บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการศึกษาของสารสกัดใบฝรั่งในการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ในครั้งนี้ได้แบ่งตามหัวข้อการศึกษาทั้ง 5 ส่วน ตามหัวข้อในบทที่ 3 คือ

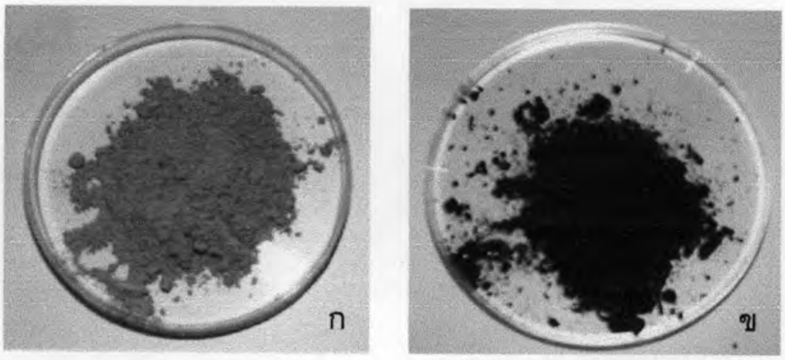
1. ผลการศึกษาสารสกัดใบฝรั่ง
2. ผลการศึกษาสารสกัดใบฝรั่งต่อเชื้อ *A. hydrophila* นอกตัวสัตว์ (*in vitro*)
3. ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดใบฝรั่งก่อนทดลอง (*in vivo*)
4. ผลการศึกษาสารสกัดใบฝรั่งต่อปลาคาร์พที่ไม่ฉีดเชื้อ (*in vivo*)
5. ผลการศึกษาสารสกัดใบฝรั่งต่อปลาคาร์พที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

ส่วนที่ 1 ผลการศึกษาสารสกัดใบฝรั่ง

4.1.1 ผลการสกัดสาร การตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณแทนนินรวมในสารสกัดใบฝรั่ง

- **ลักษณะสารสกัด**

มีสีเขียวขี้ม้าปนน้ำตาล รสฝาดปนขมคล้ายใบชา น้ำหนักรวม 948 กรัม จาก น้ำหนักผงใบฝรั่งแห้งตั้งต้น 15 กิโลกรัม คิดเป็นร้อยละ 6.32 ของน้ำหนักของสารตั้งต้น



ภาพที่ 4.1 ลักษณะของผงใบฝรั่งก่อนผ่านกรรมวิธีการผลิต (ก) และสารสกัดผงที่ได้ (ข)

- **ผลการหาปริมาณแทนนินรวมในสารสกัดใบฝรั่ง**

พบสารแทนนินรวมในสารสกัดใบฝรั่งเท่ากับ ร้อยละ 46.17 โดยน้ำหนัก (ปริมาณความชื้นโดยวิธี Loss on drying เท่ากับ ร้อยละ 8.45 โดยน้ำหนัก) (ภาคผนวก ข)

- **ผลการหาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดใบฝรั่ง**

จากการตรวจด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี/แมสสเปคโตมิเตอร์ (GC/MS) พบสารที่มีปริมาณมากพอบอกค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของในสัดส่วนสารทั้งหมด (ร้อยละของพื้นที่) ซึ่งสารส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มน้ำมันหอมระเหย กรดไขมัน อนุพันธ์ของกรดไขมัน และสารต้านอนุมูลอิสระ (ดังแสดงในตารางที่ 4.1) ผลโดยละเอียดขององค์ประกอบทางเคมี รายงานฉบับจริงดูในภาคผนวก ข

ตารางที่ 4.1 สัดส่วนองค์ประกอบของสารสกัดใบฝรั่งที่ทำการวัดโดย GC/MS

องค์ประกอบทางเคมี	**ร้อยละของพื้นที่** (%area)
Linoleic acid	13.36
Caryophyllene	12.32
trans-Squalene	10.07
n-Hexadecanoic acid	9.89
c-Sitosterol	8.95
Oleic Acid	8.22
Calamenene	6.76
Globulol	5.11
aromadendren epoxide	4.86
4,4,8 Trimethyltricyclo[6.3.1.0(1,5)] dodecane-2,9-diol	4.29
Octadecanoic acid	3.86
Vitamin E	3.74
phytol	3.12
Isoaromadendren epoxide	3.04
Propylparaben	2.40

<u>ส่วนที่ 2 ผลการศึกษาสารสกัดใบฝรั่งต่อเชื้อ *A. hydrophila* นอกตัวสัตว์</u> *(in vitro)*

4.2.1 ผลการหาความเข้มข้นของสารสกัดใบฝรั่งต่ำที่สุดที่สามารถยังยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC)

พบว่าสารสกัดใบฝรั่งที่ความเข้มข้น 800 พีพีเอ็มเป็นต้นไปจะไม่สามารถมองเห็นเชื้อ *A. hydrophila* ขึ้นในอาหารเลี้ยง MHA โดยวิธี Agar dilution method เลย ในตัวอย่างทั้ง 3 ซ้ำ ส่วนที่ความเข้มข้น 0, 600, 650, 700 และ 750 พีพีเอ็ม ยังสามารถพบเชื้อขึ้นในจานทดลองได้

4.2.2 ผลการหาความไวของยาปฏิชีวนะ (sensitivity test) ในจานทดลอง

จากตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone ในการทดสอบ disc diffusion plate พบว่าในการทดสอบ Enrofloxacin ให้ Inhibition zone มากที่สุด และรองลงมาเป็น Norfloxacin, Kanamycin, Gentamycin และ Chloramphenicol ตามลำดับ นอกนั้นไม่พบบริเวณ inhibition zone เลย หรือไม่ให้ผลต่อการยับยั้งเชื้อในจานทดลองเทียบเท่ากับ disc ของเอทานอล

ตารางที่ 4.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone ด้วยวิธี disc diffusion

ลำดับ	ชนิดของยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ	เส้นผ่าศูนย์กลาง (มม.)
1	Penicillin	0
2	Erythromycin	0
3	Kanamycin	19.0±0.5
4	Streptomycin	0
5	Chloramphenicol	9.5±0.5
6	Sulfamethoxazone	0
7	Gentamycin	14.0±0.5
8	Tetracycline	0
9	Polymyxin B	0
10	Norfloxacin	20.5±0.5
11	Enrofloxacin	**25.0±0.5**
12	95% ethanol (control)	0

<u>ส่วนที่ 3 ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดใบฝรั่งก่อนการทดลอง</u>

4.3.1 ผลความเป็นพิษของสารสกัดใบฝรั่งในรูปแบบการกินผสมสารสกัด

จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดที่ 2, 3 และ 4 เท่าของ MIC (ร้อยละ 5.3, 8.0 และ10.6 ตามลำดับ) ไม่พบการตายเลย ตลอดการทดลอง 96 ชั่วโมง แต่เห็นผลอย่างชัดเจนว่าปลาคาร์พที่ให้อาหารผสมสารสกัดร้อยละ 8.0 กินอาหารน้อยลงมาก และปลาคาร์พที่ให้อาหารผสมสารสกัดร้อยละ 10.6 ไม่กินอาหารเลย

ปลาคาร์พที่ทำการทดลองในส่วนนี้ไม่ตายจากการได้รับสารสกัดใบฝรั่งโดยการผสมอาหาร จึงไม่มีผลพยาธิวิทยา

4.3.2 ผลความเป็นพิษของสารสกัดใบฝรั่งในรูปแบบการผสมน้ำจุ่มปลา

- **ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำผสมสารสกัดใบฝรั่ง**

คุณภาพน้ำเลี้ยงปลาก่อน และหลังผสมสารสกัดใบฝรั่งที่ความเข้มข้น 1600 พีพีเอ็ม ได้ผลดังตารางที่ 4.3 พบว่า ค่าที่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นได้แก่ ค่าซัลไฟด์ และฟอสเฟส ส่วนค่าที่มีการเปลี่ยนแปลงลดลง ได้แก่ ค่าความเป็นด่าง พีเอช และความกระด้าง โดยค่าแอมโมเนีย อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 4.3 คุณภาพน้ำเลี้ยงปลาก่อน และหลังผสมสารสกัดใบฝรั่ง

Parameter	น้ำเลี้ยงก่อนผสมสารสกัดใบฝรั่ง	น้ำเลี้ยงหลังผสมสารสกัดใบฝรั่งเข้มข้น 1600 พีพีเอ็ม
Alkalinity (ppm)	100	80
pH	7.5	7.2
Sulfide (ppm)	0	0.025
Hardness (ppm)	800	400
Ammonia (ppm)	0.25	0.25
Phosphate (ppm)	0.73	2.34
Temperature (C°)	27.5	27.5
D.O. (ppm)	4.8	4.8

- **ผลของน้ำผสมสารสกัดใบฝรั่งที่ความเข้มข้น 1,600 พีพีเอ็ม ในการจุ่มปลาที่ระยะเวลาต่าง ๆ**

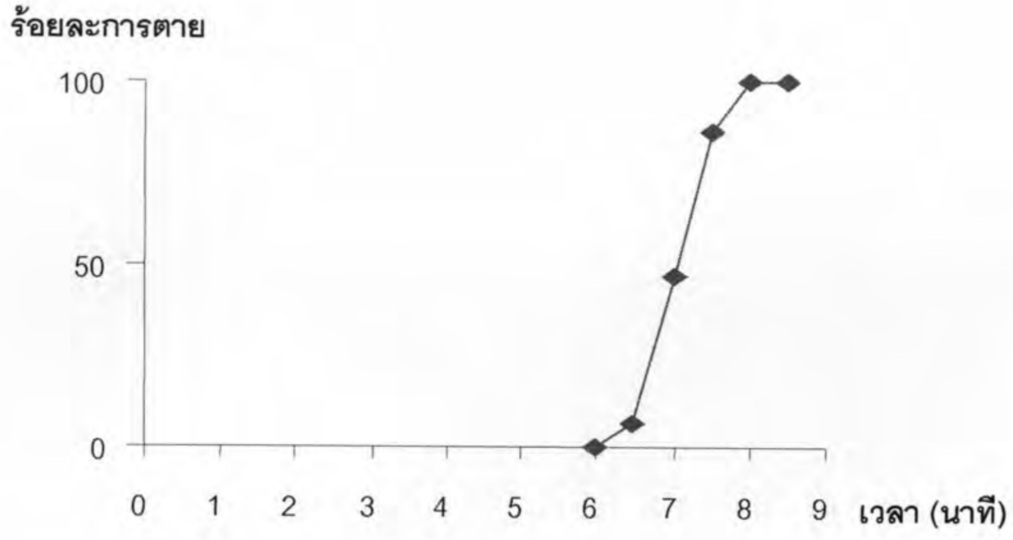
ผลการทดลองเบื้องต้น พบว่า หลังจากจุ่มสารสกัดใบฝรั่ง และให้ออกซิเจน พบว่า น้ำเป็นสีน้ำตาลเข้ม และเกิดฟองขึ้นมาก กลุ่มปลาที่ใส่สารสกัดที่ 1600 พีพีเอ็ม เริ่มมีอาการกระวนกระวาย ว่ายน้ำเร็วทันที อ้าปากถี่กว้าง แผ่นเหงือกขยับเร็วขึ้น ว่ายน้ำอย่างไม่มีทิศทาง และลอยตัวตะแคงนิ่ง ต่อมาปลาเริ่มหายใจถี่ลดลง ไม่ตอบสนองต่อการจับบังคับ และหยุดหายใจ

ที่ระยะเวลา 2 นาที เมื่อนำปลากลับมาใส่ตู้เลี้ยง พบว่า ปลามีอาการอ้าปากถี่กว้าง แผ่นเหงือกขยับเร็วขึ้นอย่างชัดเจน แต่ยังสามารถทรงตัวในน้ำได้ตามปกติ และกลับมามีอาการปกติภายในเวลา 1-2 นาที ดังนั้นจึงใช้สารสกัดใบฝรั่งความเข้มข้น 1600 พีพีเอ็ม ผสมในน้ำจุ่ม ที่ระยะเวลา1 นาที ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ไม่ทำให้ปลาคาร์พแสดงอาการผิดปกติ

ผลการทดลองอย่างละเอียดแสดงดังตาราง 4.4 ปลาที่ทำการจุ่มตั้งแต่เวลา 6 นาที จะมีอาการเสียการทรงตัว ลอยตะแคง และนอนก้นตู้ แต่เมื่อนำปลากลับมาใส่น้ำเลี้ยงปกติ พบว่า ปลากลับมามีอาการปกติได้ในเวลาประมาณ 15 นาที โดยปลาเริ่มตายที่ 6.5 นาที และตายหมดที่เวลา 8 นาที ดังนั้นระยะเวลาในการจุ่มมากที่สุดที่ไม่ทำให้ปลาคาร์พตายเลย คือที่ 6 นาที และในการทดลองนี้ระยะเวลาในการจุ่มน้อยที่สุดที่ทำให้ปลาคาร์พตายทั้งหมด คือ 8 นาที

ตารางที่ 4.4 ผลของระยะเวลาจุ่มสารสกัดที่ 1600 พีพีเอ็ม ต่อปลาคาร์พ

ระยะเวลาในการจุ่ม (นาที)	เปอร์เซ็นต์การตาย
6	0
6.5	6.7
7	46.6
7.5	86.6
8	100
8.5	100



รูปที่ 4.2 แสดงร้อยละการตายของปลาคาร์พที่จุ่มน้ำสารสกัดใบฝรั่งความเข้มข้น 1600 พีพีเอ็มในช่วงเวลาต่าง ๆ

- **ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาของปลาคาร์พที่ตาย (ตารางที่ 4.5)**

ก. **การเปลี่ยนแปลงทางมหพยาธิ** (gross findings)

ปลาคาร์พที่ตายจากการทดลองระยะเวลาในการจุ่มสารสกัดใบฝรั่ง ทุกตัวจะมีเมือกเคลือบลำตัวมาก แผ่นเหงือกมีสีคล้ำ และมีเมือกเหนียวสีน้ำตาลเกาะตามแผ่นเหงือก

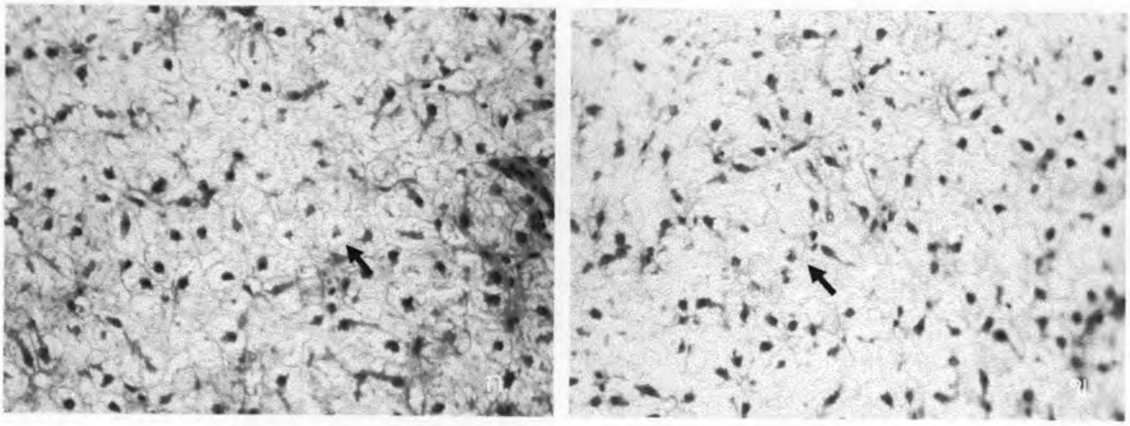
เมื่อทำการชันสูตรซากเพื่อดูความเปลี่ยนแปลงของอวัยวะภายใน ไม่เห็นความผิดปกติในอวัยวะอื่นๆ

ข. **การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา** (microscopic findings)

จากการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาในอวัยวะของปลาคาร์พที่ตายในการศึกษา โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงกลุ่มที่สัมผัสสารสกัดใบฝรั่งเทียบกับกลุ่มควบคุม ได้แก่ ตับ ไต หัวใจ และเหงือก สังเกตผลได้ดังนี้

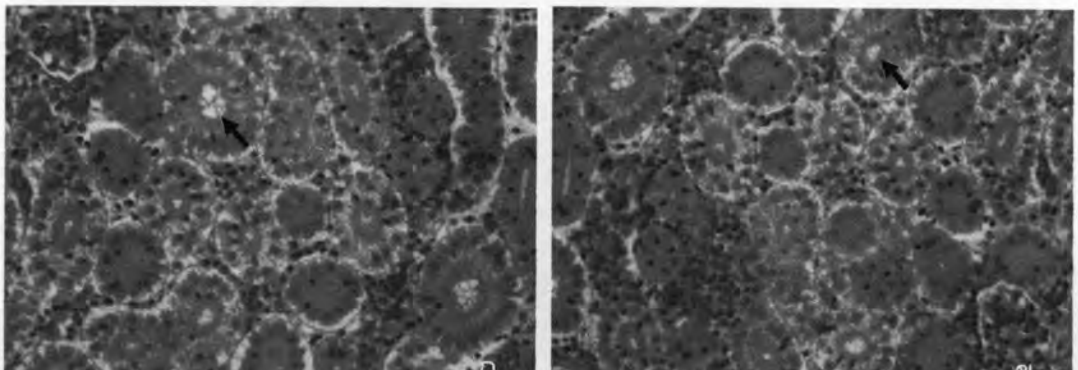
1) **ตับ** : รูปทางจุลพยาธิในตับของปลาคาร์พที่ตายจากการใช้สารสกัดใบฝรั่ง 1600 พีพีเอ็ม ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ตับ (hepatocyte) นิวเคลียสอยู่กลางเซลล์

ไซโตพลาสมติดสีชมพูอมม่วงพบการสะสมของไขมันและไกลโคเจน รวมทั้งไม่พบการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด และการสะสมของเซลล์อักเสบ (รูปที่ 4.3 ก.) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.3 ข.)



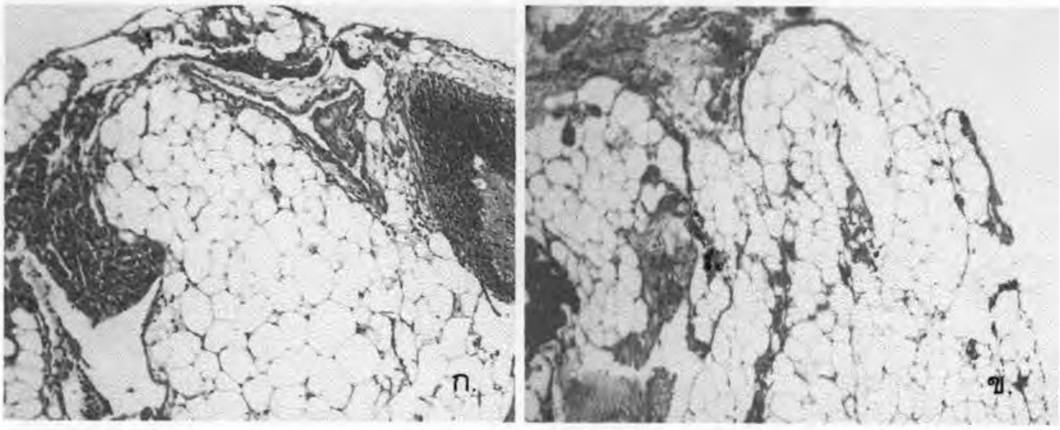
รูปที่ 4.3 รูปทางจุลพยาธิวิทยาของเซลล์ตับ (hepatocyte) ของปลาที่ตายจากการได้รับสารสกัดใบฝรั่ง (ก) และกลุ่มควบคุม (ข) (x1000)

2) **ไต**: รูปทางจุลพยาธิวิทยาในไตของปลาคาร์พที่ใช้สารสกัดใบฝรั่ง 1600 พีพีเอ็ม ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุ (epithelial cell) ของท่อไต (renal tubule) รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด และเซลล์อักเสบ (รูปที่ 4.4 ก.) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.4 ข.)



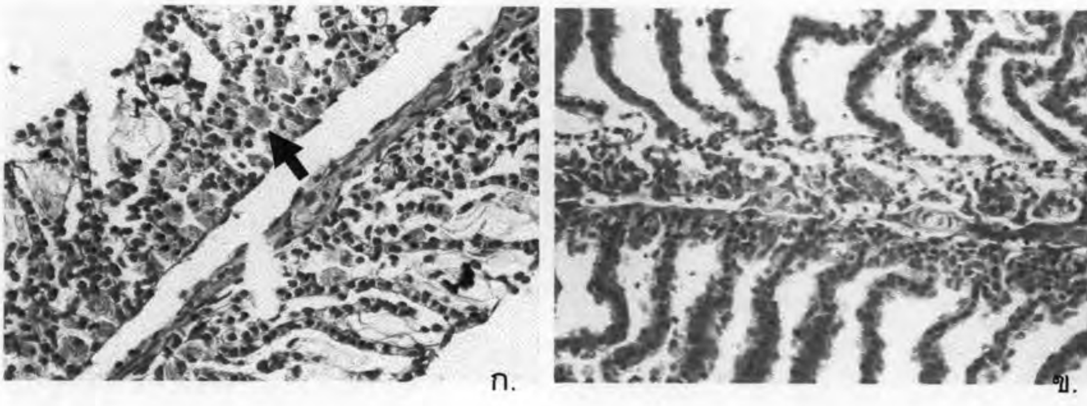
รูปที่ 4.4 รูปทางจุลพยาธิวิทยาของไตปลาที่ตายจากการได้รับสารสกัดใบฝรั่ง (ก) และกลุ่มควบคุม (ข) (x400)

3) หัวใจ: รูปทางจุลพยาธิในหัวใจของปลาคาร์พที่ใช้สารสกัดใบฝรั่ง 1600 พีพีเอ็ม ไม่พบการเสื่อมสภาพของกล้ามเนื้อหัวใจ และไขมันโดยรอบกล้ามเนื้อหัวใจ ไม่พบการคั่งเลือดของกล้ามเนื้อหัวใจ และหลอดเลือด รวมทั้งการสะสมของเซลล์อักเสบ (รูปที่ 4.5 ก.) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.5 ข.)



รูปที่ 4.5 รูปทางจุลพยาธิวิทยาของหัวใจปลาที่ตายจากการได้รับสารสกัดใบฝรั่ง (ก) และกลุ่มควบคุม (ข) (x400)

4) เหงือก: รูปทางจุลพยาธิวิทยาของเหงือกมีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนในกลุ่มที่สัมผัสสารสกัดใบฝรั่งที่ 1600 พีพีเอ็ม โดยพบการบวมน้ำอย่างรุนแรง และการคั่งเลือดในซี่เหงือกปฐมภูมิและทุติยภูมิ มีการสะสมของเซลล์ที่มีแกรนูลติดสีแดง (eosinophilic granules cells ลูกศร) จำนวนมากในบริเวณเนื้อเยื่อระหว่างซี่เหงือก (gill stroma) เกิดการหนาตัว (hyperplasia) และเชื่อมติดกัน (fusion) ของซี่เหงือกทุติยภูมิ (รูปที่ 4.6 ก.) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.6 ข.)



รูปที่ 4.6 รูปทางจุลพยาธิวิทยาของเหงือกปลาที่ตายจากการได้รับสารสกัดใบฝรั่ง (ก) และกลุ่มควบคุม (ข) (x400)

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบอาการ ลักษณะมหพยาธิ และจุลพยาธิวิทยาของปลาคาร์พที่ตายจากการจุ่มในน้ำเลี้ยงปลาผสมสารสกัดใบฝรั่งเข้มข้น 1600 พีพีเอ็ม

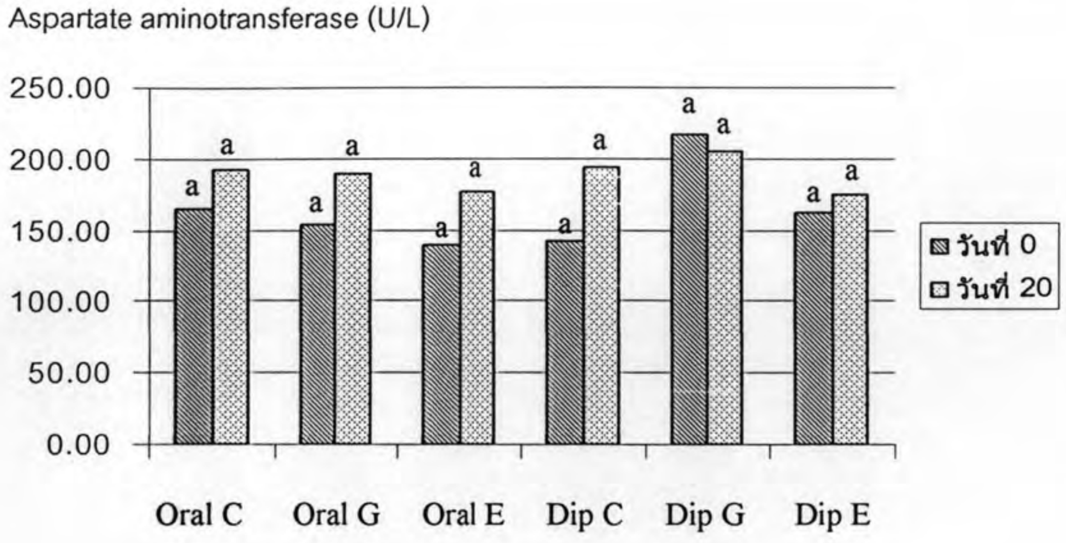
กลุ่ม / ลักษณะ	กลุ่มที่อยู่ในน้ำเลี้ยงปกติ หรือกลุ่มควบคุม	กลุ่มที่ตายจากการจุ่มในน้ำเลี้ยงปลาผสมสารสกัดใบฝรั่งเข้มข้น 1600 พีพีเอ็ม
อาการ	อาการปกติ	หลังจากใส่สารสกัด 2 นาที ปลาเริ่มมีอาการกระวนกระวายอย่างชัดเจน อ้าปากถี่และกว้าง แผ่นเหงือกขยับเร็วขึ้น เริ่มลอยตะแคง และนอนก้นตู้ ที่ 6 นาที ต่อมาปลาเริ่มหายใจถี่ลดลง ไม่ตอบสนองต่อการจับบังคับ และหยุดหายใจที่ 8 นาที
ลักษณะมหพยาธิ	ไม่พบลักษณะผิดปกติ	ปลามีการขับเมือกมาก แผ่นเหงือกมีสีคล้ำ มีเมือกเหนียวสีน้ำตาลเกาะตามแผ่นเหงือก
จุลพยาธิวิทยา	ไม่พบลักษณะผิดปกติในตับ ไต หัวใจ และเหงือก	มีการคั่งเลือด มีการสะสมของเซลล์อักเสบ มีการหนาตัวขึ้น บวมน้ำ และการเชื่อมติดกันของซี่เหงือกทุติยภูมิ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนที่ ตับ ไต และหัวใจ

<u>ส่วนที่ 4 การศึกษาผลของสารสกัดใบฝรั่งต่อปลาคาร์พที่ไม่ฉีดเชื้อ</u> *(in vivo)*

4.4.1 ผลของค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีในโลหิต และสภาพภูมิคุ้มกัน

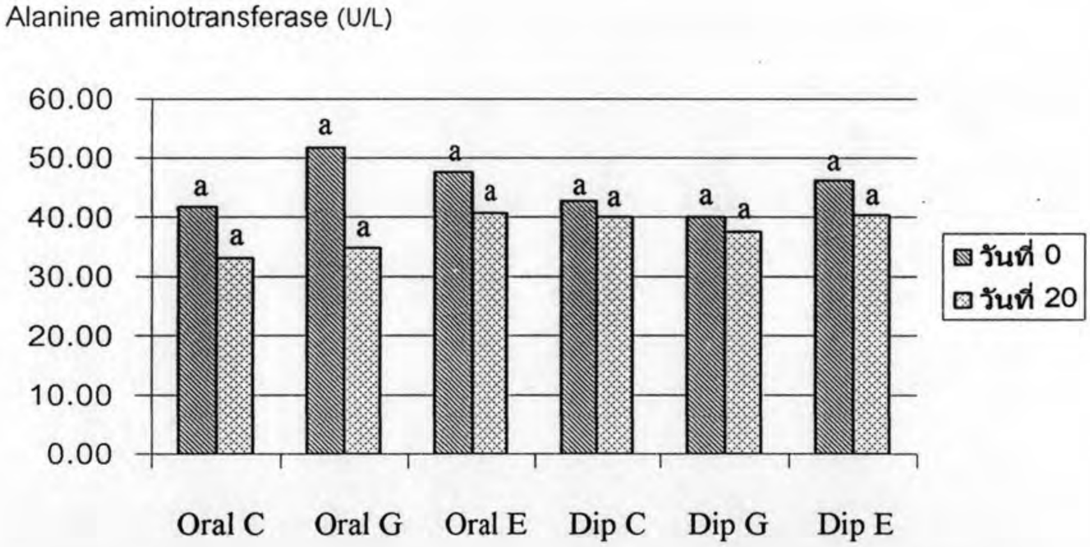
ค่าชีวเคมีโลหิตและโลหิตวิทยา ในแต่ละกลุ่มพบว่า ทุกกลุ่มมีค่า AST ALT ระดับน้ำตาลในเลือด และระดับโปรตีนในพลาสม่า รวมทั้งค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด และฮีโมโกลบิน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ทั้งระหว่างวันที่ 0 และ 20 ของการทดลอง และระหว่างกลุ่มการทดลอง ดังแสดงในรูป 4.7 ก.- ซ. (ตารางข้อมูล ดูในภาคผนวก ซ.1)

ผลค่าความสามารถในการกินเชื้อแบคทีเรียของเม็ดเลือดขาว (phagocytic ability) และ Chemotaxic activity ในเลือด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวันที่ 0 และ 20 ของการทดลอง พบว่า ค่าความสามารถในการกินเชื้อแบคทีเรียของเม็ดเลือดขาว และ Chemotaxic activity ในเลือดในวันที่ 20 ของกลุ่ม Oral G ที่ให้กินอาหารคลุกสารสกัดใบฝรั่ง ร้อยละ 5.3 มีค่า 25.00 และ 48.33% ตามลำดับ มีค่าที่สูงขึ้นกว่าวันที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 19.13 และ 36.30% ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับกลุ่ม Dip G ที่จุ่มปลาด้วยสารสกัดใบฝรั่งขนาด 1600 พีพีเอ็ม นาน 1 นาที ทุกวัน มีค่าการกินเชื้อแบคทีเรียของแมคโครฟาจ และ Chemotaxic activity ในเลือดในวันที่ 20 มีค่า 24.60 และ 45.4% ตามลำดับ มีค่าที่สูงขึ้นกว่าวันที่ 0 คือ 19.43 และ 33.77% ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มอื่นที่ไม่พบความแตกต่างของค่าทั้งสอง ดังแสดงในรูป 4.7 ฌ และ ญ (ตารางข้อมูล ดูในภาคผนวก ซ.1)



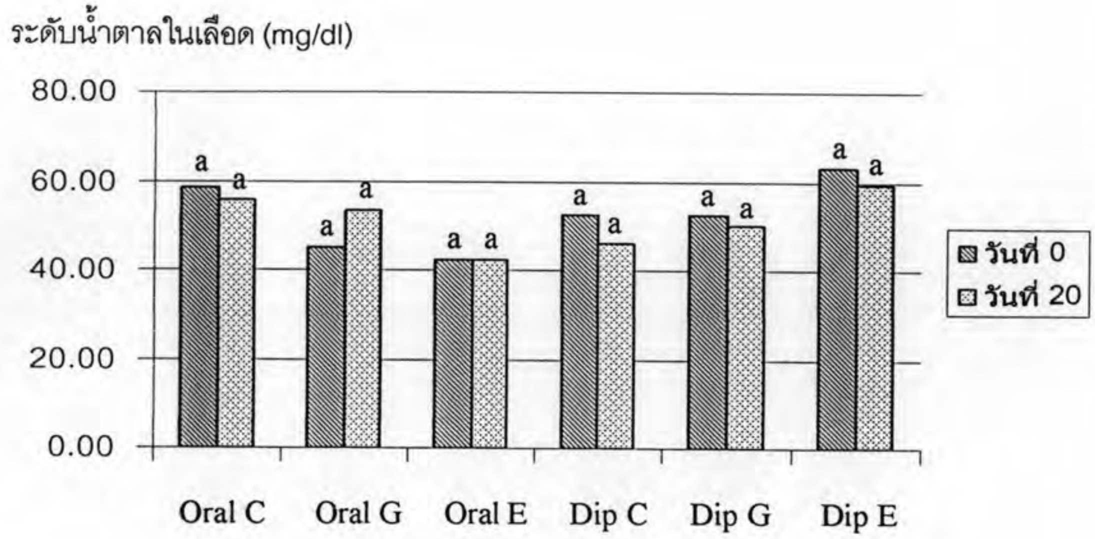
a,b ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.7 ก. ค่าการทำงานของเอนไซม์ Aspartate aminotransferase (U/L) **ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ**



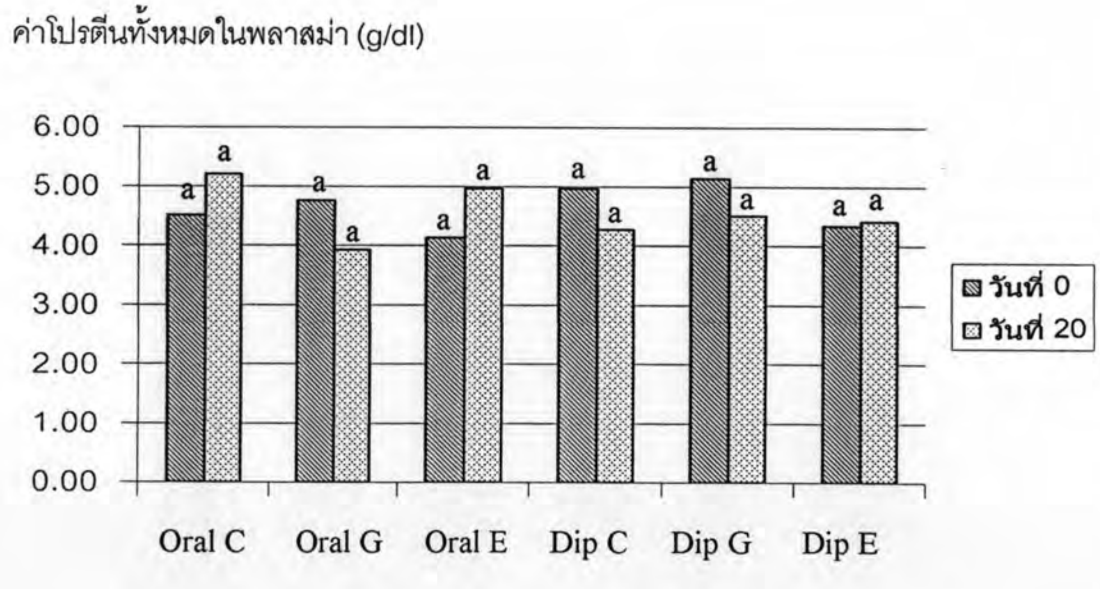
a,b ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.7 ข. ค่าการทำงานของเอนไซม์ Alanine aminotransferase (U/L) **ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ**



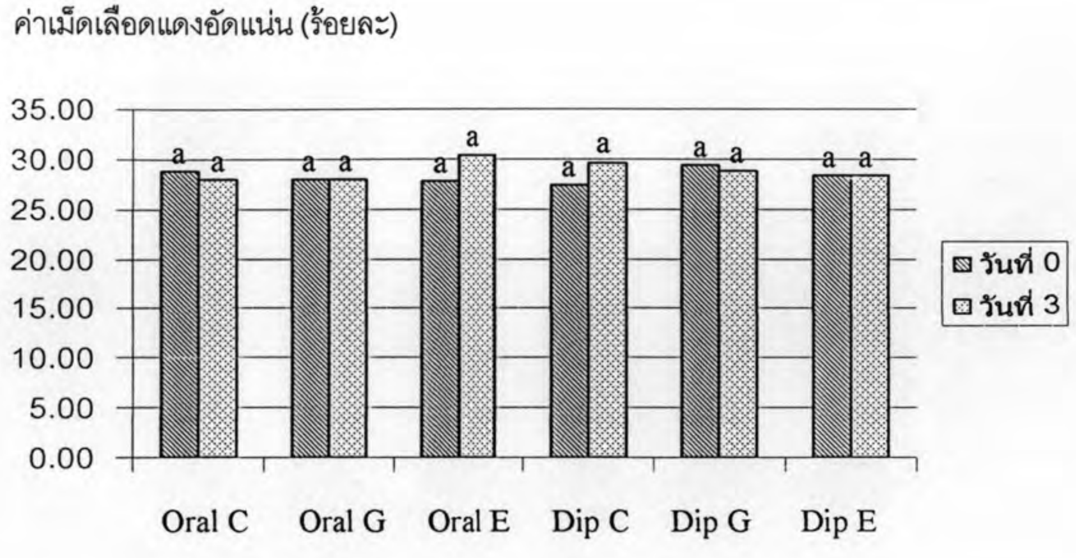
a,b ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.7 ค. ระดับน้ำตาลในเลือด (mg/dl) ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ



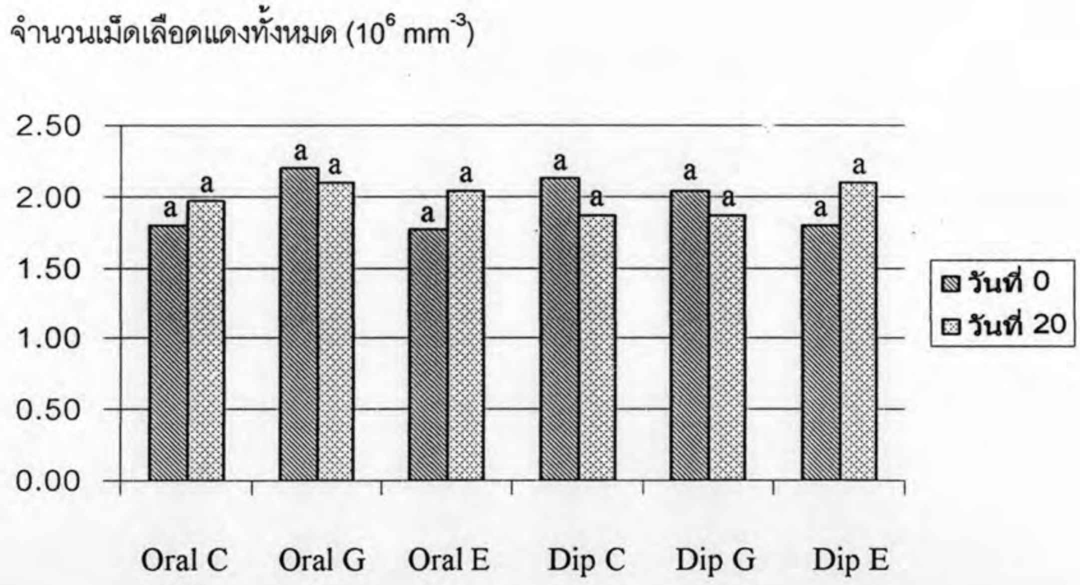
a,b ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.7 ง. ค่าโปรตีนทั้งหมดในพลาสม่า (g/dl) ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ



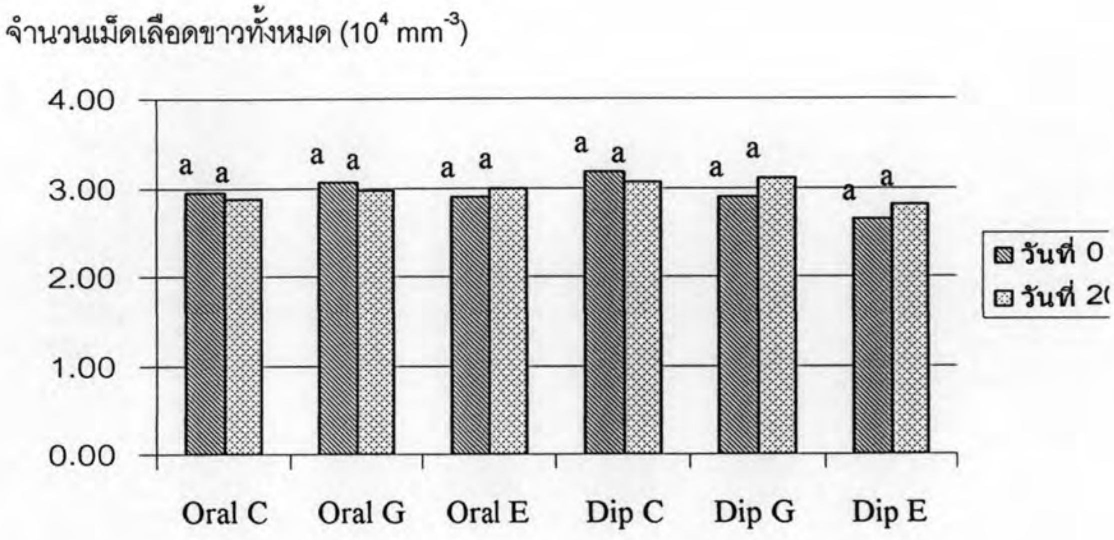
a,b ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.7 จ. ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (ร้อยละ) ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ



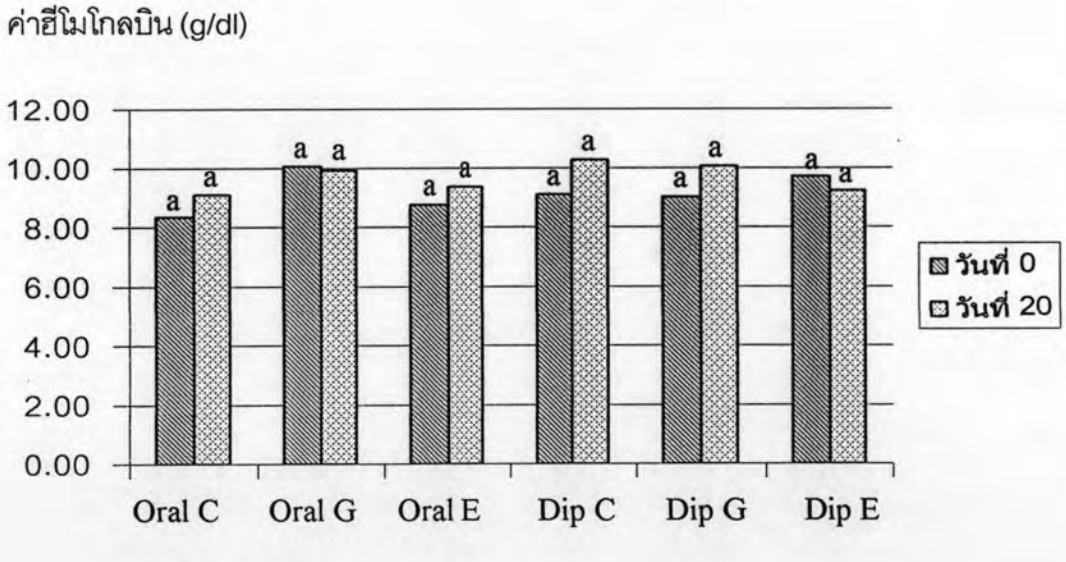
a,b ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.7 ฉ. จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด (10^6 mm^{-3}) ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ



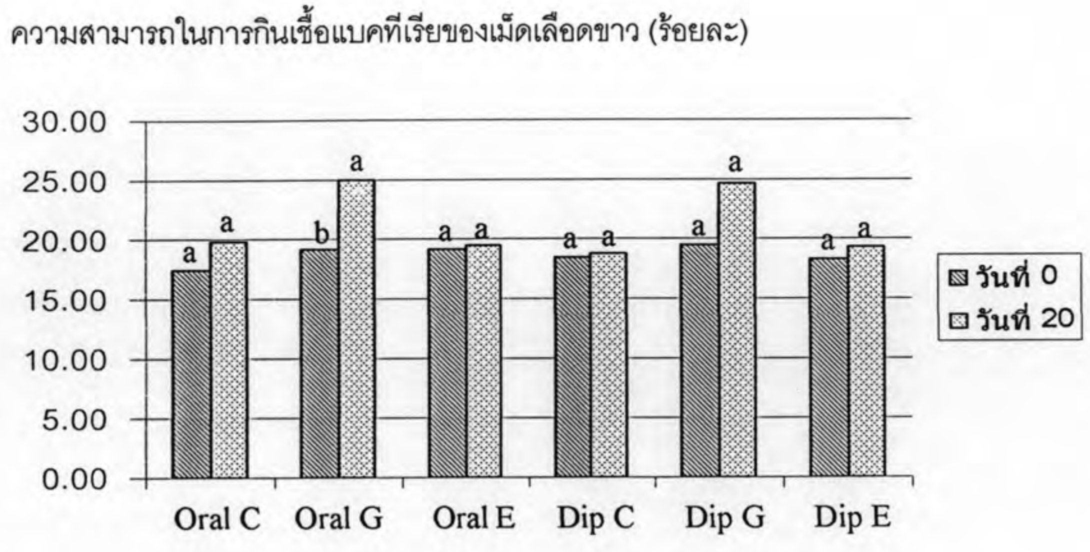
a,b ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.7 ช. จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (10^4 mm^{-3}) ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ



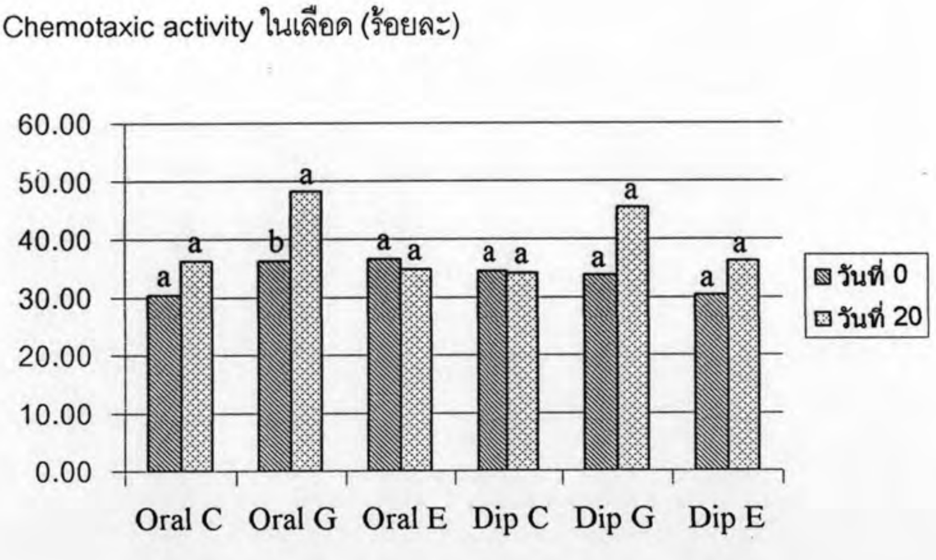
a,b ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.7 ซ. ค่าฮีโมโกลบิน (g/dl) ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ



a,b ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.7 ฌ. ร้อยละความสามารถในการกินเชื้อแบคทีเรียของเม็ดเลือดขาว ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ



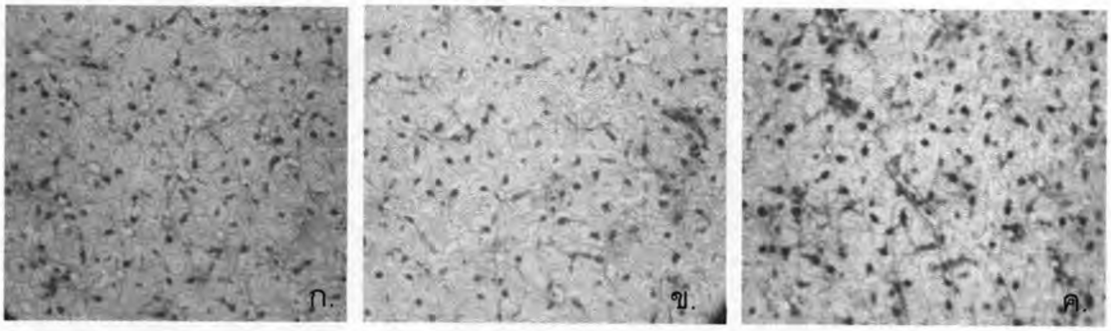
a,b ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.7 ญ. ร้อยละChemotaxic activity ในเลือด ในปลาที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ

4.4.2 ผลจุลพยาธิของอวัยวะภายในปลาคาร์พที่ไม่ฉีดเชื้อและได้รับสารสกัดใบฝรั่ง เมื่อครบระยะเวลา 20

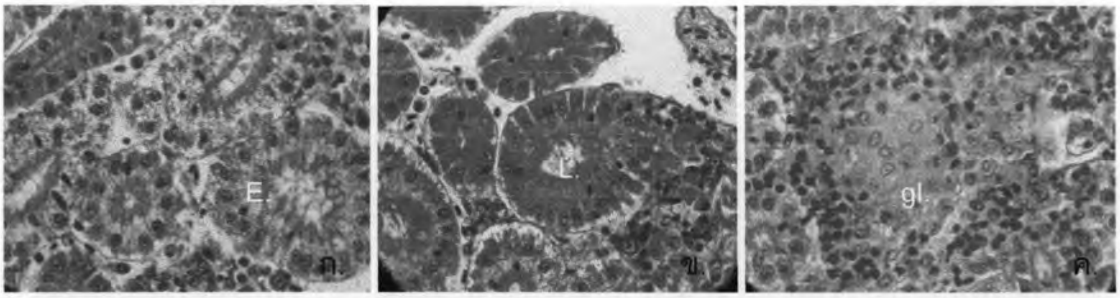
จากผลการทดลองศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของปลาที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่งเป็นเวลา 20 วัน พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคของ ตับ ไต หัวใจ ลำไส้ ผิวหนัง ลูกตา และเหงือก ในปลาคาร์พที่ได้รับการสกัดใบฝรั่งโดยการผสมอาหารร้อยละ 5.3 และโดยการจุ่มลงในสารสกัดใบฝรั่งที่ 1600 พีพีเอ็ม ที่วันสิ้นสุดการทดลอง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนี้

- **ตับ** : ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ตับ (hepatocyte) นิวเคลียสอยู่กลางเซลล์ ไซโตพลาสมติดสีชมพูอมม่วง พบการสะสมของไขมันและไกลโคเจน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด และการสะสมของเซลล์อักเสบ ของปลาที่ได้รับสารสกัดโดยการกิน และการจุ่ม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.8 ก-ค ตามลำดับ)



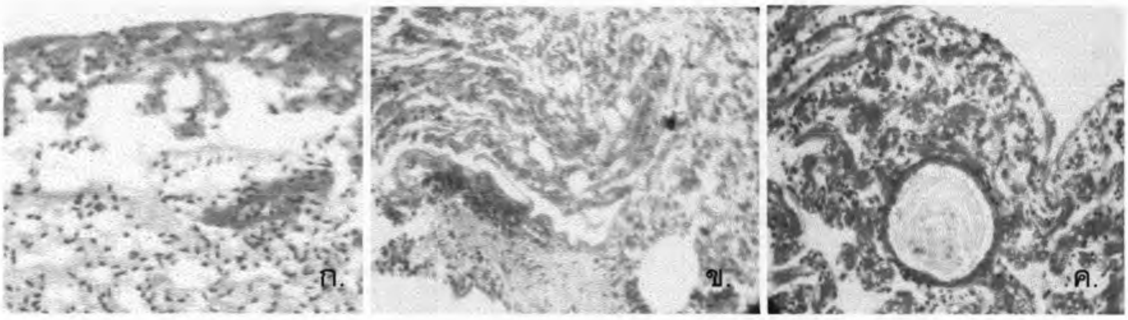
รูปที่ 4.8 รูปทางจุลพยาธิวิทยาของตับปลาที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่งโดยการกิน (ก) การจุ่ม (ข) และกลุ่มควบคุม (ค) (x400)

- **ไต** : ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของโกลโมลูรัส ช่องว่างระหว่างท่อไต และเยื่อบุเซลล์ของท่อไต รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด และเซลล์อักเสบ ของปลาที่ได้รับสารสกัดโดยการกิน และการจุ่ม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.9 ก-ค ตามลำดับ)



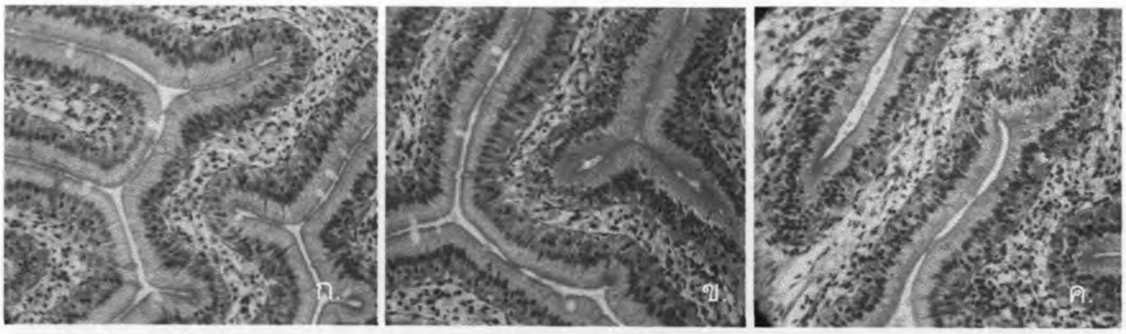
รูปที่ 4.9 รูปทางจุลพยาธิวิทยาของไตปลาที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่งโดยการกิน (ก) การจุ่ม (ข) และกลุ่มควบคุม (ค) (x1000) E = เยื่อบุเซลล์ของท่อไต L= รูท่อไต และ gl = โกลโมลูรัส

- **หัวใจ** : ไม่พบการเสื่อมสภาพของกล้ามเนื้อหัวใจ การคั่งเลือด และการสะสมของเซลล์อักเสบของปลาที่ได้รับสารสกัดโดยการกิน และการจุ่ม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.10 ก-ค ตามลำดับ)



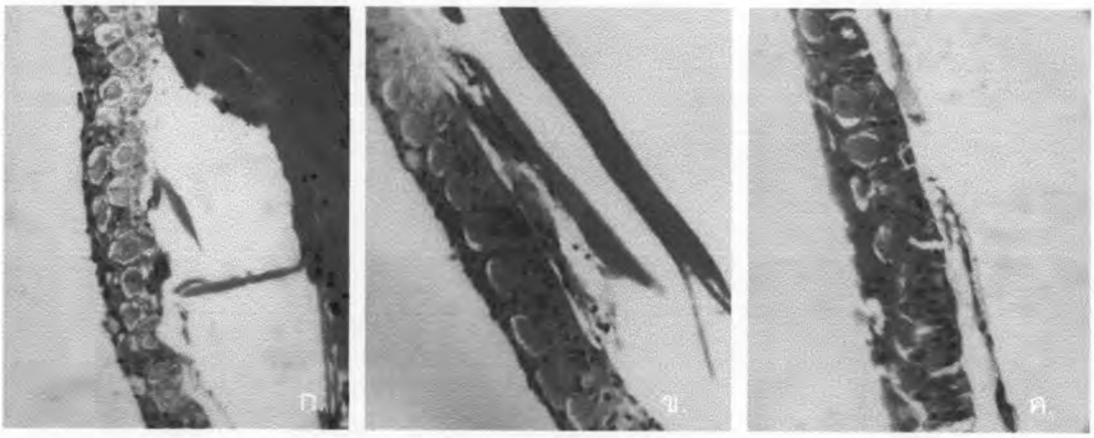
รูปที่ 4.10 รูปทางจุลพยาธิวิทยาของหัวใจปลาที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่งโดยการกิน (ก) การจุ่ม (ข) และกลุ่มควบคุม (ค) (x400)

- **ลำไส้เล็กส่วนต้น**: ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่เด่นชัดในเยื่อบุผนังลำไส้ชั้นนอก (serosa) และชั้นเยื่อบุผนังลำไส้ชั้นใน (mucosa) และกล้ามเนื้อต่างๆ ของปลาที่ได้รับสารสกัดโดยการกิน และการจุ่ม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.11 ก-ค ตามลำดับ)



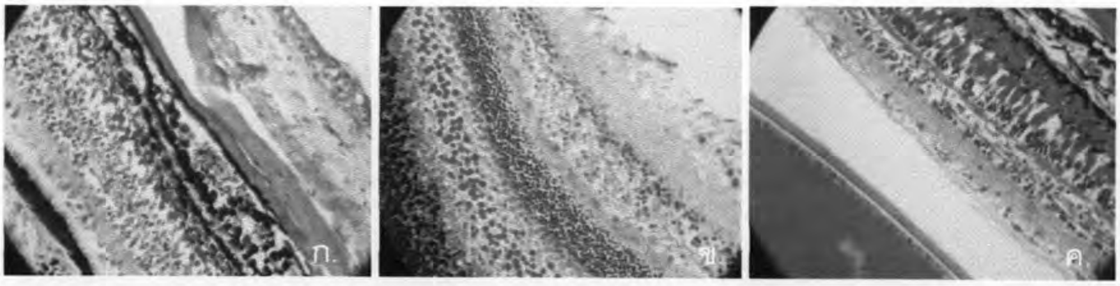
รูปที่ 4.11 รูปทางจุลพยาธิวิทยาของลำไส้เล็กตอนต้นปลาที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่งโดยการกิน (ก) การจุ่ม (ข) และกลุ่มควบคุม (ค) (x400)

- **ผิวหนัง**: ไม่พบความแตกต่างที่ผิวหนังชั้นนอก และชั้นใต้ผิวหนัง รวมทั้งการอักเสบ การคั่งเลือด การเพิ่มจำนวนของเซลล์เมือกไม่แตกต่างกันในปลาที่ได้รับสารสกัดโดยการกิน และการจุ่ม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.12 ก-ค ตามลำดับ)



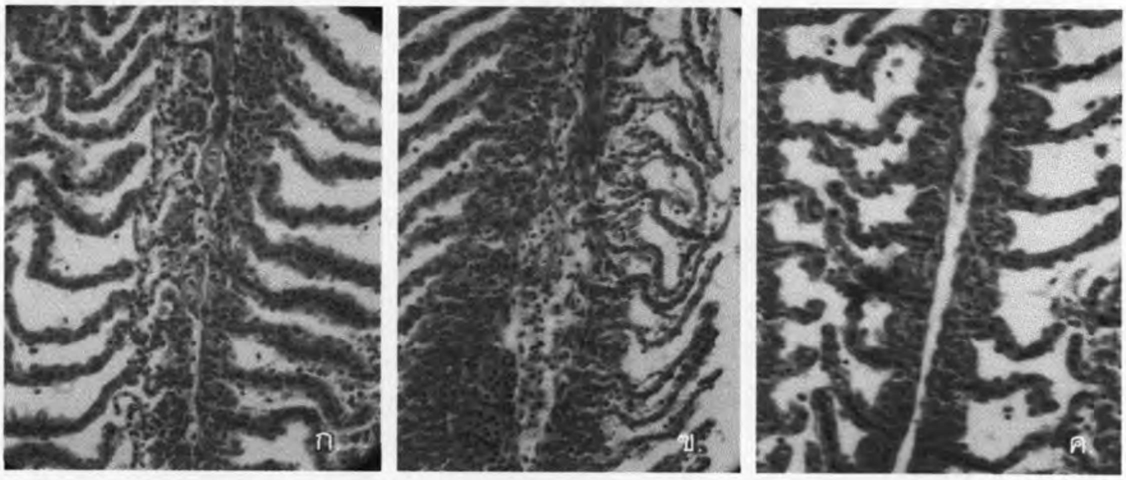
รูปที่ 4.12 รูปทางจุลพยาธิวิทยาของผิวหนังปลาที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่งโดยการกิน (ก) การจุ่ม (ข) และกลุ่มควบคุม (ค) (x1000)

- **ลูกตา**: ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของการเรียงตัวของเซลล์ รูปทรงของลูกตา กล้ามเนื้อ และพื้นผิวชั้นนอกของลูกตา รวมทั้งการคั่งเลือด และการสะสมของเซลล์อักเสบ ของปลาที่ได้รับสารสกัดโดยการกิน และการจุ่ม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.13 ก-ค ตามลำดับ)



รูปที่ 4.13 รูปทางจุลพยาธิวิทยาของลูกตาปลาที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่งโดยการกิน (ก) การจุ่ม (ข) และกลุ่มควบคุม (ค) (x400)

- **เหงือก** : ไม่พบความแตกต่างผลทางจุลพยาธิวิทยาของเหงือก ซี่เหงือกมีการหนาตัวเล็กน้อย แต่ไม่พบสะสมของเซลล์อักเสบ และการคั่งเลือด ของเนื้อเยื่อระหว่างซี่เหงือก ปฐมภูมิและทุติยภูมิ ของปลาที่ได้รับสารสกัดโดยการกิน และการจุ่ม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.14 ก-ค ตามลำดับ)

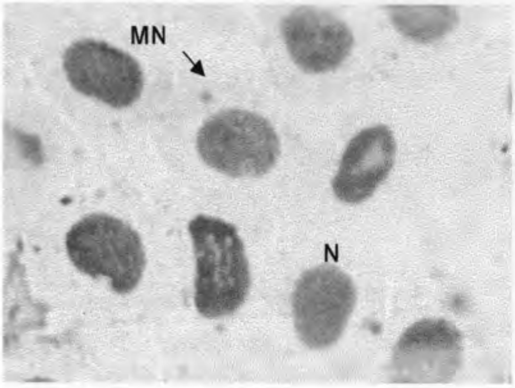


รูปที่ 4.14 รูปทางจุลพยาธิวิทยาของเหงือกปลาที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่งโดยการกิน (ก) การจุ่ม (ข) และกลุ่มควบคุม (ค) (x400)

4.4.3 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในเม็ดเลือดแดงของปลาคาร์พที่ไม่ฉีดเชื้อและได้รับสารสกัดใบฝรั่ง ในวันที่ 20

ผลการทดลองพิษต่อสารพันธุกรรมของปลาที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่งเป็นเวลา 20 วัน พบว่าในปลากลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่งโดยการผสมอาหารร้อยละ 5.3 และโดยการจุ่มลงในสารสกัดใบฝรั่งที่ 1600 พีพีเอ็ม พบ Micronucleus จากแผ่นเสมียร์เลือด 0-1 MN/1000 cell

ส่วนกลุ่มควบคุม (positive control) ที่ทำการฉีดสาร Mitomycin-C ขนาด 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักตัว ซึ่งสามารถพบ micronucleus ได้ จากกระจกสไลด์ป้ายเลือด 5-7 MN/1000 cell (รูปที่ 4.15)



รูปที่ 4.15 ลักษณะ Micronucleus ในเม็ดเลือดแดง (ลูกศร) ของปลาที่ฉีดสารไมโตไมซิน-ซี เข้าช่องท้อง (N= normal red blood cell)

<u>ส่วนที่ 5 ผลการศึกษาสารสกัดใบฝรั่งต่อปลาคาร์พที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*</u>

4.5.1 ผลของค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีในโลหิต และสภาพภูมิคุ้มกันในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

ผลค่าทางโลหิตวิทยา ค่าเคมีโลหิต ในแต่ละกลุ่มที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ที่ความเข้มข้น 1.0×10^5 cfu/ml ในวันที่ 0, 3, 10 และ 20 ของการทดลอง พบว่าทุกกลุ่มมีค่า Aspartate aminotransferase และ Alanine aminotransferase แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ยกเว้นค่า Alanine aminotransferase ของกลุ่ม Oral C มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยวันที่ 3 ของการทดลอง มีค่าสูงสุด (รูปที่ 4.16 ก. และ ข.)

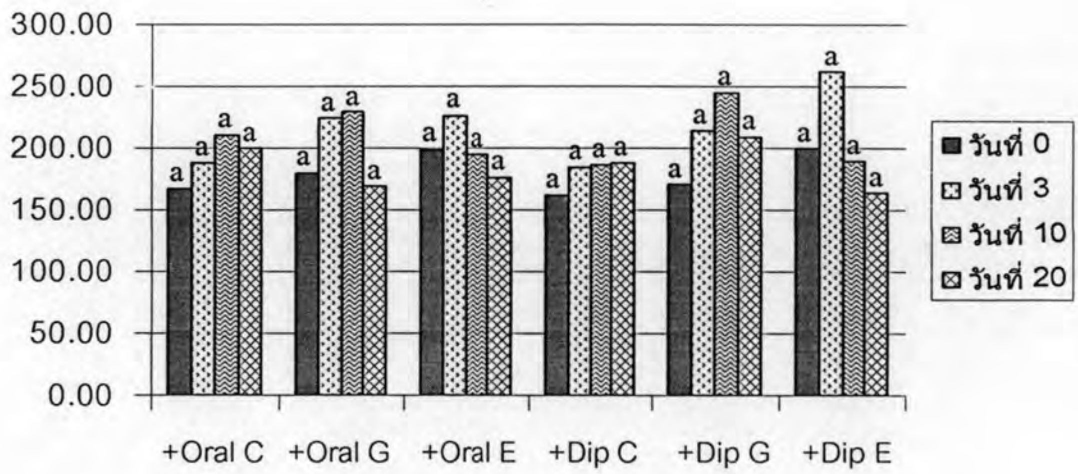
ระดับค่าระดับน้ำตาลในเลือด และ ระดับโปรตีนในพลาสม่า ของปลาในกลุ่ม Oral G, Oral E, Dip G และ Dip E มีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนระดับค่าระดับน้ำตาลในเลือดและ ระดับโปรตีนในพลาสม่าของปลาในกลุ่ม Oral C และ Dip C มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังรูปที่ 4.16 ค และ ง)

ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด ในกลุ่มที่ฉีดเชื้อและไม่ได้รับสารใดเลยทั้งแบบผสมอาหาร และแบบจุ่ม คือกลุ่ม Oral C ที่ให้กินอาหารปกติ และ กลุ่ม Dip C ที่จุ่มปลาด้วยน้ำเลี้ยงปลาปกติ นาน 1 นาที ทุกวัน มีแนวโน้มเริ่มลดลงที่วันที่ 3 ส่วนในกลุ่มอื่นๆ คือ กลุ่ม Oral G ที่ให้กินอาหารคลุกสารสกัดใบฝรั่งร้อยละ 5.3 กลุ่ม Oral E ที่ให้กินอาหารคลุกยาเอ็นโรฟอกซาซีน ระดับความเข้มข้น 0.017% กลุ่ม Dip G ที่จุ่มปลาด้วยสารสกัดใบฝรั่งขนาด 1600 พีพีเอ็ม นาน 1 นาที ทุกวัน และกลุ่ม Dip E ที่จุ่มปลาด้วยน้ำผสมยา enrofloxacin ระดับความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม นาน 1 นาที ทุกวันมีแนวโน้มคงที่ โดยแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ยกเว้นค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นในกลุ่ม Oral G มีค่าเพิ่มขึ้นแตกต่างจากวันที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญ (ดังรูปที่ 4.16 จ และ ฉ) เช่นเดียวกับค่าฮีโมโกลบินของกลุ่ม Oral C และกลุ่ม Dip C ซึ่งมีค่าลดลงในวันที่ 3 , 10 และ 20 เมื่อเทียบกับวันที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดของทุกกลุ่ม ในวันที่ 3 ของทุกกลุ่มการทดลอง มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับวันที่ 0 ($p<0.05$) ยกเว้นกลุ่ม Dip C ซึ่งมีค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดเพิ่มขึ้น แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ในวันที่ 10 และ 20 ในกลุ่มที่ฉีดเชื้อและไม่ได้รับสารใดเลยทั้งแบบผสมอาหาร และแบบจุ่ม คือกลุ่ม Oral C ที่ให้กินอาหารปกติ และ กลุ่ม Dip C ที่จุ่มปลาด้วยน้ำเลี้ยงปลาปกติ ยังคงมีค่าคงที่จากในวันที่ 3 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยที่ในกลุ่ม Oral E ที่ให้กินอาหารคลุกยา enrofloxacin ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.017% กลุ่ม Dip G ที่จุ่มปลาด้วยสารสกัดใบฝรั่งขนาด 1600 พีพีเอ็ม นาน 1 นาที ทุกวัน และกลุ่ม Dip E ที่จุ่มปลาด้วยน้ำผสมยา enrofloxacin ระดับความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม นาน 1 นาที มีค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดลดลงตั้งแต่ในวันที่ 10 ส่วนกลุ่ม Oral G ที่ให้กินอาหารคลุกสารสกัดใบฝรั่งร้อยละ 5.3 มีค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดลดลงในวันที่ 20 แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (รูปที่ 4.16 ช.)

ผลของค่าสภาพภูมิคุ้มกัน คือ ค่าความสามารถในการกินเชื้อแบคทีเรียของเม็ดเลือดขาว และ Chemotaxic activity ในเลือดของปลาคาร์พที่ฉีดเชื้อ พบว่าใน กลุ่ม Oral C ที่ให้กินอาหารปกติ และ กลุ่มที่ Dip C ที่จุ่มปลาด้วยน้ำเลี้ยงปลาปกติ นาน 1 นาที ทุกวัน มีค่าทั้งสองลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ในวันที่ 3 และ 10 ของการทดลอง เมื่อเทียบกับวันที่ 0 ส่วนในกลุ่มอื่นๆไม่พบความแตกต่างของค่าดังกล่าวระหว่างกลุ่ม และในแต่ละกลุ่มของวันที่ 0, 3, 10 และ 20 ยกเว้นค่า Chemotaxic activity ของกลุ่ม Oral E มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 10 ของการทดลอง (รูปที่ 4.16 ฌ และ ญ) ตารางข้อมูลดูในภาคผนวก ข.2

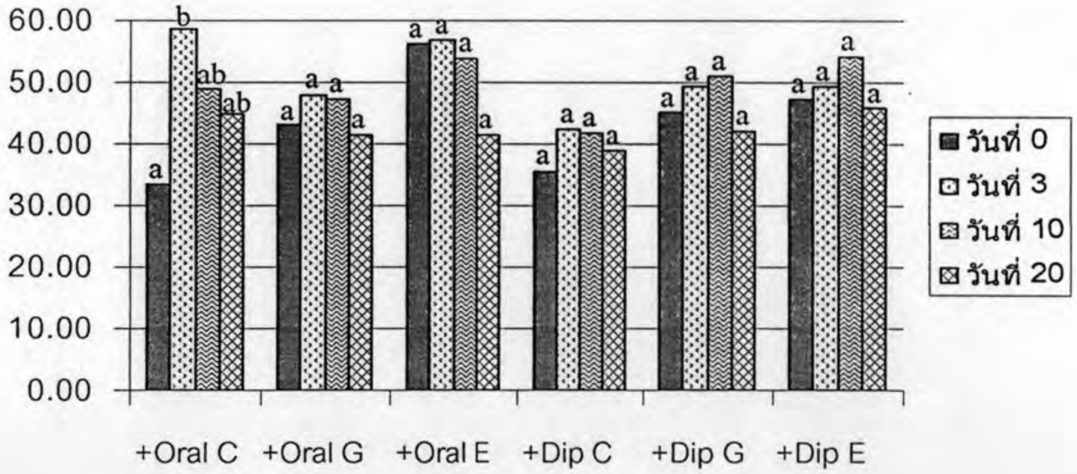
Aspartate aminotransferase (U/L)



a,b ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

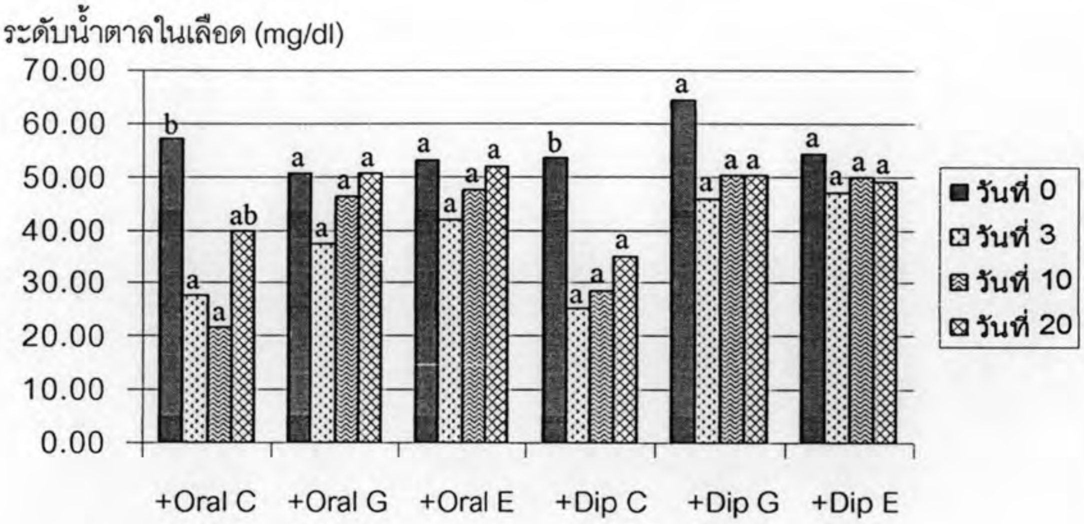
รูปที่ 4.16 ก. ค่าของเอนไซม์ Aspartate aminotransferase (U/L) **ในปลาที่ฉีดเชื้อ** *A. hydrophila*

Alanine aminotransferase (U/L)



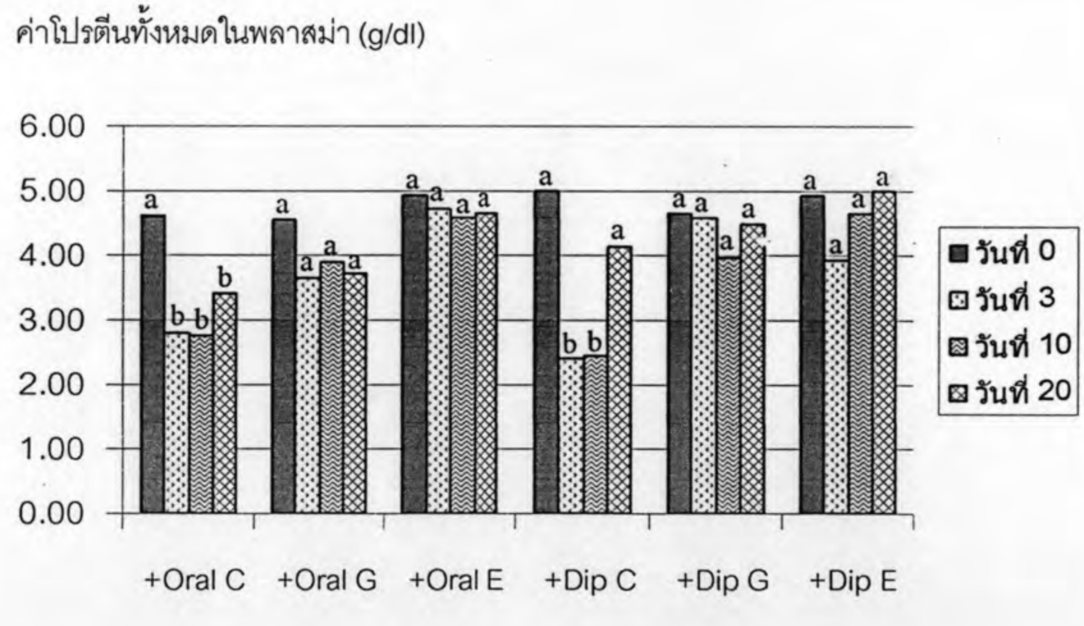
a,b ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.16 ข. ค่าของเอนไซม์ Alanine aminotransferase (U/L) **ในปลาที่ฉีดเชื้อ** *A. hydrophila*



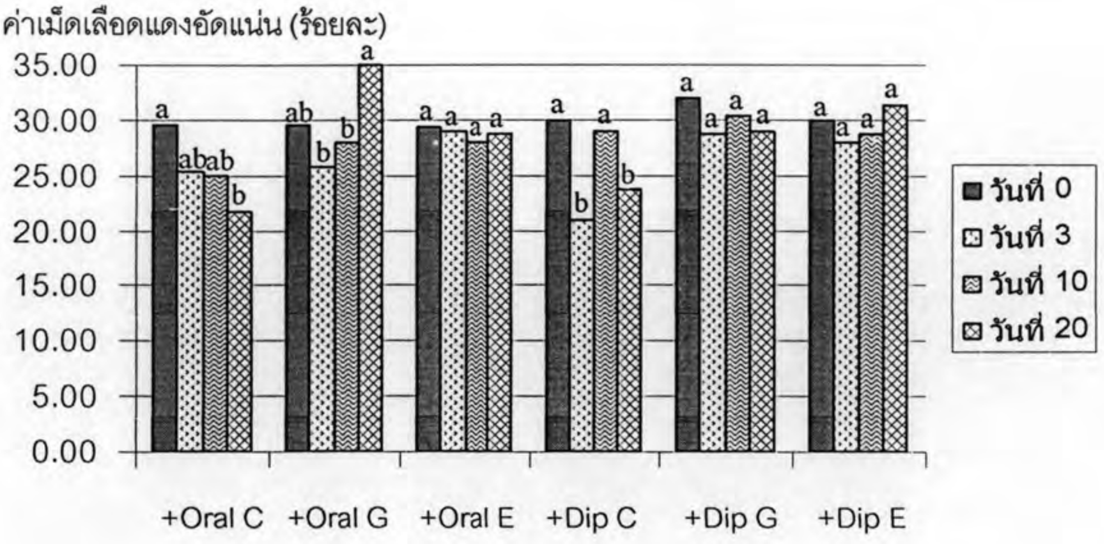
[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.16 ค. ระดับน้ำตาลในเลือด (mg/dl) ในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*



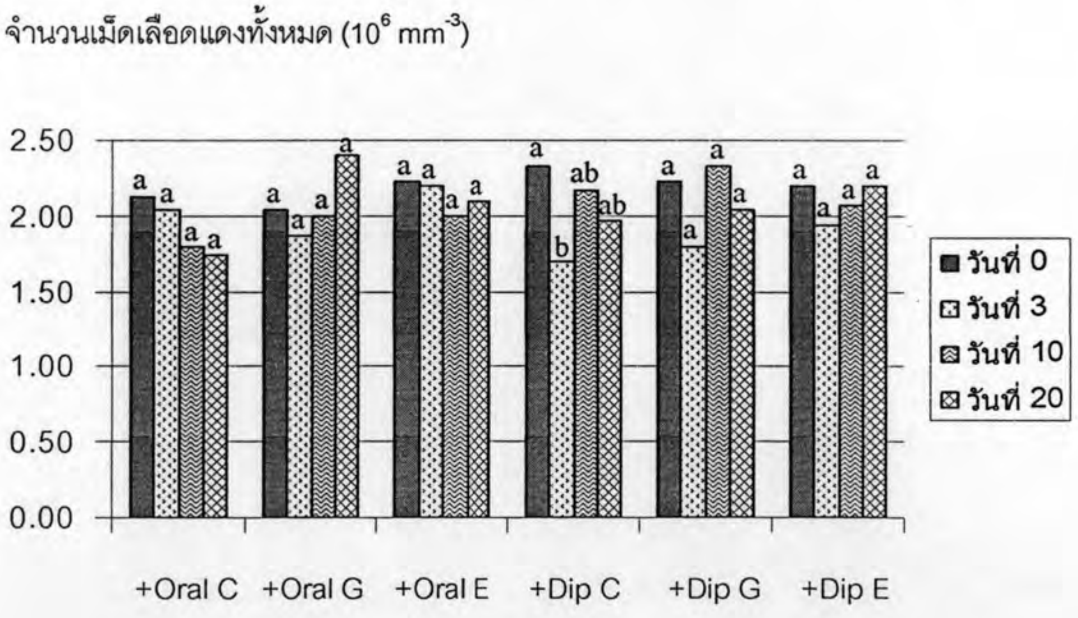
[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.16 ง. ค่าโปรตีนทั้งหมดในพลาสม่า (g/dl) ในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*



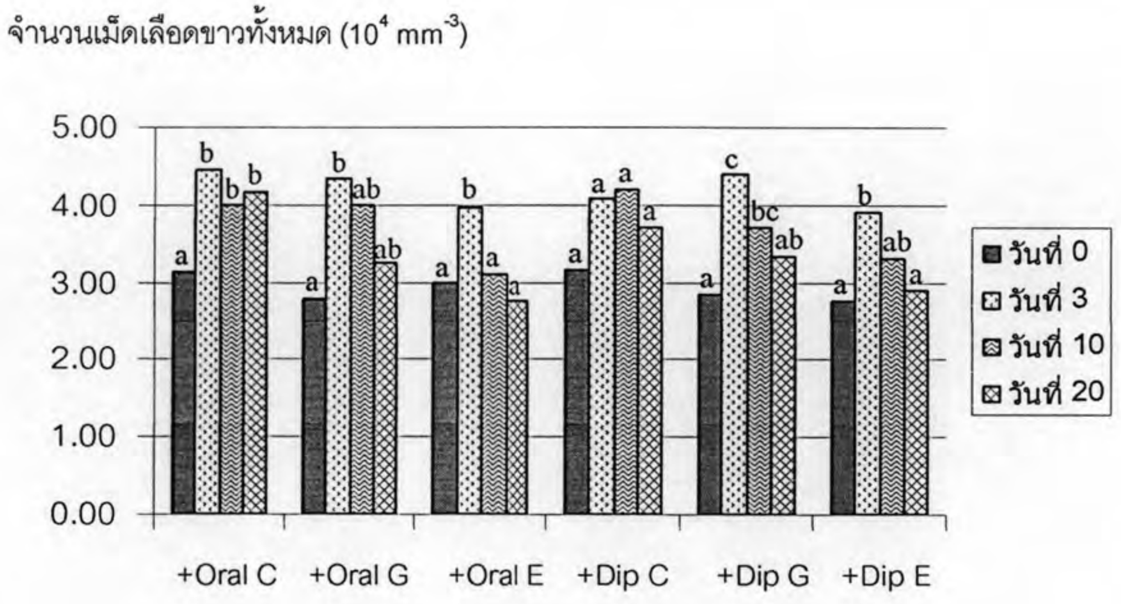
a,b ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.16 จ. ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (ร้อยละ) ในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*



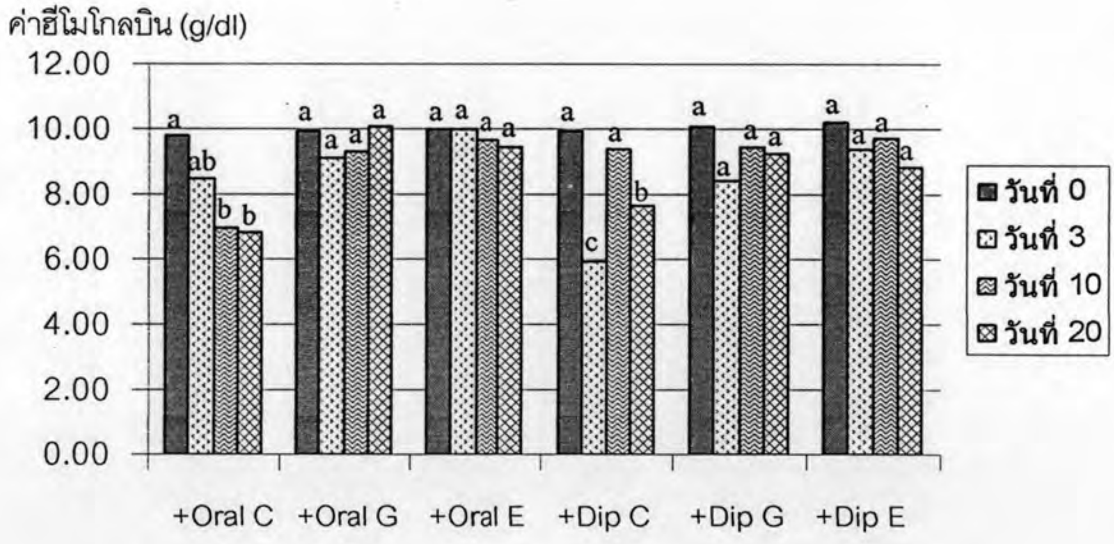
a,b ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.16 ฉ. จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด (10^6 mm^{-3}) ในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*



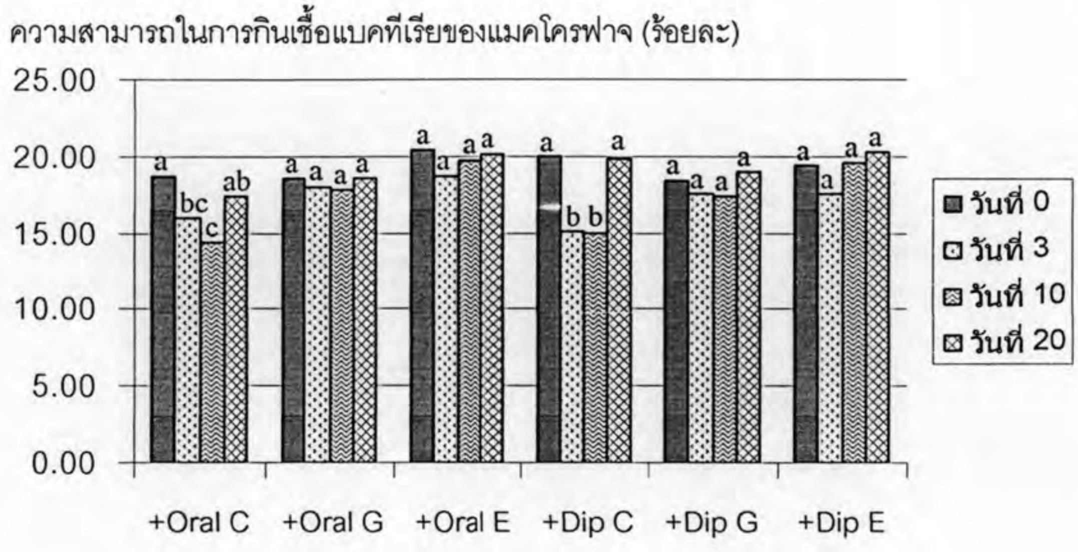
[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.16 ซ. จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (10^4 mm^{-3}) ในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*



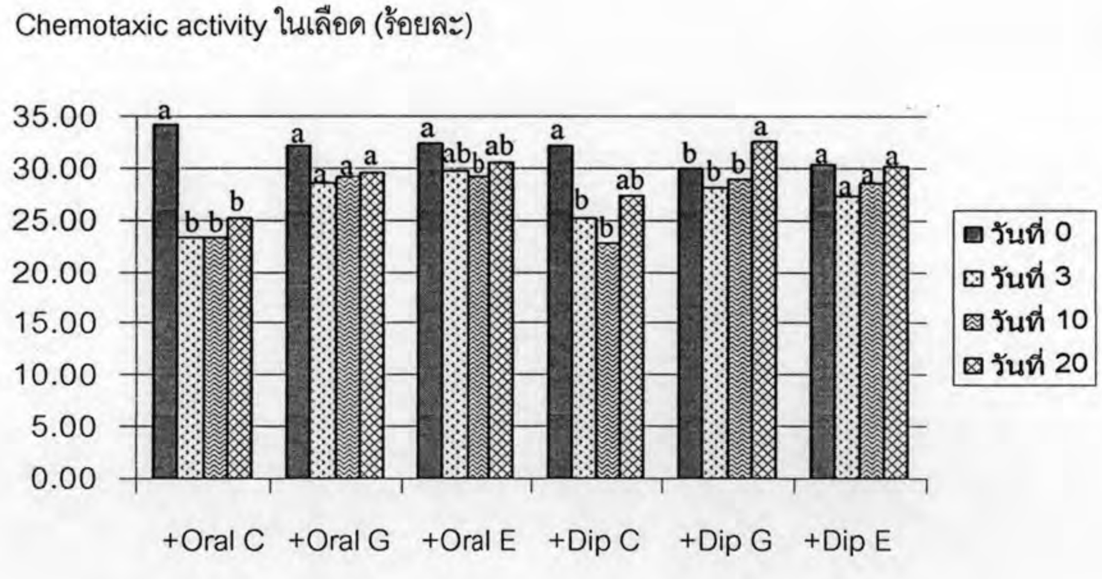
[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.16 ซ. ค่าฮีโมโกลบิน (g/dl) ในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*



a,b ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.16 ฌ. ร้อยละความสามารถในการกินเชื้อแบคทีเรียของแมคโครฟาจ ในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*



a,b ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$

รูปที่ 4.16 ญ. ร้อยละ Chemotaxic activity ในเลือด ในปลาที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

4.5.2 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์อัตราการตาย และความสัมพันธ์ในการรอดตายของปลาที่ติดเชื้อ (Relative percent survival, RPS)

ปลาคาร์พที่ได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* เข้าช่องท้อง ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 x 10^6 cfu/ml เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่ง ยาปฏิชีวนะ enrofloxacin ทางการกินและจุ่ม และกลุ่มควบคุม แล้วบันทึกอัตราการตายจนถึงวันที่ 20 ของการทดลอง พบว่า ร้อยละอัตราการตายของกลุ่มที่ได้รับสารโดยการกิน (กลุ่ม Oral C-G-E) มีอัตราการตายของกลุ่มที่ให้กินอาหารผสมสารสกัดใบฝรั่งมากที่สุด ซึ่งแตกตางอย่างไม่มีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ให้กินอาหารปกติ (ร้อยละ 70.0 และ 63.3) โดยที่กลุ่มที่ให้กินอาหารผสมยา enrofloxacin มีอัตราการตายน้อยที่สุด (ร้อยละ 36.7) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ Oral C และ Oral G ดังตารางที่ 4.6

ร้อยละอัตราการตายของกลุ่มที่ได้รับสารโดยการจุ่ม (กลุ่ม Dip C-G-E) มีอัตราการตายของกลุ่มที่จุ่มในน้ำเลี้ยงปกติมากที่สุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่จุ่มในน้ำผสมสารสกัดใบฝรั่งและกลุ่มที่จุ่มในน้ำผสมยา enrofloxacin ซึ่งมีอัตราการตายน้อยที่สุด (ร้อยละ 66.7, 43.3 และ 26.6 ตามลำดับ)

ความสัมพันธ์ในการรอดตายในกลุ่ม Dip E ที่จุ่มปลาในน้ำผสมยา enrofloxacin ระดับความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม นาน 1 นาที มีค่า ร้อยละRPS มากที่สุด รองลงมาคือ กลุ่ม Oral E กินอาหารคลุกยา enrofloxacin ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5 กลุ่ม Dip G จุ่มปลาด้วยสารสกัดใบฝรั่งขนาด 1600 พีพีเอ็ม 1 นาที ทุกวัน และกลุ่ม Oral G กินอาหารคลุกสารสกัดใบฝรั่งร้อยละ 5.3 ตามลำดับ (ร้อยละ 60.1 , 42.0, 35.1 และ -10.6 ตามลำดับ)

ตารางที่ 4.6 ร้อยละอัตราการตายและร้อยละความสัมพันธ์ในการรอดตาย (RPS) ของปลาคาร์พที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่ง ยา enrofloxacin และกลุ่มควบคุมที่ฉีดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ที่ความเข้มข้น 0.5 x 10^6 cfu/ml.

กลุ่ม	จำนวนเริ่มต้น	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ร้อยละอัตราการตาย	ร้อยละRPS
Oral C	30	7	5	7	63.3^{c}	0
Oral G	30	8	7	6	70.0^{c}	-10.6
Oral E	30	3	4	4	36.7^{ab}	42.0
Dip C	30	7	7	6	66.7^{c}	0
Dip G	30	3	5	5	43.3^{b}	35.1
Dip E	30	3	3	2	26.6^{a}	60.1

^{a,b,c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันหมายถึงข้อมูลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ