บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ผลการสกัดสารจากใบฝรั่ง พบ น้ำหนักรวมของสารสกัดหยาบที่สกัดโดยเอทานอลร้อยละ 95 คิดเป็นร้อยละ 6.32 (% yield) เมื่อเทียบกับน้ำหนักของผงใบฝรั่งแห้งตั้งต้น องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญต่อการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย คือ แทนนินรวม มีสัดส่วนคิดเป็นร้อยละ 46.17 โดยน้ำหนักของสารสกัด และพบองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ที่อยู่ในรูปน้ำมันหอมระเหย กรดไขมัน และอนุพันธุ์ของกรดไขมันหลายชนิด ด้วยวิธี GC/MS

การใช้สารสกัดใบฝรั่งที่ความเข้มข้น 800 พีพีเอ็ม (MIC) มีประสิทธิภาพในการใช้ต่อต้านเชื้อ *A. hydrophila* บนจานทดลอง เมื่อทดสอบด้วยวิธี Agar dilution plate เมื่อนำสารสกัดใบฝรั่งมาทดสอบความปลอดภัยก่อนการทดลอง พบว่าการให้อาหารผสมสารสกัดใบฝรั่งในขนาดสูงกว่าขนาดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ในจานทดลอง 4 เท่า และ 8 เท่า ไม่ทำให้ปลาตาย แต่ปลามีความอยากอาหารลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดใบฝรั่งในอาหารเพิ่มขึ้น และการจุ่มปลาในน้ำผสมสารสกัดใบฝรั่ง ที่ขนาด 2 เท่าของ MIC หรือ 1600 พีพีเอ็ม โดยแปรผันเวลา พบว่า เมื่อปลาสัมผัสกับน้ำละลายสารสกัดใบฝรั่งปลาจะมีอาการกระวนกระวาย นอนตะแคง ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นลดลง และทำให้มีการตายอย่างเฉียบพลัน โดยปลาที่ตายพบพยาธิสภาพรุนแรงที่เหงือก แต่ไม่พบความผิดปกติที่ชัดเจนในอวัยวะอื่นๆ เมื่อทำการตรวจคุณภาพน้ำของสารละลายผสมสารสกัด พบว่า ค่าที่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นได้แก่ ค่าซัลไฟด์ และฟอสเฟส ส่วนค่าที่มีการเปลี่ยนแปลงลดลง ได้แก่ ค่าความเป็นด่าง พีเอช และความกระด้าง โดยค่าแอมโมเนีย อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

การทดสอบการให้สารสกัดใบฝรั่งในปลาคาร์พที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ โดยตรวจสอบค่าทางชีวเคมีโลหิตวิทยา และสภาพภูมิคุ้มกัน เมื่อให้สารสกัดใบฝรั่งทั้งแบบผสมอาหาร และแบบจุ่ม ที่ขนาด 1600 พีพีเอ็ม พบว่า การได้รับสารสกัดใบฝรั่งทั้งสองรูปแบบ มีผลต่อการเพิ่มความสามารถในการกินเชื้อแบคทีเรียของเม็ดเลือดขาว (phagocytic ability) และ Chemotaxic activity ในเลือด โดยการให้สารสกัดใบฝรั่งผสมอาหารมีแนวโน้มในการเพิ่มภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่สูงกว่าแบบจุ่ม ในเวลา 20 วัน แต่ไม่ทำให้ค่าชีวเคมีในโลหิต และค่าทางโลหิตวิทยาอื่นๆเปลี่ยนแปลง และไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา และการเกิด micronucleus ในเม็ดเลือดแดง

การทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดใบฝรั่งในการต้านเชื้อ *A. hydrophila* ในปลาคาร์พที่ฉีดเชื้อเข้าช่องท้อง โดยการให้สารสกัดใบฝรั่งทั้งแบบผสมอาหาร และแบบจุ่ม ที่ขนาด 1600 พีพีเอ็ม พบว่า การให้สารสกัดแบบจุ่ม ให้ผลของค่าชีวเคมีในโลหิต โลหิตวิทยา และสภาพภูมิคุ้มกันหลังการติดเชื้อ ใกล้เคียงกับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่ไวต่อเชื้อ (enrofloxacin) และการให้สารสกัดแบบจุ่ม สามารถลดอัตราการตายสะสม หรือเพิ่มร้อยละความสัมพันธ์ในการรอดตายมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดเลย และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดผสมอาหารในเวลา 20 วัน ตามลำดับ แต่การให้สารสกัดใบฝรั่งแบบจุ่ม สามารถลดอัตราการตายสะสมหรือเพิ่มร้อยละความสัมพันธ์ ในการรอดตายได้แต่น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะที่ไวต่อเชื้อทั้งสองแบบ

5.2 อภิปรายผล

ในการเตรียมสารสกัดใบฝรั่งในการทดลองนี้เลือกใช้เอทานอลร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากสารละลายแอลกอฮอล์มีความสามารถในการสกัดสารได้ดี โดยเฉพาะแทนนิน อีกทั้งแอลกอฮอล์ยังช่วยป้องกันการแยกตัวของสารต่างๆ ในสารสกัดเมื่อตั้งทิ้งไว้นาน ซึ่งมักเกิดในกรณีที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547) นอกจากนี้ การสกัดด้วยสารละลายแอลกอฮอล์จะทำให้ได้สารในกลุ่ม saponin ซึ่งเป็นพิษต่อปลา น้อยกว่าการสกัดด้วยน้ำ (Tona *et al.*, 1998)

ปริมาณของสารสกัดใบฝรั่งที่ได้จากใบฝรั่งแห้งที่ป่นละเอียด เมื่อสกัดด้วยเอทานอลคิดเป็น ร้อยละ 6.32เมื่อเทียบกับน้ำหนักใบฝรั่งแห้งป่นตั้งต้น (การศึกษาส่วนที่ 1) ใกล้เคียงกับผลการทดลองของ สกลกิจ พันธะวงศ์ (2545) ที่ได้ร้อยละ 7.26 ในวิธีเดียวกัน แต่ต่างจากผลการศึกษาของ Olajide และคณะ (1999) ที่ได้สารสกัดจากการใช้เมทานอล คิดเป็นร้อยละ 13.2

สารสกัดใบฝรั่งในการทดลองที่ได้เมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณแทนนินรวม พบว่ามีสูงถึงร้อยละ 46.17 โดยน้ำหนัก ซึ่งสูงกว่าการรายงานของ เชนทร์ ผางนุย (2547) ที่พบว่าใบฝรั่งจะมีแทนนิน ประมาณร้อยละ 8-15 และ นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร (2542) ที่กล่าวว่าใบฝรั่งที่สมบูรณ์เต็มที่จะมีสารแทนนินอยู่ประมาณ ร้อยละ 8-10

สารสกัดใบฝรั่งในการทดลองที่ได้เมื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดขององค์ประกอบทางเคมี ด้วยวิธี GC/MS พบน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ Caryophyllene Calamenene, Globulol, aromadendren epoxide และ Isoaromadendren epoxide กรดไขมัน อนุพันธ์ของกรดไขมัน ได้แก่ Linoleic acid, n-Hexadecanoic acid, Oleic Acid, Octadecanoic acid และ c-Sitosterol วิตามิน และสารอื่น ได้แก่ วิตามิน E และ trans-Squalene โดยสารที่ได้เหล่านี้คล้ายคลึงกับการศึกษา Morton (1980) และ Osman และคณะ (1974) ที่รายงานว่าใบฝรั่ง

ประกอบด้วยองค์ประกอบทางเคมีหลักที่มีมากที่สุดคือ แทนนิน และ สารอื่นๆ ได้แก่ triterpenoids กลุ่มน้ำมันหอมระเหย คือ ß-sitosterol, ß-bisabolene, ß-caryophyllene, aromadendrene, ß-salinene, guaijaverine, nerolidiol และ sel-11-en-4α-ol ซึ่งคุณสมบัติการออกฤทธิ์โดยรวมของสารที่พบ ในสารสกัดใบฝรั่งในการศึกษานี้ จำแนกได้เป็น

- ฤทธิ์ระงับประสาท และทำให้หลับ (Neuroleptic) โดยมีสารออกฤทธิ์ คือ Caryophyllene ซึ่งเป็นน้ำมันหอมระเหยในกลุ่มเดียวกับ น้ำมันกานพลู (clove oil) และสามารถนำมาใช้ในการเป็นยาชาเฉพาะที่ (Local anesthesia) (Ghelardini *et al.*, 2001)
- ฤทธิ์ในการเพิ่ม หรือกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immune enhancer) โดยมีสารออกฤทธิ์ คือ Calamenene ซึ่งสามารถกระตุ้นการทำงานของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Takei *et al.*,2006)
- ฤทธิ์ในการลดอักเสบ (antiinflammations) โดยมีสารออกฤทธิ์ คือ c-Sitosterol ซึ่งเป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์ ที่มาจากพืช ให้ผลในการระงับการอักเสบ (Berges *et al.*, 1995)
- มีคุณค่าทางโภชนาการ (Enrich Nutrition) ได้แก่ กรดไขมัน Linoleic acid และ Oleic Acid กรดไขมันแบบอิ่มตัว n-Hexadecanoic acid หรือ palmitic และ Octadecanoic acid หรือ stearic รวมทั้งวิตามิน E ซึ่งมีประโยชน์ในทางโภชนาการต่อปลา เพื่อให้ปลามีสุขภาพร่างกายที่สมบูรณ์ และมีผลต่อความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันได้อย่างเหมาะสม (Kennedy and Stoskopf, 1993)
- มีคุณสมบัติในการต้านรังสี และอนุมูลอิสระ (antioxidants) โดยมีสารออกฤทธิ์ ได้แก่ วิตามิน E ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และ trans-Squalene ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารปกป้องรังสี (radioprotective) นิยมนำมาผสมในเครื่องสำอาง (Hayashi and Kishimura, 2003)

ซึ่งความแตกต่างของปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ ปริมาณแทนนิน และองค์ประกอบทางเคมีที่เกิดขึ้น สามารถเกิดได้จากแหล่งที่มาของวัตถุดิบ เทคนิคในขั้นตอน และเวลาในการสกัดที่แตกต่างกัน ทำให้สารสกัดที่ได้ความแตกต่างกัน (นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, 2542)

ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียในจานทดลอง (การศึกษาส่วนที่ 2) ด้วยวิธี Agar dilution พบว่าสารสกัดใบฝรั่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. hydrophila* ได้ที่ความเข้มข้น 800 พีพีเอ็ม ในขณะที่ Direkbusarakom และคณะ (1996) พบว่าใบฝรั่งที่ 5000-10,000 พีพีเอ็ม จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. hydrophila* ที่แยกจากปลาดุกได้ในจานทดลอง ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณของสารออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อ

แบคทีเรียในสารสกัดใบฝรั่งที่ได้มีความแตกต่างกัน โดยสารสกัดใบฝรั่งในการทดลองนี้มีค่าแทนนินรวมสูงถึง 46.17 โดยน้ำหนัก ซึ่งสูงกว่ารายงานอื่นๆ (เชนทร์ ผางนุย, 2547; นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, 2542) สารแทนนินเป็นตัวออกฤทธิ์ที่สำคัญ อันมีประสิทธิภาพในการต้าน และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ได้ดี (Chung *et al.*,1998; Cowan, 1999)

จากการทดลองเบื้องต้นในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด (การศึกษาส่วนที่ 3) โดยการนำสารสกัดใบฝรั่งผสมในอาหารที่ 2, 3 และ 4 เท่าของ MIC (5.3%, 8.0% และ10.6% ตามลำดับ) ปลาคาร์พที่กินอาหารผสมสารสกัดดังกล่าวไม่ตายเลย ภายในระยะเวลา 96 ชั่วโมง แต่ปลาจะกินอาหารผสมสารสกัดใบฝรั่งได้น้อยมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดที่ผสมเพิ่มขึ้น จนกระทั่งไม่กินอาหารเลย โดยสาเหตุที่ปลามีความอยากต่ออาหารน้อยลง อาจเกิดเนื่องจากที่สารสกัดใบฝรั่งมีสารแทนนินอยู่สูง (ร้อยละ 46.17 โดยน้ำหนัก) เนื่องจากแทนนินทำให้ความน่ากินของอาหาร (palatability) ลดลง และด้วยคุณสมบัติของ แทนนินในการตกตะกอนโปรตีน และมีการทำปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างแทนนิน และไกลโคโปรตีน (glycoprotein) จากน้ำลายของสัตว์ และเมื่อแทนนินจับกับไกลโคโปรตีนในน้ำลายของสัตว์ จะทำให้สัตว์มีความอยากอาหารลดลง (Giner-Chávez, 1966)

ในการทดลองเบื้องต้นในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด โดยการนำสารสกัดใบฝรั่งผสมน้ำจุ่มปลาที่ความเข้มข้น 1600 พีพีเอ็ม มาทดสอบการจุ่มปลาในระยะเวลาต่างๆกัน พบว่า หลังจากจุ่มปลาคาร์พในน้ำผสมสารสกัดใบฝรั่ง ปลาคาร์พมีอาการกระวนกระวายอย่างชัดเจน อ้าปากถี่กว้าง แผ่นเหงือกขยับเร็วขึ้น ว่ายน้ำอย่างไม่มีทิศทาง และลอยตัวตะแคงนิ่ง ปลาเริ่มหายใจถี่ลดลง ไม่ตอบสนองต่อการจับบังคับ แต่เมื่อนำมาใส่ในน้ำปกติ และให้อากาศเพียงพอ ปลาบางตัวสามารถฟื้นและกลับมามีอาการปกติได้ภายใน 15 นาที ซึ่งเป็นลักษณะคล้ายการสลบจากสารระงับประสาท โดยการศึกษาของ Shaheen *et al.*, (2000) ที่ทำการสกัดใบฝรั่งด้วย hexane, ethyl acetate และ methanol รายงานว่าได้สารสกัดที่มีฤทธิ์สงบประสาท (antinociceptive effect) ต่อการกระตุ้นด้วยสารเคมีและความร้อนในหนูทดลอง และสารสกัดดังกล่าวยังทำให้หนูทดลองหลับ (sedative) เหมือนกับการเหนี่ยวนำด้วยสาร pentobarbitone โดยระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงขึ้น จะเพิ่มความลึก และระยะเวลาของการหลับ อีกทั้งผลของอาการสลบในปลาคาร์พที่เกิดขึ้น ยังสอดคล้องกับการตรวจพบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบฝรั่ง ซึ่งพบว่ามีสาร Caryophyllene ในสัดส่วนร้อยละ 12.32 ซึ่งเป็นน้ำมันหอมระเหยชนิดหนึ่ง อยู่ในกลุ่มเดียวกับน้ำมันกานพลู (Martin *et al.*, 1993) ที่ใช้ในการสลบปลา

อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการจุ่มปลาตั้งแต่เวลา 6 นาที จะมีอาการเสียการทรงตัว ลอยตะแคง และนอนก้นตู้ แต่เมื่อนำปลากลับมาใส่น้ำเลี้ยงปกติ พบว่าปลากลับมามีอาการปกติได้ในเวลาประมาณ 15 นาที โดยปลาเริ่มตายที่ 6.5 นาที และตายหมดที่เวลา 8 นาที ดังนั้นระยะเวลาในการจุ่มมากที่สุดที่ไม่ทำให้ปลาคาร์พตายเลย คือที่ 6 นาที และระยะเวลาในการจุ่มน้อยที่สุดที่ทำให้ปลาคาร์พตายทั้งหมด คือ 8 นาที โดยปลาที่ตายพบลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาที่มีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ บริเวณซี่เหงือกมีการคั่งเลือด บวมน้ำอย่างรุนแรง และการสะสมเซลล์ Eosinophilic granular cells (EGCs) จำนวนมากในบริเวณเนื้อเยื่อระหว่างซี่เหงือก (gill stoma) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาผลของคลอรีนต่อปลาแฟนซีคาร์พ (กมลพร ทองอุไทย และคณะ, 2530) ที่พบว่า ซี่เหงือกของปลาที่แช่คลอรีนความเข้มข้น 0.2,0.3-0.4 และ 0.55-0.6 พีพีเอ็ม จะมีอาการบวมน้ำที่เหงือกรวมทั้งมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ฐานของตัวเหงือกจนทำให้ตัวเหงือกที่อยู่ใกล้เคียงกันเชื่อมติดกันและพบเซลล์ที่มีแกรนูลติดสีแดง (eosinophilic granule cells) ที่เซลล์เยื่อบุผิวของเหงือกเป็นจำนวนมากอย่างเห็นได้ชัด โดยปกติ eosionophilic granulue cell สามารถพบได้ในหลายเนื้อเยื่อของปลากระดูกแข็ง จากลักษณะของรูปร่างและตำแหน่งจึงถูกตั้งสมมติฐานว่ามีหน้าที่คล้ายกับ mast cell ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หรือ histaminogenic cell (Ellis, 1985) ซึ่งจัดเป็นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific defence mechanism) โดยมีเอนไซม์ alkaline phosphatase และ aryl sulfatase เหมือนที่มีใน mast cell ในการทำหน้าที่เกี่ยวกับ autolysis และ phagocytic activity เราสามารถพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Eosionophilic granule cell ทันทีหลังการกระตุ้นการอักเสบ (acute inflammatory effect) ซึ่งเซลล์ดังกล่าวจะมีผลต่อการเพิ่ม vascular permeability, chemotactic activity และกระบวนการ acute hypersensitivity (type I) เมื่อปลามีปรสิต หรือได้รับสารที่เป็นสิ่งแปลกปลอม (exotoxin) หรือทำให้เกิดภาวะช็อค โดยปลาจะมีอาการเปิดปิดแผ่นเหงือกเร็วขึ้น หุบอากาศที่ ผิวน้ำ เหงือกซีด ควบคุมการทรงตัวไม่ได้ ขับอุจจาระมากขึ้น และอาจทำให้ตาย (Huntman, 1995) ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของซี่เหงือกที่มีการหนาตัว (hyperplasia) และเชื่อมติดกันของซี่เหงือกทุติยภูมิบางส่วน ซึ่งเป็นผลมาจากการตอบสนองในการป้องกันตัวของร่างกาย (defense response) เพื่อลดจำนวนพื้นที่ในการสัมผัสกับสารที่เป็นอันตรายในน้ำ และหลั่งเมือกมากกว่าปกติเพื่อให้การสัมผัสกับสารพิษลดลง ลักษณะดังกล่าวมีรายงานในปลาที่อาศัยในสภาพแวดล้อมที่มีมลพิษ หรือมีปรสิตจำนวนมาก (Happaranta *et al.*, 1997) หรือเกิดจากการลดลงอย่างรวดเร็วของความเป็นกรดด่างอาจมีผลทำให้เกิดความล้มเหลวในการรับออกซิเจนของเนื้อเยื่อ จากการที่เซลล์เหงือกถูกทำลาย และตายจากการเปลี่ยนแปลงอย่างเฉียบพลัน (Bonga *et al.*, 1990) ความผิดปกติที่เกิดขึ้นในเซลล์เหงือกพบการขยายใหญ่และเพิ่มจำนวนมากผิดปกติของเซลล์บุผิว (hyperplasia) ทำให้เกิดการเชื่อมของซี่เหงือก การแยกตัวและ

โป่งบวมของเซลล์เยื่อบุผิวของซี่เหงือก ทำให้ระยะระหว่างเม็ดเลือดที่อยู่ในแอ่งเลือดและน้ำเพิ่มขึ้น เป็นสาเหตุให้ความสามารถในการรับออกซิเจนของปลาลดลง ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้เกิดได้ในปฏิกิริยาการตอบสนองต่อความระคายเคืองที่แตกต่างกัน เนื่องจากเหงือกเป็นอวัยวะที่ไม่เพียงแต่ทำหน้าที่ในการหายใจ แต่ยังช่วยในเรื่องของการควบคุมสมดุลของสาร (homeostatic activity) เช่นการสมดุลออสโมติก เมตาบอลิซึมของการขับสารไนโตรเจน และการควบคุมสมดุลกรดด่าง เมื่อเหงือก ถูกทำลายจึงทำให้ปลาเสียความสามารถในการควบคุมสมดุลของร่างกาย และเป็นสาเหตุที่ทำให้ปลาตายได้ (Happaranta *et al.*, 1997)

จากการศึกษาอวัยวะภายในของปลาคาร์พที่ได้สัมผัสกับสารสกัดใบฝรั่งไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอย่างชัดเจนในตับ ไต และ หัวใจ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการล้มเหลวของระบบหายใจและไหลเวียนเลือดอย่างเฉียบพลันก่อนที่สารสกัดใบฝรั่งจะมีผลต่อพยาธิสภาพของตับ ไต และ หัวใจ ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงถึงสาเหตุการตายของปลาคาร์พที่ได้สัมผัสกับสารสกัดใบฝรั่งเนื่องจากการล้มเหลวของระบบหายใจ ซึ่งอาจเกิดจากภาวะช็อค จากการได้รับสารสกัดใบฝรั่งที่เป็นสิ่งแปลกปลอมในความเข้มข้นสูง หรือมีความเป็นพิษ ส่งผลทำให้เกิดความล้มเหลวของระบบไหลเวียนเลือด โดยอาจเกิดเนื่องจากการสะสมของสารที่มีความเข้มข้นสูงบริเวณเหงือกที่เป็นอวัยวะที่สำคัญในการหายใจ สามารถขัดขวางกระบวนการแลกเปลี่ยนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนในระบบหมุนเวียนเลือด (Treves-Brown, 2000) ภาวะระบบหายใจล้มเหลวจึงเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ปลาตาย

เมื่อทำการตรวจคุณภาพน้ำของสารละลายผสมสารสกัด เพื่อวิเคราะห์ความน่าจะเป็นของการเปลี่ยนแปลงอันอาจก่อให้เกิดพิษ พบว่าค่าที่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นได้แก่ ค่าซัลไฟด์และฟอสเฟส ส่วนค่าที่มีการเปลี่ยนแปลงลดลง ได้แก่ ค่าพีเอช ความเป็นด่าง และความกระด้าง โดยค่าแอมโมเนีย อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งการเพิ่มขึ้นของค่าซัลไฟด์ และฟอสเฟส สามารถเกิดจากการที่สารสกัดใบฝรั่งมีปริมาณอินทรีย์ปนเปื้อนอยู่สูง (Boyd, 1990) ส่วนการลดลงของค่าพีเอช ความเป็นด่าง และความกระด้าง อาจเกิดเนื่องจากแทนนินที่มีอยู่สูงในสารสกัดใบฝรั่ง มีคุณสมบัติเป็นกรด และเป็นสารคีเลตที่ดี (Chung *et al.*, 1998) ทำให้สามารถจับกับสารที่มีประจุบวกของแคลเซียมไอออนในน้ำ ทำให้ค่าความเป็นด่าง และค่าความกระด้างที่เกิดจากแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ลดลงตามไปด้วย (Boyd, 1990) ซึ่งจะทำให้พบว่าเมื่อใส่สารสกัดลงไปในน้ำ จะทำให้เกิดฟองขึ้นได้มาก เนื่องจากการที่น้ำมีสภาพอินทรีย์สารมากขึ้น และความกระด้างลดลงจึงทำให้เกิดฟองได้ง่าย (Huguenin and Colt, 1989) อย่างไรก็ตามค่าคุณภาพเหล่านี้จัดว่าไม่ได้เปลี่ยนแปลงมาก หรือเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ทำให้เกิดความเป็นพิษ เนื่องจากทุกค่ายังอยู่ในช่วงที่ปลาทนได้ (Boyd, 1990)

เมื่อทำการทดลองให้สารสกัดใบฝรั่งในปลาคาร์พที่มีสุขภาพปกติ หรือไม่ได้ฉีดเชื้อ (การศึกษาส่วนที่ 4) พบว่า ปลาคาร์พที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่งทั้งโดยการกินและการจุ่มมีค่าความสามารถในการกินเชื้อแบคทีเรียของเม็ดเลือดขาว (phagocytic ability) และ Chemotaxic activity ในเลือดเพิ่มขึ้นในวันที่ 20 ของการทดลอง แต่ไม่มีผลต่อค่าโลหิตวิทยา และเคมีโลหิตอื่นๆ แสดงว่าสารสกัดใบฝรั่งทั้งแบบกิน และแบบจุ่มมีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เนื่องจากการวัดการตอบสนองทางระบบคุ้มกันในปลาคาร์พ สามารถเป็นตัวบ่งบอกถึงความต้านทานใน ตัวสัตว์ การตอบสนองทางระบบคุ้มกันในการต่อสู้กับเชื้อแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นในปลาที่มีภูมิต้านทานดี (Sahoo *et al.*, 2004) โดยค่าเปอร์เซ็นต์ของ phagocytosis ที่เพิ่มขึ้น แสดงถึงความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนอง การทำงานของ นิวโตรฟิว และแมคโครฟาจ โดยขบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมที่มากขึ้น (Roed *et al.*, 2002) และค่าเปอร์เซ็นต์ Chemotaxis ที่เพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเคลื่อนตัวของเม็ดเลือดขาวในการเข้าหา ยึดเกาะ และทำลายเชื้อโรคได้ดีขึ้น (Bradley *et al.*, 1994)

ผลการศึกษาทางจุลพยาธิของเนื้อเยื่อปลาคาร์พปกติที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่งเป็นเวลา 20 วัน ของทุกกลุ่มไม่พบการเปลี่ยนแปลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และไม่พบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม เมื่อทดสอบด้วยการหาไมโครนิวเคลียสเปรียบเทียบกับการให้สารไมโตไมซิน-ซี แสดงให้เห็นว่าการใช้สารสกัดใบฝรั่งไม่ทำให้เกิดความผิดปกติในการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงวัยอ่อน (Palhares and Grisolia, 2002) ซึ่งแตกต่างจากการรายงานของ เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ (2548) ที่กล่าวว่าสารในกลุ่มแทนนินในสมุนไพรมีความเป็นพิษต่อโครโมโซมและสามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษในตับและไตได้ ดังนั้นสารสกัดใบฝรั่งในระดับความเข้มข้นของการทดลองนี้ ค่อนข้างมีความปลอดภัยในการใช้ อย่างไรก็ตามการศึกษาพิษเรื้อรังยังควรต้องมีการศึกษาต่อไปในปลาเนื่องจากอาจให้ผลข้างเคียงเมื่อให้สารในระยะยาว เช่นในการทดลองของ เอมมนัส อัตตวิชญ์ และคณะ (2538) ซึ่งได้ทำการศึกษาถึงความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของสารสกัดใบฝรั่งที่มีต่อหนูทดลองพบว่าการป้อนสารสกัดใบฝรั่งขนาด 20 กรัม ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันต่อหนูทดลอง (ค่า LD_{50} มากกว่า 20 กรัมต่อ ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) และเมื่อทำการทดสอบถึงความเป็นพิษเรื้อรังเป็นระยะเวลา 6 เดือน กลับพบว่าสารสกัดใบฝรั่งดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับของหนูทดลองอย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตาม บังอร บัวคำไหล และคณะ (2547) ได้กล่าวว่าการใช้สมุนไพรฝรั่งระดับต่ำในช่วงระยะสั้นจะไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงใดๆ แต่หากใช้ในระยะเวลาที่นานขึ้นอาจมีผลตกค้างและก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ร่างกายได้

การทดลองให้สารสกัดใบฝรั่งในปลาคาร์พที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* (การศึกษาส่วนที่ 5) พบว่ากลุ่มปลาคาร์พที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ที่ไม่ได้รับสารใดๆ จะมีค่าระดับน้ำตาลในเลือด

ระดับโปรตีนในพลาสม่า รวมทั้งค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดลดลง ส่วนจำนวนเม็ดเลือดขาวรวมเพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดการจากการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิยาจากพยาธิสภาพของการติดเชื้อ (Harikrishnan *et al.*, 2003) โดยกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่งโดยการจุ่ม และยาปฏิชีวนะ enrofloxacin ทั้งแบบจุ่มและแบบกิน สามารถรักษาค่าระดับน้ำตาลในเลือด ระดับโปรตีนในพลาสม่า จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดคงที่ และจำนวนเม็ดเลือดขาวรวมลดลง ตั้งแต่ในวันที่ 10 ใกล้เคียงกับวันที่ 0 ของการทดลองได้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบฝรั่งสามารถรักษาพยาธิสภาพจากการติดเชื้อในปลาได้ แม้จะมีประสิทธิภาพที่ต่ำกว่าการให้ยาปฏิชีวนะ enrofloxacin ทั้งแบบกินและแบบจุ่ม อย่างไรก็ตามการให้สารสกัดใบฝรั่งในการทดลองนี้แตกต่างจากในการศึกษาส่วนที่ 4 ที่ทำในปลาไม่ฉีดเชื้อ คือ กลุ่มที่ให้สารสกัดใบฝรั่งทั้งแบบกิน และแบบจุ่มไม่สามารถเพิ่มค่าความสามารถในการกินเชื้อแบคทีเรียของเม็ดเลือดขาว และ Chemotaxic activity ในเลือดของปลาคาร์พที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเกิดจากความเครียดของปลาจากการติดเชื้อ ซึ่งความเครียดจะทำให้มีการส่งกระแสประสาทไปให้ต่อมใต้สมองหลั่ง adenocorticotropin (ACTH) ซึ่งมีผลต่อไปยังส่วนของ interrenal cell ให้มีการปล่อย corticosteroid อันมีอิทธิพลในเชิงลบต่อจำนวน และประสิทธิภาพการทำงานของเม็ดเลือดขาวในระบบไหลเวียนเลือด ทำให้เกิดการกดภูมิคุ้มกันตามมา (Kennedy and Stoskopf, 1993)

การให้สารสกัดใบฝรั่งในปลาคาร์พที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* สามารถลดอัตราการตายหรือเพิ่มร้อยละความสัมพันธ์ในการรอดตายได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใด โดยจะมีค่าร้อยละความสัมพันธ์ในการรอดตายมากที่สุดในปลาที่จุ่มด้วยน้ำผสม enrofloxacin ระดับความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม นาน 1 นาที รองลงมา คือ ปลาที่กินอาหารคลุก enrofloxacin ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.017 ซึ่งมีค่าร้อยละความสัมพันธ์ในการรอดตายมากกว่าการจุ่มด้วยสารสกัด ใบฝรั่งขนาด 1600 พีพีเอ็ม 1 นาที และกลุ่มที่ให้กินอาหารคลุกสารสกัดใบฝรั่งตามลำดับ ซึ่งการที่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่งแบบผสมน้ำจุ่มปลามีผลต่อการเพิ่มอัตราการรอดตาย ได้ดีกว่าการให้สารสกัดใบฝรั่งแบบผสมอาหาร มีปัจจัยให้พิจารณาได้หลายด้าน ได้แก่ การที่ปลากลุ่มที่ให้สารสกัดโดยการผสมอาหารไม่ได้รับสารอย่างต็มที่ เนื่องจากปลาที่ฉีดเชื้อมีการกินอาหารลดลง และแทนนินยังทำให้ความน่ากิน และความอยากอาหารของสัตว์ลดลงร่วมด้วย (Giner-Chávez, 1996) ทำให้ปลาได้รับปริมาณสารออกฤทธิ์ในการต้านจุลชีพไม่เพียงพอ และการที่ปลาไม่กินอาหาร หรือมีภาวะทุโภชนาการยังมีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันได้ ทำให้มีอัตรารอดต่อการติดเชื้อได้ต่ำ (Kennedy and Stoskopf, 1993) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มปลาที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่งโดยการจุ่มที่มีร้อยละความสัมพันธ์ในการรอดตายที่ดีกว่า เนื่องจากการจุ่มเป็นวิธีที่ทำให้ปลาได้รับสารที่แน่นอนกว่า เมื่อเวลาปลาป่วย หรือมีการติดเชื้อ (Noga, 2000) ทำให้ปลาสามารถรับสารสกัด

ใบฝรั่งที่มี แทนนิน ซึ่งมีฤทธิ์ในการต่อต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแคทีเรียได้ดี (Chung *et al.*, 1998, Mila *et al.*, 1996, Cowan, 1999, Scalbert, 1991)

5.3 ข้อเสนอแนะ

- ควรมีการศึกษาความคงตัวของปริมาณสารแทนนินที่มีอยู่ในสูตรอาหาร และในน้ำจุ่มภายหลังการนำสารสกัดมาใช้ผสม

- ควรทดสอบการให้สารสกัดใบฝรั่งก่อนการทำให้ติดเชื้อ เพื่อดูผลของภูมิคุ้มกันต่อการป้องกันโรค

- ควรทำการศึกษาการให้สารสกัดใบฝรั่งในระยะเวลาที่นานขึ้น เพื่อศึกษาผลต่อการเจริญเติบโต เนื่องจากใบฝรั่งในการทดลองนี้มีองค์ประกอบทางเคมีที่มีคุณค่าทางโภชนะสูง และผลของการให้สารสกัดใบฝรั่งต่อความเป็นพิษเรื้อรัง

- ศึกษาเทคนิคการสกัด และการวิเคราะห์ทางเคมี เพื่อนำใบฝรั่งไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอ เนื่องจากการเตรียมสารสกัดใบฝรั่งครั้งนี้ ใช้เอทานอลร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย ซึ่งนอกจากแทนนินแล้ว ยังมีสารอื่นๆ ที่สำคัญเป็นส่วนประกอบ

- ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ การตรวจสอบคุณภาพทางเคมี เพื่อสามารถนำใบฝรั่งไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอได้อย่างมีประสิทธิภาพ