิดเดียวกันในตัวทำละลายที่แตกต่างกันมีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้แตกต่างกัน ทำให้คาดว่าพืชสมุนไพรที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกันจะมีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ที่สกัดได้ต่างกัน จึงทำให้พืชสมุนไพรในตัวทำละลายที่แตกต่างกันมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ต่างกัน นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากพืชส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* เพียงชนิดเดียวหรือสามารถยับยั้งได้ทั้ง *A. caviae* และ *A. sobria* ยกเว้นสารสกัดเอทานอลจากยูคาลิปตัสและบอระเพ็ดที่พบว่าสามารถยับยั้งได้เฉพาะเชื้อ *A. sobria* เท่านั้น คาดว่าสารออกฤทธิ์ในสารสกัดทั้งสองชนิดน่าจะมีความจำเพาะต่อเชื้อ *A. sobria* สูง จากการศึกษารายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกผลทับทิม สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้ค่า inhibition zone ระหว่าง 6.05-

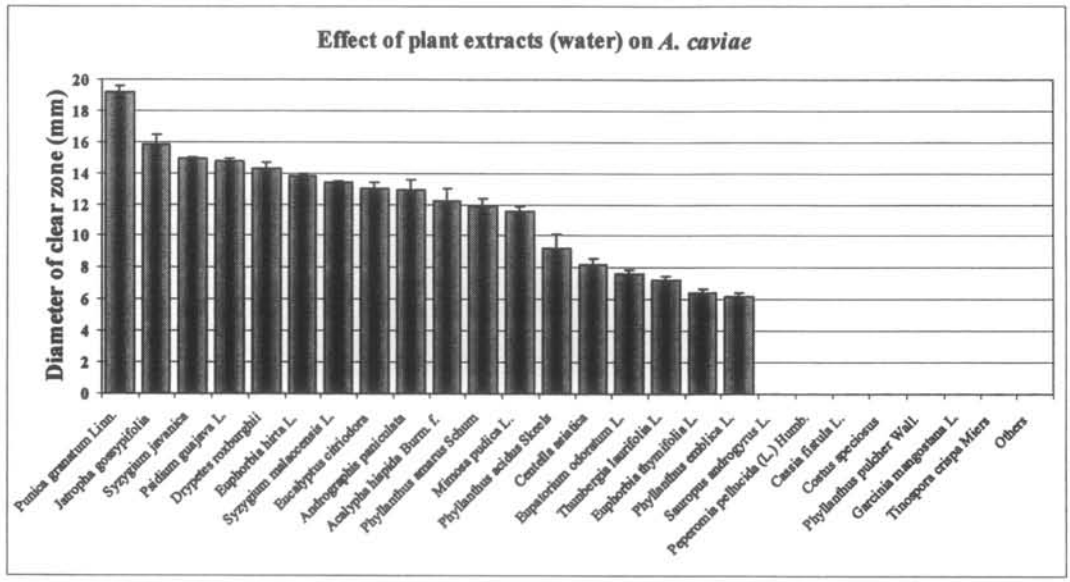
7.15 mm (ตรีชฎา และคณะ, 2548) ซึ่งค่าดังกล่าว น้อยกว่าค่าที่แสดงในงานวิจัยครั้งนี้ คาดว่าสารสกัดอาจให้ผลการยับยั้งที่แตกต่างกันตามชนิดของแบคทีเรีย แม้ว่าแบคทีเรียดังกล่าวต่างเป็นแบคทีเรียแกรมลบด้วยกันก็ตาม จากการสืบค้นข้อมูลพบว่ายังไม่มีรายงานใดนำเสนอเกี่ยวกับการใช้สารสกัดจากส่วนใบของชมพู่ (*Syzygium javanica*) และมะคำไก่ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งที่ก่อโรคในคน อีกทั้งยังไม่พบรายงานวิจัยที่นำเสนอเกี่ยวกับการใช้สารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิดคือ ทับทิม ชมพู่ และมะคำไก่ ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* และ *A. sobria* เช่นกัน

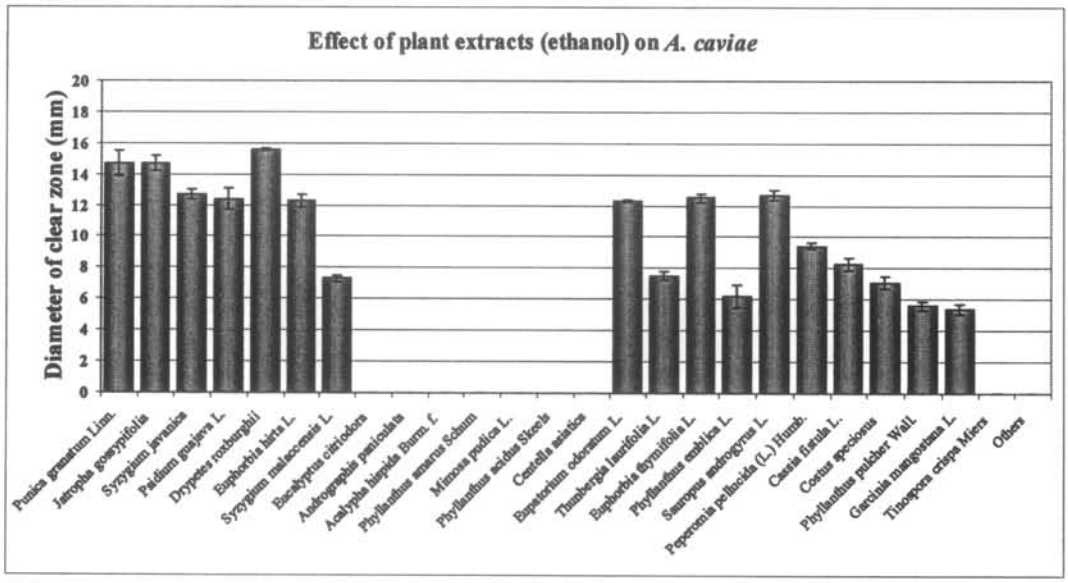
ตารางที่ 3.2 ขนาดเฉลี่ยของ inhibition zone ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย 40 ชนิด ต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* และ *A. sobria* (n=3)

พืช	สารละลายที่ใช้สกัด	สารละลายที่ใช้ละลายกลับ	ค่าเฉลี่ยของ inhibition zone (mm) ต่อเชื้อ	
			Aeromonas caviae	*Aeromonas sobria*
ทับทิม	water	water	19.2 ± 0.4	19.5 ± 0.5
หนุมารนั่งแท่น	water	water	15.8 ± 0.7	0
มะคำไก่	ethanol	DMSO	15.6 ± 0.1	7.8 ± 0.2
ชมพู่	water	water	14.9 ± 0.1	17.1 ± 0.5
ฝรั่ง	water	water	14.8 ± 0.1	10.9 ± 0.4
หนุมารนั่งแท่น	ethanol	DMSO	14.7 ± 0.5	6.0 ± 0.3
ทับทิม	ethanol	DMSO	14.7 ± 0.8	7.9 ± 0.4
มะคำไก่	water	water	14.3 ± 0.4	15.1 ± 0.3
น้ำนมราชสีห์	water	water	13.8 ± 0.2	12.6 ± 0.2
มะเหมี่ยว	water	water	13.4 ± 0.1	11.8 ± 0.9
ยูคาลิปตัส	water	water	13.0 ± 0.4	12.4 ± 0.2
ฟ้าทลายโจร	water	water	12.9 ± 0.7	12.6 ± 0.4
ชมพู่	ethanol	DMSO	12.7 ± 0.3	12.2 ± 0.1
ผักหวานบ้าน	ethanol	DMSO	12.7 ± 0.3	0
น้ำนมราชสีห์เล็ก	ethanol	DMSO	12.5 ± 0.3	11.0 ± 0.2
ฝรั่ง	ethanol	DMSO	12.4 ± 0.7	10.0 ± 0.4
น้ำนมราชสีห์	ethanol	DMSO	12.3 ± 0.4	12.0 ± 0.2
สาบเสือ	ethanol	DMSO	12.3 ± 0.1	0
หูปลาช่อน	water	water	12.2 ± 0.8	9.1 ± 0.1
ลูกใต้ใบ	water	water	11.9 ± 0.5	8.8 ± 0.5

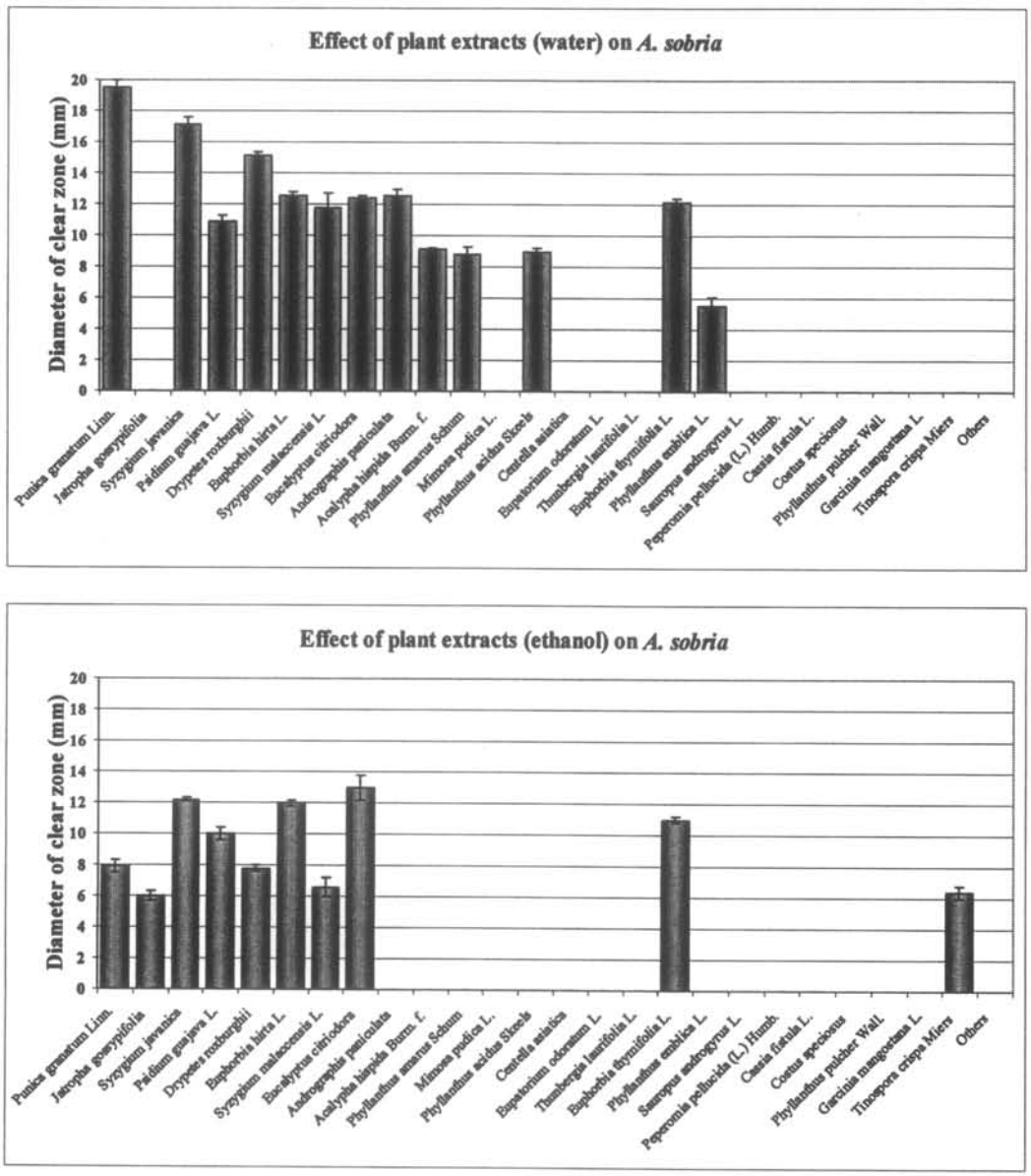
ไมยราบ	water	water	11.6 ± 0.3	0
ผักกะสัง	ethanol	DMSO	9.4 ± 0.2	0
มะยม	water	water	9.2 ± 0.9	9.0 ± 0.2
คูน	ethanol	DMSO	8.3 ± 0.9	0
บัวบก	water	water	8.2 ± 0.4	0
สาบเสือ	water	water	7.6 ± 0.3	0
รางจืด	ethanol	DMSO	7.5 ± 0.3	0
มะเหมี่ยว	ethanol	DMSO	7.3 ± 0.2	6.6 ± 0.6
รางจืด	water	water	7.2 ± 0.3	0
เอื้องหมายนา	ethanol	DMSO	7.1 ± 0.4	0
น้ำนมราชสีห์เล็ก	water	water	6.4 ± 0.3	12.2 ± 0.2
มะขามป้อม	water	water	6.2 ± 0.2	5.5 ± 0.6
มะขามป้อม	ethanol	DMSO	6.2 ± 0.7	0
ว่านธรณีศาล	ethanol	DMSO	5.6 ± 0.3	0
มังคุด	ethanol	DMSO	5.4 ± 0.3	0
ยูคาลิปตัส	ethanol	DMSO	0	13.0 ± 0.8
บอระเพ็ด	ethanol	DMSO	0	6.4 ± 0.4
กระบือเจ็ดตัว	water	water	0	0
กระบือเจ็ดตัว	ethanol	DMSO	0	0
ขันทองพยาบาท	water	water	0	0
ขันทองพยาบาท	ethanol	DMSO	0	0
คูน	water	water	0	0
บอระเพ็ด	water	water	0	0
บัวบก	ethanol	DMSO	0	0
เปล้าน้อย	water	water	0	0
เปล้าน้อย	ethanol	DMSO	0	0
ผักกะสัง	water	water	0	0
ผักหวานบ้าน	water	water	0	0
พิลังกาสา	water	water	0	0
พิลังกาสา	ethanol	DMSO	0	0
พลูคาว	ethanol	DMSO	0	0
เพกา	water	water	0	0
เพกา	ethanol	DMSO	0	0

ไพลดำ	water	water	0	0
ไพลดำ	ethanol	DMSO	0	0
ฟ้าทลายโจร	ethanol	DMSO	0	0
มะไฟ	ethanol	DMSO	0	0
มะไฟ	water	water	0	0
มะรุม	ethanol	DMSO	0	0
มะรุม	water	water	0	0
มะยม	ethanol	DMSO	0	0
มังคุด	water	water	0	0
ไมยราบ	ethanol	DMSO	0	0
รามใหญ่	water	water	0	0
รามใหญ่	ethanol	DMSO	0	0
ลูกใต้ใบ	ethanol	DMSO	0	0
ว่านธรณีศาล	ethanol	DMSO	0	0
ว่านหางจระเข้	water	water	0	0
ว่านหางจระเข้	ethanol	DMSO	0	0
สบู่แดง	water	water	0	0
สบู่แดง	ethanol	DMSO	0	0
เสลดพังพอนตัวเมีย	water	water	0	0
เสลดพังพอนตัวเมีย	ethanol	DMSO	0	0
หญ้ายาง	water	water	0	0
หญ้ายาง	ethanol	DMSO	0	0
หว้า	water	water	0	0
หว้า	ethanol	DMSO	0	0
หูปลาช่อน	ethanol	DMSO	0	0
เอื้องหมายนา	water	water	0	0





รูปที่ 3.2 ผลการยับยั้งแบคทีเรีย *A. caviae* ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร จากการวิเคราะห์ด้วย agar well diffusion assay รูปบนเป็นสารสกัดด้วยน้ำ และรูปล่างเป็นสารสกัดด้วยเอทานอล (n=3)



รูปที่ 3.3 ผลการยับยั้งแบคทีเรีย *A. sobria* ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร จากการวิเคราะห์ด้วย agar well diffusion assay รูปบนเป็นสารสกัดด้วยน้ำ และรูปล่างเป็นสารสกัดด้วยเอทานอล (n=3)

3.3 การคัดแยกชนิดเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่พบจากแผลในปลานิล และปลาดุก

การทดลองในปีที่ 2 ได้แยกชนิดแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่พบจากแผลในปลานิล และปลาดุกรวม 11 ชนิด ที่ได้จากตัวอย่างที่เก็บในจังหวัดขอนแก่น มุกดาหาร นครพนม และกาฬสินธุ์ ซึ่งได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas caviae* และ *A. sobria* (ที่ใช้เป็นโมเดลในการทดลองปีที่ 1) และเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalacatiae* จำนวน 9 สายพันธุ์ (ตาราง 3.3) ดังนั้นการศึกษาวิจัยในปีที่ 2 นี้จึงได้ทดสอบ ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยกับแบคทีเรียดังกล่าวและแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตารางที่ 3.3 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาที่ใช้ในการทดสอบ

ที่	เชื้อแบคทีเรีย	ATCC	ชนิดแกรม	แหล่งที่พบ
1	*Aeromonas caviae*	KKU 05001	ลบ	ปลาดุกที่เป็นโรคในจังหวัดขอนแก่น
2	*Aeromonas sobria*	KKU 05003	ลบ	ปลาดุกที่เป็นโรคในจังหวัดขอนแก่น
3	*Aeromonas hydrophila*	DMST 2798	ลบ	-
4	*Streptococcus agalacatiae*	KKU 01002	บวก	ปลานิลที่เป็นโรคในจังหวัดมุกดาหาร
5	*Streptococcus agalacatiae*	KKU 04003	บวก	ปลานิลที่เป็นโรคในจังหวัดขอนแก่น
6	*Streptococcus agalacatiae*	KKU 04024	บวก	ปลานิลที่เป็นโรคในจังหวัดขอนแก่น
7	*Streptococcus agalacatiae*	KKU 05053	บวก	ปลานิลที่เป็นโรคในจังหวัดนครพนม
8	*Streptococcus agalacatiae*	KKU 05055	บวก	ปลานิลที่เป็นโรคในจังหวัดนครพนม
9	*Streptococcus agalacatiae*	KKU 05056	บวก	ปลานิลที่เป็นโรคในจังหวัดนครพนม
10	*Streptococcus agalacatiae*	KKU 05057	บวก	ปลานิลที่เป็นโรคในจังหวัดนครพนม
11	*Streptococcus agalacatiae*	KKU 06036	บวก	ปลานิลที่เป็นโรคในจังหวัดกาฬสินธุ์
12	*Streptococcus agalacatiae*	KKU 06059	บวก	ปลานิลที่เป็นโรคในจังหวัดกาฬสินธุ์

3.4 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาเป็นโรคเบื้องต้น ด้วยวิธี agar well diffusion assay

ในการศึกษานี้ได้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดพืชสมุนไพร 3 ชนิด ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง *A. caviae* และ *A. sobria* ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 3.1 คือ สารสกัดด้วยน้ำจาก ทับทิม ชมพู่ และมะคำไก่ ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาทั้ง 12 ชนิด คือ *A. caviae*, *A. sobria*, *A. hydrophila*, *S. 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

จากการทดลองซึ่งใช้สารสกัดหยาบด้วยน้ำของพืชทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 100 mg/ml ปริมาตร 15 µl/หลุม พบว่าสารสกัดหยาบทับทิมและมะคำไก่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 7 ชนิดเหมือนกัน 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 (ตารางที่ 3.4) แต่สารสกัดจากทับทิมให้ค่า clear zone ที่สูงกว่าสารสกัดจากมะคำไก่ สำหรับสารสกัดน้ำจากชมพู่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 7 ชนิดเช่นกัน 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 โดยเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกับที่สารสกัดหยาบทับทิมมีฤทธิ์ยับยั้งจำนวน 6 ชนิด ยกเว้นเชื้อ *Streptococcus agalacatiae* KKU 01002 ที่สารสกัดหยาบชมพู่ไม่สามารถยับยั้ง นอกจากนี้สารสกัดหยาบชมพู่สามารถยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalacatiae* KKU 06036 ซึ่งสารสกัดหยาบทับทิมไม่สามารถยับยั้ง

โดยสรุปจากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบที่แยกบริสุทธิ์ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทุกชนิด ทั้งนี้สารสกัดหยาบทับทิมและชมพู่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้สูงกว่าสารสกัดหยาบมะคำไก่

ตารางที่ 3.4 ขนาดเฉลี่ยของ inhibition zone ของสารสกัดด้วยน้ำจากทับทิม ชมพู่ และมะคำไก่ ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลา (n=3)

เชื้อแบคทีเรีย	สายพันธุ์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (mm)		
		สารสกัดหยาบทับทิม (100 mg/ml)	สารสกัดหยาบชมพู่ (100 mg/ml)	สารสกัดหยาบมะคำไก่ (100 mg/ml)
Aeromonas caviae	KKU 05001	19.2 ± 0.4	14.9 ± 0.1	14.3 ± 0.4
Aeromonas sobria	KKU 05003	19.5 ± 0.5	17.1 ± 0.5	15.1 ± 0.3
Aeromonas hydrophila	DMST 2798	0	0	0
Streptococcus agalacatiae	KKU 01002	33.4 ± 0.9	0	4.9 ± 0.5
Streptococcus agalacatiae	KKU 04003	0	0	0
Streptococcus agalacatiae	KKU 04024	0	0	0
Streptococcus agalacatiae	KKU 05053	20.3 ± 0.3	21.8 ± 0.2	8.2 ± 0.3
Streptococcus agalacatiae	KKU 05055	19.8 ± 0.3	23.9 ± 0.3	4.1 ± 0.2
Streptococcus agalacatiae	KKU 05056	12.0 ± 0.4	25.1 ± 0.2	6.0 ± 0.3
Streptococcus agalacatiae	KKU 05057	0	0	0
Streptococcus agalacatiae	KKU 06036	0	21.7 ± 0.6	0
Streptococcus agalacatiae	KKU 06059	30.1 ± 0.5	20.4 ± 0.8	8.8 ± 0.4

3.5 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาเป็นโรคของยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินและคลอแรมฟินิคอลด้วยวิธี agar well diffusion assay

ในการศึกษานี้ได้ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 12 ชนิด ด้วยยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในหมู่เกษตรกร เพื่อควบคุมการระบาดของเชื้อก่อโรคในบ่อปลา คือ ยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินและคลอแรมฟินิคอล โดยใช้ความเข้มข้นที่ 50 μg/ml ปริมาตร 15 μl/หลุม พบว่ายาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 8 ชนิด คือ *A. caviae*, *A.hydrophila* , *S. agalacatiae* KKU 01002, *S. agalacatiae* KKU 04003, *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05055, *S. agalacatiae* KKU 05056, และ *S. agalacatiae* KKU 06036 และไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เหลือ 4 ชนิดได้ ซึ่งสันนิษฐานว่าแบคทีเรียดังกล่าวอาจดื้อต่อยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน ซึ่งได้แก่แบคทีเรีย *A. sobria, S. agalacatiae* KKU 04024, *S. agalacatiae* KKU 05057, และ *S. agalacatiae* KKU 06059 (ตารางที่ 3.5) สำหรับยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอลสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 6 ชนิด คือ *A. caviae*, *A. sobria*, *A.hydrophila*, *S. agalacatiae* KKU 04024, *S. agalacatiae* KKU 05053, และ *S. agalacatiae* KKU 06059 และไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เหลือ 6 ชนิด ซึ่งสันนิษฐานว่าแบคทีเรียดังกล่าวอาจดื้อต่อยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล ซึ่งได้แก่แบคทีเรีย *S. agalacatiae* KKU 01002, *S. agalacatiae* KKU 04003, *S. agalacatiae* KKU 05055, *S. agalacatiae* KKU 050556, *S. agalacatiae* KKU 05057, และ *S. agalacatiae* KKU 06036 (ตารางที่ 3.5)

จากผลการศึกษานี้มีข้อมูลที่น่าสนใจคือ

1. ยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินและคลอแรมฟินิคอลที่ความเข้มข้น 50 μg/ml ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalacatiae* KKU 05057 และ KKU 06059 ได้ ทั้งนี้สารสกัดจากพืชที่ศึกษาทั้ง 3 ชนิด ก็ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalacatiae* KKU 05057 ได้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อดังกล่าวถูกยับยั้งได้ยากและจำเป็นต้องศึกษาหาสารใหม่ๆ เพื่อยับยั้งเชื้อดังกล่าว

2. แม้ว่ายาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินและคลอแรมฟินิคอลจะไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalacatiae* KKU 06059 ได้ แต่สารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อนี้ได้ แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ที่จะใช้สารสกัดจากพืชดังกล่าวเพื่อยับยั้งเชื้อนี้

ตารางที่ 3.5 ขนาดเฉลี่ยของ inhibition zone ของยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน และคลอแรมฟีนิคอลต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลา (n=3)

เชื้อแบคทีเรีย	สายพันธุ์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (mm)	
		เตตราซัยคลิน	คลอแรมฟีนิคอล
Aeromonas caviae	KKU 05001	11.9 ± 0.2	14.3 ± 0.4
Aeromonas sobria	KKU 05003	0	15.1 ± 0.3
Aeromonas hydrophila	DMST 2798	20.7 ± 0.7	24.8 ± 0.6
Streptococcus agalacatiae	KKU 01002	6.9 ± 0.4	0
Streptococcus agalacatiae	KKU 04003	16.5 ± 0.7	0
Streptococcus agalacatiae	KKU 04024	0	12.0 ± 0.4
Streptococcus agalacatiae	KKU 05053	13.7 ± 0.4	19.3 ± 0.3
Streptococcus agalacatiae	KKU 05055	7.6 ± 0.2	0
Streptococcus agalacatiae	KKU 05056	29.9 ± 0.7	0
Streptococcus agalacatiae	KKU 05057	0	0
Streptococcus agalacatiae	KKU 06036	11.5 ± 0.3	4.6 ± 0.1
Streptococcus agalacatiae	KKU 06059	0	0

3.6 ค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) และ Minimal bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร ต่อเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากบาดแผลของปลา

ค่า MIC แสดงถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารที่ใช้ในการศึกษา ส่วนค่า MBC แสดงถึงความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารที่ใช้ในการศึกษา โดยค่า MIC คือค่าความเข้มต่ำสุดของสารในการยับยั้งเชื้อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสามารถวิเคราะห์ผลโดยการสังเกตความขุ่นของ bacterial culture ที่บ่มกับสารที่ศึกษาด้วยตาเปล่าโดยเปรียบเทียบกับ negative control ซึ่งไม่มีสาร โดยวัดค่าที่ได้หลังจากบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยค่า MIC จะได้จากค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สังเกตเห็นความใสของ bacterial culture ใกล้เคียงกับ negative control สำหรับค่า MBC คือค่าความเข้มต่ำสุดของสารสกัดในการฆ่าเชื้อเชื้อแบคทีเรียได้ 99.9% ซึ่งวิเคราะห์จากผลการ streak bacterial culture ที่บ่มกับสารที่ศึกษาที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง และนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยค่า MBC จะได้จาก ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดพืชสมุนไพรที่ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการทดลองนี้ได้ใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรที่เจือจางครั้งละ 2 เท่า จากความเข้มข้นตั้งต้นที่ 50 mg/ml ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดลองคือ 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.98, 0.05 และ 0 mg/ml และจำนวนซ้ำในแต่ละชุดการทดลองเท่ากับ 4 (n=4)

จากการวิเคราะห์หาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดพืชสมุนไพร 3 ชนิด ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง *A. caviae* และ *A. sobria* ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองก่อนหน้านี้คือ สารสกัดหยาบด้วยน้ำจาก ทับทิม ชมพู่ และมะคำไก่ เมื่อทำการทดสอบสารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิด กับเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากบาดแผลของปลาจำนวน 12 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดหยาบจากทับทิมสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 7 ชนิด (ค่า MIC ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 50 mg/ml) คือเชื้อแบคทีเรีย *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 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ใช้เทคนิค agar well diffusion โดยค่า MIC ของสารสกัดหยาบทับทิมต่อเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในช่วง 1.56-12.5 mg/ml และค่า MBC อยู่ในช่วง 6.25-50 mg/ml (ตารางที่ 3.6) โดยสารสกัดหยาบจากทับทิมมีผลทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas caviae* KKU 05001 และ *Streptococcus agalacatiae* KKU 06059 ได้ดีที่สุดเนื่องจากมีค่า MBC ต่ำที่สุด คือ ที่ 6.25 mg/ml เมื่อพิจารณาค่า MBC/MIC ของสารสกัดหยาบทับทิม พบว่ามีค่า ≤ 4 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบทับทิมมีฤทธิ์ในการฆ่า (bactericidal activity) เชื้อแบคทีเรีย ไม่ใช่เพียงยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (bacteriostatic activity)

สารสกัดหยาบจากชมพู่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 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 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ใช้เทคนิค agar well diffusion โดยสารสกัดหยาบจากชมพู่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์เหมือนกับสารสกัดหยาบจาก

ทับทิม แต่แตกต่างที่สารสกัดหยาบจากชมพู่ไม่มีฤทธิ์ต่อเชื้อ *Streptococcus agalacatiae* KKU 05057 แต่มีฤทธิ์ต่อเชื้อ *Streptococcus agalacatiae* KKU 06036 ทั้งนี้ค่า MIC ของสารสกัดหยาบชมพู่ต่อเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในช่วง 3.13-6.25 mg/ml และ MBC ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิดมีค่าเท่ากันที่ 12.5 mg/ml (ตารางที่ 3.7) เมื่อพิจารณาค่า MBC/MIC ของสารสกัดหยาบชมพู่ พบว่ามีฤทธิ์ในการฆ่า (bactericidal activity) เชื้อแบคทีเรีย ไม่ใช่เพียงยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (bacteriostatic activity)

สำหรับสารสกัดหยาบด้วยน้ำจากมะคำไก่มีรูปแบบการทำลายเชื้อแบคทีเรียคล้ายกับสารสกัดหยาบจากทับทิม โดยสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ 7 ชนิด คือ *A. caviae*, *A. sobria*, *S. agalacatiae* KKU 01002, *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05055, *S. agalacatiae* KKU 0505 และ *S. agalacatiae* KKU 06059 โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 3.13-50 mg/ml และค่า MBC อยู่ในช่วง 6.25-50 mg/ml (ตารางที่ 3.8) เมื่อพิจารณาค่า MBC/MIC ของสารสกัดหยาบมะคำไก่ พบว่ามีฤทธิ์ในการฆ่า (bactericidal activity) เชื้อแบคทีเรียเช่นกัน

จากผลการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบทับทิมสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย 6 ชนิด ได้ดีที่สุดเมื่อพิจารณาจากค่า MBC ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดทั้ง 3 ชนิด คือแบคทีเรีย *A. caviae*, *A. sobria*, *S. agalacatiae* KKU 01002, *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05055 และ *S. agalacatiae* KKU 06059 คือมีค่า 6.25, 12.5, 6.25, 12.5, 12.5 และ 6.25 mg/ml ตามลำดับ สำหรับสารสกัดหยาบชมพู่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้ดีที่สุดเมื่อพิจารณาจากค่า MBC ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดทั้ง 4 ชนิด คือแบคทีเรีย *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05055, *S. agalacatiae* KKU 05056 และ *S. agalacatiae* KKU 06036 คือมีค่าเท่ากับ 12.5 mg/ml ต่อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด สำหรับสารสกัดหยาบมะคำไก่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด 1 ชนิด เมื่อพิจารณาจากค่า MBC ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดทั้ง 3 ชนิด คือ *Aeromonas caviae* การที่สารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Aeromonas และเชื้อแบคทีเรีย *S. agalacatiae* แต่ละ strain ได้ที่ความเข้มข้นต่างกัน สันนิษฐานว่าชนิดของสารออกฤทธิ์จากสารสกัดพืชทั้ง 3 ชนิด อาจจะแตกต่างกัน ซึ่งจะได้ศึกษาต่อไปในด้านของการแยกกึ่งบริสุทธิ์ของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด

จากการสืบค้นข้อมูลจากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ไม่พบว่ามีรายงานเกี่ยวกับผลการยับยั้งของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม ใบชมพู่ และใบมะคำไก่ ต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae*, *A. sobria* และ *S. agalacatiae* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้จากปลา แต่มีรายงานของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมในเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนเท่านั้น โดย ศุภยางค์ วราวุฒิคุณชัย และ หลิน กิจพิพิธ (2548) ได้รายงานถึงสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกผลทับทิมที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะเมธิซิลินจำนวน 35 สายพันธุ์ได้ โดยมีค่า MBC ระหว่าง 15.00-16.00 mg/ml นอกจากนี้ ตรีชฎา ศิริลักษณ์ และคณะ (2548) ได้รายงานถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมต่อการยับยั้งเชื้อกลุ่ม gram-negative bacilli โดยศึกษาผลของสารสกัดทับทิมต่อเชื้อ *E. coli* 4 สายพันธุ์ เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เชื้อ *Shigella boydii* และเชื้อ *Salmonella*

London พบว่าสารสกัดทับทิมมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อแบคทีเรียข้างต้นในช่วง 0.09-3.13 mg/ml และ 3.13-25.00 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับการทดลองนี้ คาดว่าเป็นเพราะสารสกัดทับทิมสามารถยับยั้งแบคทีเรียต่างชนิดด้วยประสิทธิภาพที่ต่างกัน สำหรับสารสกัดจากใบชมพู่ และใบมะคำไก่ ยังไม่พบรายงานถึงผลวิจัยต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ตารางที่ 3.6 ค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดทับทิม ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลา

เชื้อแบคทีเรีย	ATCC	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MBC/MIC
Aeromonas caviae	KKU 05001	1.56	6.25	4
Aeromonas sobria	KKU 05003	6.25	12.5	2
Aeromonas hydrophila	DMST 2798	> 50	> 50	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 01002	6.25	6.25	1
Streptococcus agalacatiae	KKU 04003	> 50	> 50	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 04024	> 50	> 50	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 05053	12.5	12.5	1
Streptococcus agalacatiae	KKU 05055	12.5	12.5	1
Streptococcus agalacatiae	KKU 05056	12.5	50	4
Streptococcus agalacatiae	KKU 05057	> 50	> 50	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 06036	> 50	> 50	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 06059	6.25	6.25	1

ตารางที่ 3.7 ค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดชมพู่ ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลา

เชื้อแบคทีเรีย	ATCC	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MBC/MIC
Aeromonas caviae	KKU 05001	3.13	12.5	4
Aeromonas sobria	KKU 05003	6.25	12.5	2
Aeromonas hydrophila	DMST 2798	> 50	> 50	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 01002	> 50	> 50	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 04003	> 50	> 50	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 04024	> 50	> 50	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 05053	6.25	12.5	2
Streptococcus agalacatiae	KKU 05055	3.13	12.5	4
Streptococcus agalacatiae	KKU 05056	3.13	12.5	4
Streptococcus agalacatiae	KKU 05057	> 50	> 50	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 06036	6.25	12.5	2
Streptococcus agalacatiae	KKU 06059	6.25	12.5	2

ตารางที่ 3.8 ค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดมะคำไก่ ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลา

เชื้อแบคทีเรีย	ATCC	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MBC/MIC
Aeromonas caviae	KKU 05001	3.13	6.25	2
Aeromonas sobria	KKU 05003	12.5	12.5	1
Aeromonas hydrophila	DMST 2798	> 50	> 50	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 01002	50	> 50	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 04003	> 50	> 50	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 04024	> 50	> 50	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 05053	25	50	2
Streptococcus agalacatiae	KKU 05055	> 50	> 50	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 05056	50	50	1
Streptococcus agalacatiae	KKU 05057	> 50	> 50	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 06036	> 50	> 50	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 06059	25	50	2

3.7 ค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) และ Minimal bactericidal concentration (MBC) ของยาปฏิชีวนะ ต่อเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลา

เนื่องจากมีรายงานการศึกษาว่าการควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาของเกษตรกรเพื่อการค้า มักต้องใช้ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะในอัตราที่สูง ซึ่งสันนิษฐานว่าเกิดจากการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นการทดลองนี้จึงต้องการศึกษาผลของยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาเป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรียทั้ง 12 ชนิดที่กล่าวถึงก่อนหน้านี้ ในการทดลองนี้ใช้ยาปฏิชีวนะที่เกษตรกรนิยมใช้คือ ออกซีเตตร้าซัยคลินและคลอแรมฟีนิคอล โดยได้เจือจางยาปฏิชีวนะครั้งละ 2 เท่า จากความเข้มข้นตั้งต้น 25 µg/ml ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้คือ 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.09, 0.05, 0.03 และ 0 µg/ml

จากการศึกษาฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและคลอแรมฟีนิคอลต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 12 ชนิด คือ คือ *A. caviae, A. sobria, A. hydrophila, S. 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 พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 12 ชนิด sensitive ต่อยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและคลอแรมฟีนิคอลต่างกัน โดยเชื้อแบคทีเรียที่ sensitive ต่อยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินมี 6 ชนิดคือ *A. caviae, A.hydrophila* , *S. agalacatiae* KKU 04003, *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05056 และ *S. agalacatiae* KKU 06036 ซึ่งยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินมีค่า MIC ต่อเชื้อทั้ง 6 ชนิด เป็น 19.5, 3.13, 3.13, 6.25, 0.39 และ 12.5 µg/ml ตามลำดับ และ มีค่า MBC ต่อเชื้อทั้ง 6 ชนิด เป็น 19.5, 3.13, 6.25, 12.5, 0.39 และ 12.5 µg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 3.9) ซึ่งค่า MBC/MIC ที่ได้มีค่า ≤ 4 แสดงว่ายาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินมีฤทธิ์ในการฆ่า (bactericidal activity) เชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดดังกล่าว ไม่ใช่เพียงยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (bacteriostatic activity) สำหรับการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอีก 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 พบว่าความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินที่ 25 µg/ml ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดนี้ได้ National antimicrobial resistance monitoring system (NARMS) (2003) ได้ตรวจวัดความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่าหากค่า MIC ของยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมากกว่าหรือเท่ากับ 16 µg/ml ถือว่าเชื้อแบคทีเรียนั้นดื้อต่อยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน ดังนั้นจากผลการทดลองครั้งนี้จึงคาดว่า เชื้อแบคทีเรียคือ *A. sobria*, , *S. agalacatiae* KKU 01002, *S. agalacatiae* KKU 04024, *S. agalacatiae* KKU 05055, *S. agalacatiae* KKU 05057, และ *S. agalacatiae* KKU 06059 ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลิน

สำหรับกลไกของยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินในการยับยั้งแบคทีเรียนั้นเป็นผลมาจากการยับยั้งการถ่ายทอดรหัสของแบคทีเรีย โดยออกซีเตตร้าซัยคลินสามารถจับกับ 16S ของ 30S ไรโบโซมสับยูนิต ทำให้ขัดขวางการจับของ amino-acyl tRNA ที่ตำแหน่ง A site ของไรโบโซม การดื้อยาออกซีเตตร้าซัยคลิน

พบว่า เกิดขึ้นจากกลไกอย่างน้อย 3 รูปแบบที่แบคทีเรียใช้คือ 1) การผลิตเอนไซม์เพื่อยับยั้งฤทธิ์ของออกซีเตตร้าซัยคลิน เช่น การเติม acetyl group ที่ออกซีเตตร้าซัยคลิน ทำให้ออกซีเตตร้าซัยคลินเสียแอตติวิตีในการทำงาน 2) การปั๊มโมเลกุลของเตตร้าซัยคลินออกจากเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะมี resistant gene ที่สามารถผลิตเมมเบรนโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการปั๊มโมเลกุลของออกซีเตตร้าซัยคลินออกนอกเซลล์แบคทีเรียได้ และ 3) การป้องกันการจับของออกซีเตตร้าซัยคลินกับไรโบโซม ซึ่งเกิดได้จากหลายกลไก เช่น การสร้างโปรตีนที่จับกับออกซีเตตร้าซัยคลินทำให้ออกซีเตตร้าซัยคลินไม่สามารถจับกับไรโบโซมได้ การสร้างโปรตีนที่จับกับไรโบโซมซึ่งทำให้ไรโบโซมสามารถทำงานได้แม้ถูกจับกับออกซีเตตร้าซัยคลิน หรือ การสร้างโปรตีนที่จับกับไรโบโซมซึ่งทำให้ออกซีเตตร้าซัยคลินไม่สามารถจับกับไรโบโซมได้ (Wikipedia, 2007)

ในการศึกษาผลของยาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอลต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 12 ชนิด คือ คือ *A. caviae, A. sobria, A. hydrophila, S. 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 พบว่ายาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ 5 คือ *A. caviae, A. sobria, A. hydrophila,* , *S. agalacatiae* KKU 04024, และ *S.. agalacatiae* KKU 05053 โดยมีค่า MIC ต่อเชื้อทั้ง 5 ชนิด เป็น 3.13, 0.19, 1.56, 12.5, และ 3.13 µg/ml ตามลำดับ และ มีค่า MBC ต่อเชื้อทั้ง 5 ชนิด เป็น 6.25, 0.78, 1.56, 25.0, 3.13 µg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 3.10) ซึ่งค่า MBC/MIC ที่ได้มีค่า ≤ 4 แสดงว่ายาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอลมีฤทธิ์ในการฆ่า (bactericidal activity) เชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดดังกล่าว ไม่ใช่เพียงยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (bacteriostatic activity) สำหรับการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอีก 7 ชนิด คือ *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 พบว่าความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอลที่ 25 µg/ml ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดนี้ได้ National antimicrobial resistance monitoring system (NARMS) (2003) ได้ตรวจวัดความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอลที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่าหากค่า MIC ของยาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอลที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมากกว่าหรือเท่ากับ 32 µg/ml ถือว่าเชื้อแบคทีเรียนั้นดื้อต่อยาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล ดังนั้นจากผลการทดลองครั้งนี้จึงคาดว่า เชื้อแบคทีเรียดื้อ คือ *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 ดื้อต่อยาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล

สำหรับยาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอลมีฤทธิ์ในการยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่ค่อนข้างกว้างขวาง (broad spectrum) ซึ่งกลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของยาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอลเกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ peptidyl transferase ของแบคทีเรีย จึงทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของไรโบโซม

และการสังเคราะห์โปรตีน จากการขัดขวางการจับของ amino acyl-tRNA ที่ตำแหน่ง A site ของ 50S สับยูนิตของไรโบโซม (Petska, 1971)

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากทับทิม ชมพู่ และมะคำไก่ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากปลาเป็นโรคได้ดี โดยเฉพาะสารสกัดทั้ง 3 ชนิดนี้ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้ โดยสารสกัดจากทับทิมสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalacatiae* KKU 01002 ซึ่งดื้อต่อยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและคลอแรมฟีนิคอล สารสกัดจากชมพู่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalacatiae* KKU 06036 ซึ่งดื้อต่อยาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล สารสกัดจากทับทิมและชมพู่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalacatiae* KKU 05055 ซึ่งดื้อต่อยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและคลอแรมฟีนิคอล และสารสกัดทั้ง 3 ชนิดยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalacatiae* KKU 05056 ซึ่งดื้อต่อยาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล รวมถึงสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalacatiae* KKU 06059 ซึ่งดื้อต่อทั้งยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและคลอแรมฟีนิคอล ดังนั้นสารสกัดทั้ง 3 ชนิดจึงน่าจะใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาได้ดี แต่อย่างไรก็ตาม ยังต้องดำเนินการศึกษาด้านความเป็นพิษของสารสกัดและผลของสารสกัดต่อปลา (*in vivo*) ก่อนที่จะสรุปได้ว่า สารสกัดเหล่านี้เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์เพียงใด

ตารางที่ 3.9 ค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) ของยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาได้

เชื้อแบคทีเรีย	ATCC	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MBC/MIC
Aeromonas caviae	KKU 05001	19.5	19.5	1
Aeromonas sobria	KKU 05003	> 25	> 25	-
Aeromonas hydrophila	DMST 2798	3.13	3.13	1
Streptococcus agalacatiae	KKU 01002	25	> 25	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 04003	3.13	6.25	2
Streptococcus agalacatiae	KKU 04024	> 25	> 25	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 05053	6.25	12.5	2
Streptococcus agalacatiae	KKU 05055	25	> 25	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 05056	0.39	0.39	1
Streptococcus agalacatiae	KKU 05057	> 25	> 25	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 06036	12.5	25	2
Streptococcus agalacatiae	KKU 06059	> 25	> 25	-

ตารางที่ 3.10 ค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) ของยาปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาได้

เชื้อแบคทีเรีย	ATCC	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MBC/MIC
Aeromonas caviae	KKU 05001	3.13	6.25	2
Aeromonas sobria	KKU 05003	0.19	0.78	2
Aeromonas hydrophila	DMST 2798	1.56	1.56	1
Streptococcus agalacatiae	KKU 01002	> 25	> 25	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 04003	> 25	> 25	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 04024	12.5	25	2
Streptococcus agalacatiae	KKU 05053	3.13	3.13	1
Streptococcus agalacatiae	KKU 05055	> 25	> 25	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 05056	> 25	> 25	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 05057	> 25	> 25	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 06036	> 25	> 25	-
Streptococcus agalacatiae	KKU 06059	> 25	> 25	-

3.8 การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพร (*In vitro*) กับเซลล์ NIH 3T3 โดยใช้ MTT assay

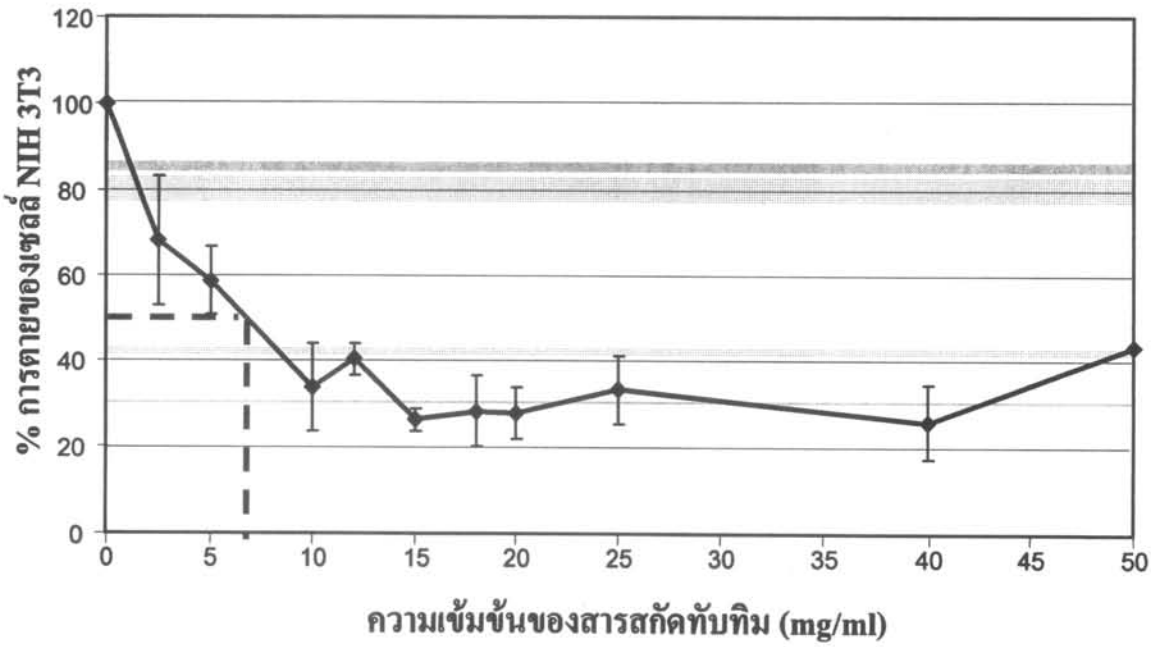
ในการตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรจากการทดลองนี้ ได้ทำการทดสอบกับเซลล์ NIH 3T3 ซึ่งเป็น mouse embryonic fibroblast cells โดยใช้ MTT assay ซึ่งสามารถวัดปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตหลังการบ่มเซลล์ NIH 3T3 กับสารสกัดพืชที่มีความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาค่า Lethal concentration 50 (LC_{50}) หรือค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีผลให้ปริมาณของเซลล์ NIH 3T3 ตาย 50% โดยค่า LC_{50} สามารถคำนวณได้จากกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ NIH 3T3 กับค่าความเข้มข้นของสารสกัด

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ NIH 3T3 ของสารสกัดจากทับทิม พบว่าสารสกัดจากทับทิมมีค่า LC_{50} ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่งโมง เฉลี่ยเป็น 7.71 mg/ml (รูปที่ 3.4) ซึ่งค่าความเข้มข้นดังกล่าวมีค่าสูงกว่าค่า MBC ของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae*, *S. agalacatiae* KKU 01002, และ *S. agalacatiae* KKU 06059 ซึ่งเท่ากับ 6.25 mg/ml ดังนั้นสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมในความเข้มข้น MBC น่าจะสามารถใช้ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิดในปลาได้ดี เนื่องจากที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์ NIH 3T3 ต่ำ

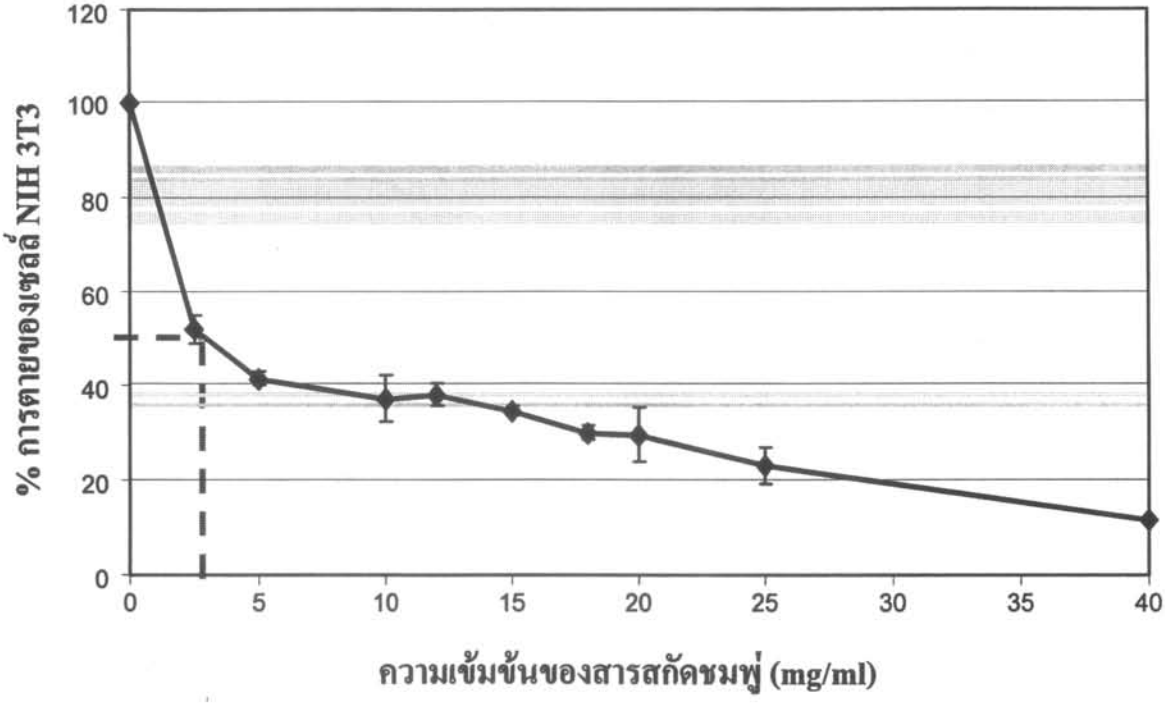
จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ NIH 3T3 ของสารสกัดจากชมพู่ พบว่าจากการคำนวณ ของสารสกัดจากชมพู่ จากกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ NIH 3T3 กับค่าความเข้มข้นของสารสกัด

พบว่ามีค่าเฉลี่ยเป็น 2.95 mg/ml (รูปที่ 3.5) ซึ่งค่าความเข้มข้นดังกล่าวมีค่าต่ำกว่าค่า MIC และ MBC ของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบทุกชนิด ซึ่งมีค่าระหว่าง 3.13-12.5 ดังนั้นสารสกัดจากชมพู่จึงเป็นพิษต่อเซลล์ NIH 3T3 สูง แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารสกัดจากชมพู่มีฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรียบางชนิดได้ดี การใช้สารสกัด 2 หรือ 3 ชนิดร่วมกันในสัดส่วนที่เหมาะสมน่าจะทำให้มีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียได้ดี แต่ลดความเป็นพิษของสารสกัดผสมที่ได้ต่อปลา ซึ่งการทดลองดังกล่าวได้วางแผนที่จะศึกษาในปีที่ 3

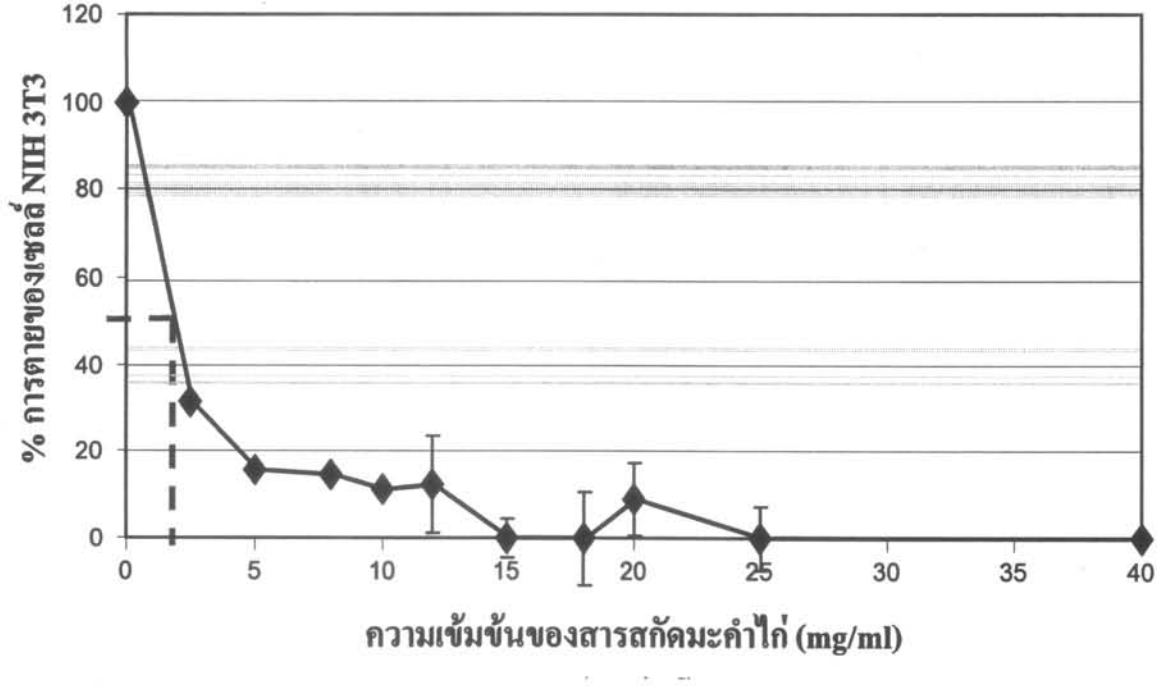
สำหรับการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากมะคำไก่ต่อเซลล์ NIH 3T3 จากกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ NIH 3T3 กับค่าความเข้มข้นของสารสกัด (รูปที่ 3.6) พบว่ามีค่าเฉลี่ยเป็น 2.45 mg/ml ซึ่งค่าความเข้มข้นดังกล่าวมีค่าต่ำกว่าค่า MIC และ MBC ของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาทั้ง 12 ชนิด ซึ่งมีค่าระหว่าง 3.13-50 mg/ml แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากมะคำไก่มีความเป็นพิษเซลล์ NIH 3T3 สูง



รูปที่ 3.4 เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ NIH 3T3 เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากทับทิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (n=4)



รูปที่ 3.5 เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ NIH 3T3 เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากชมพู่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (n=4)



รูปที่ 3.6 เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ NIH 3T3 เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากมะคำไก่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (n=4)

3.9 การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพร (*In vivo*) กับไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*)

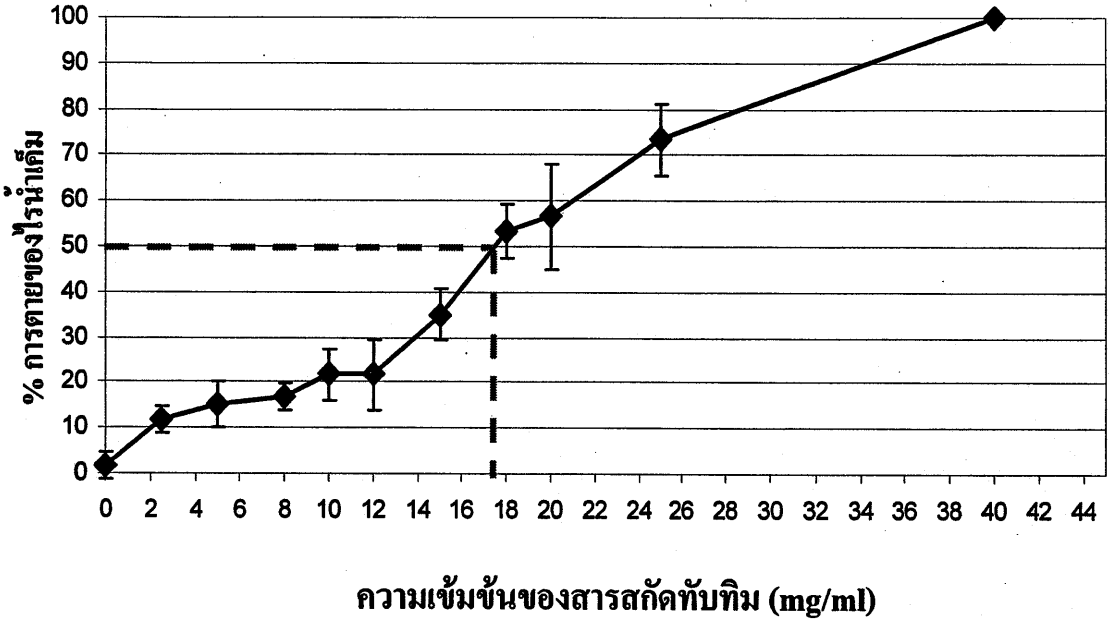
การใช้ไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) เป็นตัวอย่างของสิ่งมีชีวิตในการทดสอบความเป็นพิษแบบ *in vivo* นั้น เป็นวิธีใหม่ที่สะดวกและให้ผลดีในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากธรรมชาติ โดยไรน้ำเค็มที่ใช้ในการทดลองนั้นอยู่ในระยะ nauplii หรือระยะตัวอ่อนของไรน้ำเค็ม ที่เพิ่งฟักออกจากไข่ ซึ่งการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด แสดงผลโดยใช้ค่า LC_{50} หรือค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีผลให้ปริมาณของ nauplii ของไรน้ำเค็มตาย 50% โดยค่า LC_{50} สามารถคำนวณได้จากกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การตายของไรน้ำเค็มกับค่าความเข้มข้นของสารสกัด จากการทดสอบความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็มของสารสกัดจากทับทิม พบว่าสารสกัดจากทับทิมมีค่า LC_{50} ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่งโมง เฉลี่ยเป็น 17.45 mg/ml (รูปที่ 3.7) ซึ่งค่าความเข้มข้นดังกล่าวมีค่าสูงกว่าค่า MBC ของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae, A. sobria, S. agalacatiae* KKU 01002, *S. agalacatiae* KKU 05053, *S. agalacatiae* KKU 05055, และ *S. agalacatiae* KKU 06059 ซึ่งเท่ากับ 6.25, 12.5, 6.25, 12.5, 12.5, และ 6.25 mg/ml ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมในความเข้มข้น MBC น่าจะสามารถใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 6 ชนิดในปลาได้ เนื่องจากที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็มต่ำ นอกจากนี้ค่า LC_{50} ของสารสกัดจากทับทิมยังมีค่าสูงกว่าค่า MIC ของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. agalacatiae* KKU 05056 ซึ่งเท่ากับ 12.5 mg/ml ดังนั้น สารสกัดจากทับทิมในความเข้มข้น MIC ก็น่าจะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาชนิดนี้ได้เช่นกัน

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็มของสารสกัดจากชมพู่ พบว่าจากการคำนวณค่า LC_{50} ของสารสกัดจากชมพู่ จากกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การตายของไรน้ำเค็มกับค่าความเข้มข้นของสารสกัด ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่งโมง พบว่ามีค่าเฉลี่ยเป็น 18.29 mg/ml (รูปที่ 3.8) ซึ่งค่าความเข้มข้นดังกล่าวมีค่าสูงกว่าค่า MBC ของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรีย *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 ซึ่งเท่ากับ 12.5 mg/ml ดังนั้นสารสกัดจากชมพู่ในความเข้มข้น MBC น่าจะสามารถใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 7 ชนิดในปลาได้ เนื่องจากที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็มต่ำ

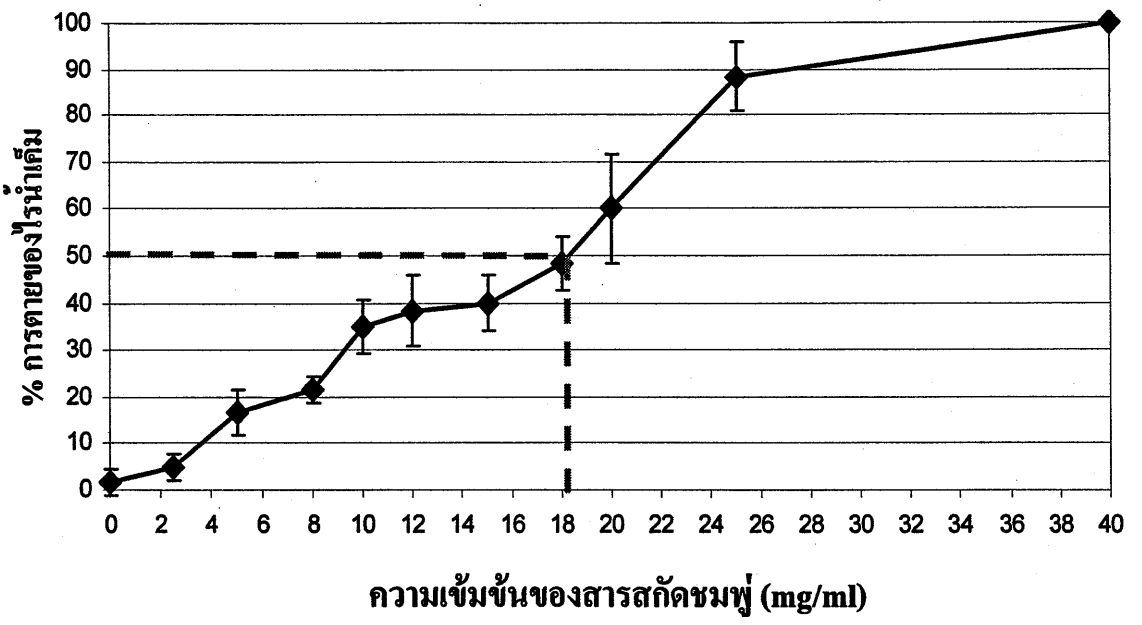
สำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็มของสารสกัดจากมะคำไก่ พบว่าจากการคำนวณค่า LC_{50} ของสารสกัดจากมะคำไก่ จากกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การตายของไรน้ำเค็มกับค่าความเข้มข้นของสารสกัด ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่งโมง พบว่ามีค่าเฉลี่ยเป็น 11.14 mg/ml (รูปที่ 3.9) ซึ่งค่าความเข้มข้นดังกล่าวมีค่าต่ำกว่าค่า MIC และ MBC ของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาทั้ง 12 ชนิด (25-50 mg/ml และ 50 mg/ml ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากมะคำไก่มีความเป็นพิษต่อ nauplii ของไรน้ำเค็มสูง

จากผลการทดลองในครั้งนี้ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่า LC_{50} ของสารสกัดพืชสมุนไพร ที่ทำการศึกษากับเซลล์ NIH 3T3 (*in vitro*) และการศึกษาในสิ่งมีชีวิตตัวอย่างคือ ไรน้ำเค็ม (*in vivo*) พบว่าค่า LC_{50} ของการศึกษาทั้ง 2 แบบนี้ มีความแตกต่างกันอย่างมาก คาดว่าเนื่องจากสารสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิด มีกลไกแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ NIH 3T3 และ nauphii ของไรน้ำเค็ม แตกต่างกัน โดยย่อมมีความเป็นพิษต่อเซลล์ NIH

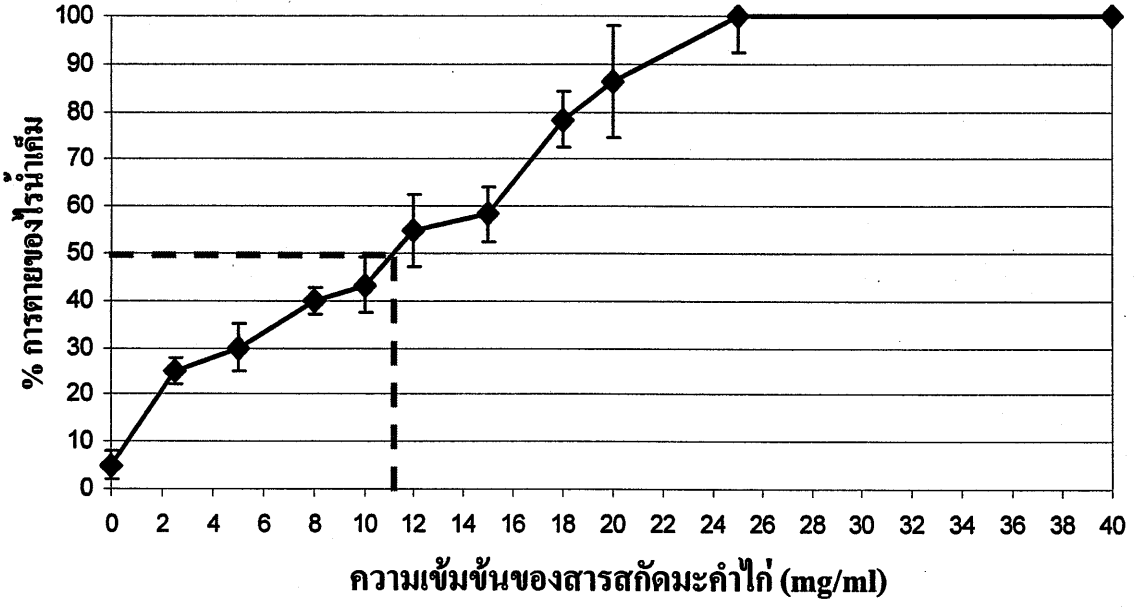
3T3 สูงกว่าสิ่งมีชีวิตที่ต่อผ่านระบบป้องกันความเป็นพิษของสารสกัดต่อร่างกาย ทำให้ค่า LC_{50} ที่คำนวณได้ต่างกัน โดยสารสกัดแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ NIH 3T3 สูงกว่า nauphii ของไรน้ำเค็ม



รูปที่ 3.7 เปอร์เซ็นต์การตายของไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากทับทิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (n=4)



รูปที่ 3.8 เปอร์เซ็นต์การตายของไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากชมพู่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (n=4)



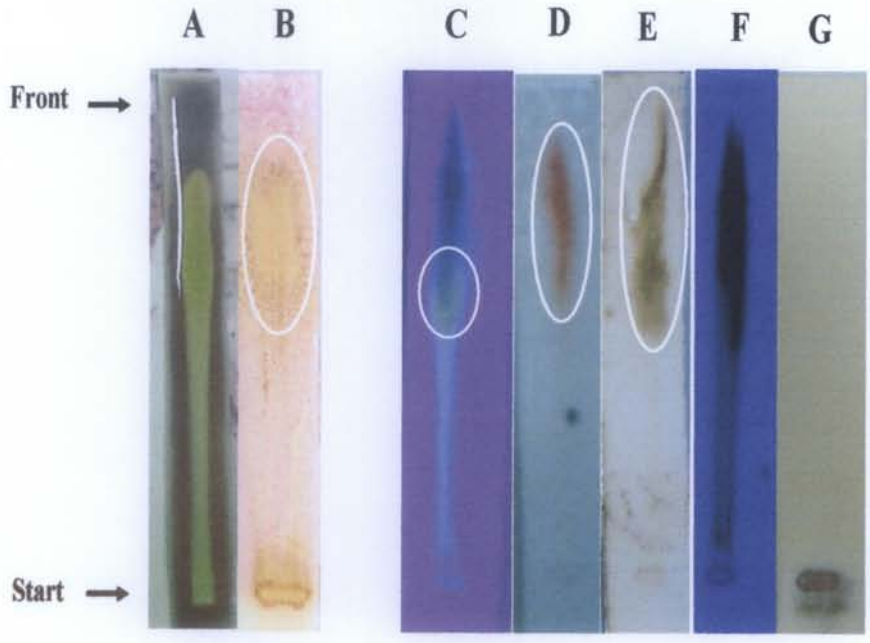
รูปที่ 3.9 เปอร์เซ็นต์การตายของไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากมะคำไก่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (n=4)

3.10 กลุ่มของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* และ *A. sobria* โดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC)-phytochemical assay และ TLC-bioautography assay

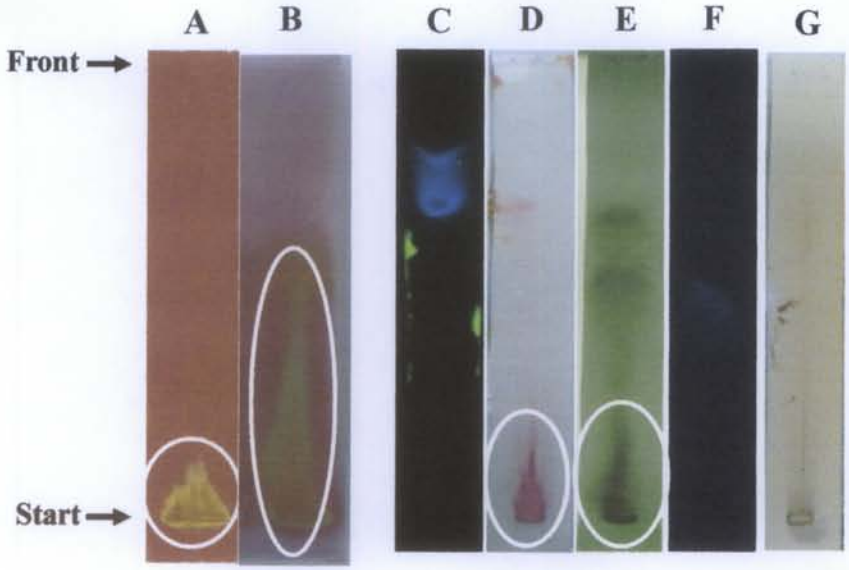
เทคนิค TLC-phytochemical assay ถูกใช้ในการวิเคราะห์และเก็บข้อมูลกลุ่มของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุก 2 ชนิด คือ *A. caviae* และ *A. sobria* โดยแผ่น TLC ที่มีสารสกัดจาก ทับทิม ชมพู่ และมะคำไก่ จะถูกแยกองค์ประกอบในตัวทำละลายที่ใช้เป็น mobile phase ที่แตกต่างกัน และศึกษาจนได้ mobile phase ที่ดีที่สุดสำหรับแยกสารสกัดพืชแต่ละชนิด โดยพบว่าสารสกัดทับทิม จะถูกแยกได้ดีที่สุดในตัวทำละลายที่ประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม : อะซิโตน : เมทานอล : น้ำ (1:7:4:5) ส่วนสารสกัดจากชมพู่และมะคำไก่จะถูกแยกได้ดีที่สุดในตัวทำละลายที่ประกอบด้วย โทลูอีน : อะซิโตน : เมทานอล (1:1:10) และ โทลูอีน : อะซิโตน : เมทานอล (1:1:8) ตามลำดับ จากนั้นแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกจะนำแผ่น TLC ที่ผ่านการแยกในตัวทำละลาย มาพ่นด้วย Detecting agents เพื่อตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นในสารสกัดพืชสมุนไพร โดยทำการทดสอบสารเคมีกลุ่ม proanthocyanidins ด้วย vanillin-HCl บริเวณที่มี proanthocyanidins จะปรากฏแถบสีชมพูหรือแดง (Ribereau-Gayon, 1972), กลุ่ม sterol glycosides ด้วย 20% perchloric acid และอบที่ 150^{0}C 10 นาที บริเวณที่มี sterol glycosides จะปรากฏแถบสีน้ำตาลดำ, กลุ่ม alkoloids ด้วย Iodine และ potassium iodide ใน glacial acetic acid บริเวณที่มี alkoloids จะปรากฏแถบสีน้ำตาล, กลุ่ม coumarins และ flavonoids ด้วยสารละลาย copper sulfate, anhydrous sodium carbonate และ sodium citrate จากนั้นสังเกตผลภายใต้แสง UV 365 nm บริเวณที่มี coumarins หรือ flavonoids จะปรากฏแถบสีฟ้าสว่าง, และกลุ่ม phenolic compounds ด้วยสารละลาย 5% Aluminium chloride ใน เมทานอล จากนั้นสังเกตผลภายใต้แสง UV 365 nm บริเวณที่มี phenolic compounds จะปรากฏแถบสีฟ้า (Wagner et al., 1984) สำหรับการทดลองในส่วนที่ 2 จะนำแผ่น TLC ที่ผ่านการแยกในตัวทำละลาย มาบ่มกับเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* หรือ *A. sobria* ที่อุณหภูมิ 30^{0}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่น TLC ดังกล่าวมาพ่นด้วย 2 mg/ml INT (*p*-iodonitrotetrazolium) และบ่มต่อที่ 30^{0}C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ในที่มืด หลังจากการบ่มจะปรากฏ inhibition zone บนพื้นหลังสีชมพูอมแดง เปรียบเทียบตำแหน่ง inhibition zone ที่ปรากฏบนแผ่น TLC กับผลการทดสอบกลุ่มสารเคมีในสารสกัดพืชสมุนไพร ในตำแหน่งดังกล่าว

จากการเปรียบเทียบตำแหน่ง inhibition zone บน แผ่น TLC กับผลการทดสอบสารเคมีของสารสกัดทับทิม พบว่าสารเคมีในบริเวณดังกล่าวให้ผลบวกต่อสารในกลุ่ม sterol glycoside, proanthocyanidins และ phenolic compounds (รูปที่ 3.10 และตารางที่ 3.11) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของตรีชฎา และคณะ (2548) ที่พบว่าสารสกัดเปลือกผลทับทิมมีสารในกลุ่มของ flavonoids, tannins, sterols, และ triterpenes ทั้งนี้ tannins และ steroids ที่พบในสารสกัดจากพืชหลายชนิดมีรายงานว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบ (Bruyne et al., 1999; Ramesh et al., 2001) ดังนั้นการที่สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* และ *A. sobria* ได้นั้นน่าจะเนื่องจากสารสำคัญในกลุ่ม proanthocyanirdins, sterol glycosides, และ phenolic compounds เมื่อเปรียบเทียบตำแหน่ง inhibition zone

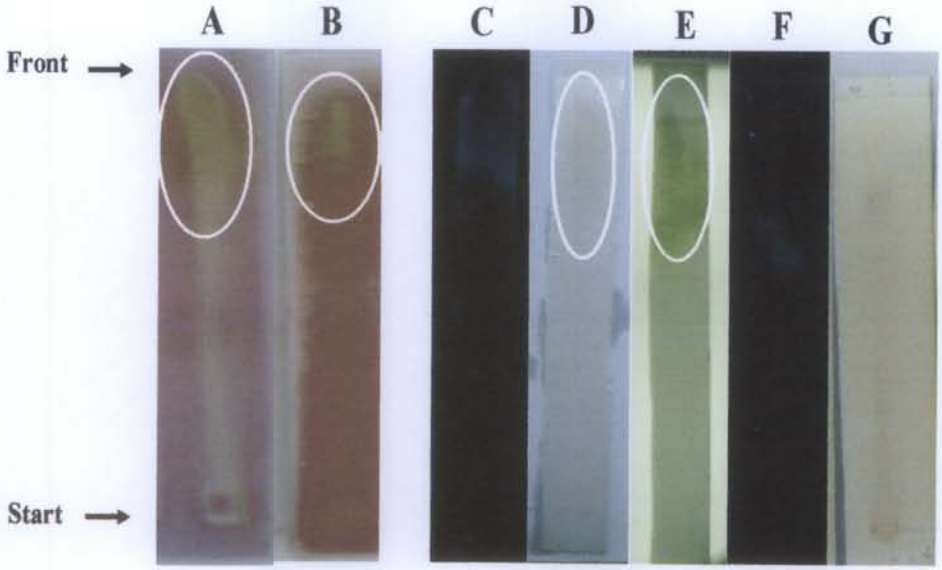
บน แผ่น TLC กับผลการทดสอบสารเคมีของสารสกัดชมพู่ และมะคำไก่ พบว่าสารเคมีในบริเวณดังกล่าวให้ผลบวกต่อสารในกลุ่ม sterol glycoside และ proanthocyanidins (รูปที่ 3.11-3.12 และตารางที่ 3.11) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่พบว่ามีรายงานถึงกลุ่มของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดด้วยน้ำจากใบชมพู่และมะคำไก่ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จากผลการทดลองพบว่าสารที่แยกได้ด้วยวิธี TLC นั้น ยังไม่สามารถแยกบริสุทธิ์สารจากพืชทั้ง 3 ชนิดได้ ซึ่งการแยกบริสุทธิ์กลุ่มสารเคมีในสารสกัดพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด จะได้ทำการศึกษาต่อไปในปีที่ 3



รูปที่ 3.10 ผลการทดสอบกลุ่มสารเคมีออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* (A) และ *A. sobria* (B) ของสารสกัดจากทับทิม โดยใช้ตัวทำละลายที่ประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม : อะซิโตน : เมทานอล : น้ำ (1:7:4:5) เป็น mobile phase ซึ่งกลุ่มของสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบคือphenolic compounds (C), proanthocyanidins (D), sterol glycosides (E), coumarins และ flavonoids (F), และ alkaloids (G) ตามลำดับ



รูปที่ 3.11 ผลการทดสอบกลุ่มสารเคมีออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* (A) และ *A. sobria* (B) ของสารสกัดจากชมพู่ โดยใช้ตัวทำละลายที่ประกอบด้วย ไทลูอีน : อะซิโตน : เมทานอล (1:1:10) เป็น mobile phase ซึ่งกลุ่มของสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบคือphenolic compounds (C), proanthocyanidins (D), sterol glycosides (E), coumarins และ flavonoids (F), และ alkaloids (G) ตามลำดับ



รูปที่ 3.12 ผลการทดสอบกลุ่มสารเคมีออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* (A) และ *A. sobria* (B) ของสารสกัดจากมะคำไก่ โดยใช้ตัวทำละลายที่ประกอบด้วย ไทลูอีน : อะซิโตน : เมทานอล (1:1:8) เป็น mobile phase ซึ่งกลุ่มของสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบคือphenolic compounds (C), proanthocyanidins (D), sterol glycosides (E), coumarins และ flavonoids (F), และ alkaloids (G) ตามลำดับ

ตารางที่ 3.11 ผลการทดสอบกลุ่มสารเคมีของสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* และ *A. sobria*

กลุ่มสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ	ผลการทดสอบ		
	สารสกัดทับทิม	สารสกัดชมพู่	สารสกัดมะคำไก่
Alkoloids	-	-	-
Sterol glycosides	+	+	+
Saponin glycosides	-	-	-
Phenolic compounds	+	-	-
Coumarins and Flavonoids	-	-	-
Flavonoids	-	-	-
Proanthocyanidins	+	+	+