ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลากัดและความเป็นพิษของสารสกัดใบหูกวางต่อปลากัด

Antibacterial Activity and Toxicity of Indian Almond (*Terminalia catappa*) Extract in Siamese Fighting Fish (*Betta splendens* Regan)

วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล[1] และ นนทวิทย์ อารีย์ชน[2]

Watchariya Purivirojkul [1] and Nontawith Areechon [2]

บทคัดย่อ

การศึกษาศักยภาพของสารสกัดใบหูกวางที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ เอทิลแอลกอฮอล์ 70% และ เอทิลแอลกอฮอล์ 95% ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย 7 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* sp., *Edwardsiella tarda, Plesiomonas shigelloides*, *Enterobacter* sp., *Streptococcus* sp. และ *Staphylococcus* sp. ที่พบในปลากัด ทดสอบโดยวิธี paper disc diffusion บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton agar (MHA) พบว่าสารสกัดใบหูกวางที่สกัดโดยใช้น้ำ และเอทิลแอลกอฮอล์ 70% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้สูงกว่าการใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นตัวทำละลาย การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบหูกวางที่สกัดโดยใช้น้ำ เอทิลแอลกอฮอล์ 70% และเอทิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นตัวทำละลายในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) มีค่าเท่ากับ 375-750, 375 และ 375-750 ppm ตามลำดับ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) มีค่า 1,500-3,000, 1,500 และ 1,500-3,000 ppm ตามลำดับ ส่วนค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดใบหูกวางที่ทำให้ลูกปลากัดตายครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) ที่ 24 ชั่วโมง มีค่า 2,200, 750 และ 880 ppm ตามลำดับ ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสกัดใบหูกวางเนื่องจากสามารถยับยั้งและกำจัดแบคทีเรียได้ดีและมีค่าความเป็นพิษต่อลูกปลากัดต่ำ

ABSTRACT

The potential of Indian Almond (*Terminalia catappa*) extract to control bacteria in Siamese Fighting Fish (*Betta splendens* Regan) namely *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* spp., *Edwardsiella tarda, Plesiomonas shigelloides*, *Enterobacter* spp., *Streptococcus* sp. and *Staphylococcus* sp. was studied. The efficacy test was conducted by Paper disc diffusion method on Muller Hinton agar (MHA). The experiment result revealed that Indian Almond extract by using water and ethyl alcohol 70% could inhibit growth of 7 strains of bacteria better than using ethyl alcohol 95%. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Indian Almond extract by using water, ethyl alcohol 70% and ethyl alcohol 95% were 375-750, 375 and 375-750 ppm, respectively. Minimal Bactericidal Concentration (MBC) were 1,500-3,000, 1,500 and 1,500-3,000, respectively. The 24 hours LC_{50} value were 2,200, 750 and 880 ppm, respectively. Finally, water was better solvent for extract Indian Almond because of high inhibition, bactericidal activity to pathogenic bacteria and low toxicity for young Siamese Fighting Fish.

[1] ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University

[2] ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กทม. 10900
Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University Jatujak Bangkok 10900

Key word : *Terminalia catappa*, antibacterial activity, Toxicity, Siamese Fighting Fish, *Betta splendens*
e-mail : fsciwyp@ku.ac.th

คำนำ

ปลากัด *Betta splendens* Regan เป็นปลาพื้นเมืองของประเทศไทย พบแพร่กระจายไปทั่วทุกภาคของประเทศ อาศัยอยู่ในอ่างเก็บน้ำ ทะเลสาบ หนอง บึง แอ่งน้ำ ลำคลอง (ธนากร, 2546) มีชื่อสามัญว่า Siamese Fighting Fish เป็นปลาสวยงามที่ได้รับความนิยมในการเลี้ยงมานาน เพื่อดูเล่นและเพื่อกีฬากัดปลา (ชาติ, 2542; ศุภชัย, 2544) ปัจจุบันประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงปลากัดอย่างแพร่หลายเนื่องจากเลี้ยงง่าย และยังเป็นปลาสวยงามชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการส่งออก โดยส่งไปยังประเทศต่าง ๆ ได้แก่สหรัฐอเมริกา ยุโรป ญี่ปุ่น และประเทศอื่น ๆ (สถาบันพัฒนาปลาสวยงามและพรรณไม้น้ำ, 2540) ในต่างประเทศ โดยเฉพาะสหรัฐอเมริกามีการตั้งสมาคมนานาชาติที่เกี่ยวข้องกับปลากัดคือ International Betta Congress (IBC) และสมาคม International Anabantoids Association เป็นต้น (ปัญญา, 2545)

การเกิดโรคในปลากัดนั้นโดยมากเกิดจากการสภาพแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ไม่เหมาะสมกับการดำรงชีวิตของมัน เช่น อุณหภูมิน้ำลดต่ำลง น้ำสกปรกจากการมีอาหารหมักหมมอยู่บริเวณพื้นน้ำซึ่งส่งผลให้เกิดสารพิษขึ้นในน้ำ ทำให้ปลาอ่อนแอติดเชื้อได้ง่าย (ศุภชัย, 2544) ในการเลี้ยงปลากัดนั้นเมื่อปลากัดเป็นแผลหรือแสดงอาการผิดปกติ นอกจากมีการใช้ยาและสารเคมีเพื่อรักษาโรคแล้ว บางครั้งผู้เลี้ยงปลากัดก็นำปลากัดมาแช่ในน้ำใบหูกวางนานประมาณ 10-15 วัน โดยให้กินอาหารทุกวัน หมักปลาจนผิวหรือเกล็ดเรียบเป็นเงามัน แล้วนำมาเลี้ยงในน้ำปกติ (ศุภชัย, 2544; ปัญญา, 2545) ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไปโดยที่ไม่ทราบเหตุผลว่าแท้จริงว่าใบหูกวางมีฤทธิ์ที่สามารถไปทำลายเชื้อแบคทีเรียหรือไม่ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีความสำคัญที่จะบอกได้ว่าแท้จริงแล้วสารสกัดใบหูกวางนั้นมีฤทธิ์ที่สามารถไปยับยั้ง หรือทำลายเชื้อแบคทีเรียหรือไม่ ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดใบหูกวางเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย และมีความเป็นพิษต่อปลากัดต่ำสุดคือตัวทำละลายใด และควรใช้ในปริมาณเท่าใดจึงมีผลที่จะสามารถยับยั้ง หรือทำลายแบคทีเรียได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาแบคทีเรียที่พบในปลากัด

เก็บตัวอย่างปลากัดจีน จากจังหวัดนครปฐม จำนวน 60 ตัว ชั่งน้ำหนัก วัดความยาว แล้วจึงทำการเปิดช่องท้องโดยใช้กรรไกรสอดเข้าไปตัดช่องเปิดให้เห็นอวัยวะภายใน ทำการแยกเชื้อโดยวิธี aseptic จากตับ ไต และม้าม ลงบนอาหาร Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ไปแยกให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ แล้วทำการแยกชนิดโดยนำมาย้อมแกรม ดูลักษณะของเซลล์ และตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical test) จำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20E (Biomérieux) และวิธีของ Buchanan and Gibbons (1974)

2. การสกัดใบหูกวาง

นำใบหูกวางสดอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิประมาณ 40-45°C ประมาณ 6 ชั่วโมง เพื่อลดความชื้น สกัดสมุนไพรโดยใช้วิธีการสกัดแบบการหมัก (Maceration) (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และสำนักงาน

กองทุนสนับสนุนการวิจัย, 2545) โดยการหมักใบหูกวาง กับตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ เอทิลแอลกอฮอล์ 70% และ เอทิลแอลกอฮอล์ 95% ในภาชนะที่ปิด ทิ้งไว้ 3 วัน ในอัตราส่วนสมุนไพร 1 ส่วน : ตัวทำละลาย 10 ส่วน (w/v) เมื่อครบกำหนดเวลา ค่อย ๆ รินสารออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกากให้มากที่สุด นำสารสกัดที่ได้ระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้ evaporator ทำให้สารสกัดแห้งเป็นผงโดยใช้เครื่อง freeze dry และชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ นำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การสกัด

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดใบหูกวางที่สกัดโดยใช้น้ำ เอทิลแอลกอฮอล์ 70% และ เอทิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นตัวทำละลายในการยับยั้ง และทำลายเชื้อแบคทีเรียในปลากัด

3.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion method

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่พบในปลากัดทั้ง 7 ชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวให้มีอายุ 24 ชั่วโมง ทำการปั่นล้างเชื้อในสารละลาย NaCl 0.9% และเตรียมแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml นำสารละลายเชื้อที่ได้ swab บน Muller Hinton Agar (MHA) นำกระดาษกรองขนาด 5 มิลลิเมตร ที่ฆ่าเชื้อแล้วหยดสารสกัดใบหูกวางที่สกัดโดยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ซึ่งเจือจางโดยใช้น้ำที่ระดับความเข้มข้น 12,000 ppm ปริมาณ 10 µl ลงไป และวางไว้บน MHA ที่ swab เชื้อแบคทีเรียไว้ บ่มที่ 37ºC เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกขนาดของ clear zone

3.2 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบหูกวางที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration : MIC) **และฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่พบในปลากัด** (Minimal Bactericidal Concentration : MBC) **ใน** MHB

เตรียมเชื้อแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวให้มีอายุ 24 ชั่วโมง ทำการปั่นล้างเชื้อในสารละลาย NaCl 0.9% ให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 5 x 10^5 cfu/ml ทำการทดลองใน 96-well microtiter plates โดยใส่ MHB 125 µl และเติมสารสกัด 125 µl ใส่แบคทีเรียที่ต้องการทดสอบหลุมละ 125 µl และนำไปบ่มที่ 37ºC เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง ทำการทดลองเป็นจำนวน 3 ซ้ำ หาค่า MIC จากความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่เห็นการเจริญเติบโตโดยใส่สารละลาย 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliium bromide ในการดูการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากการเปลี่ยนสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน ดัดแปลงตามวิธีการของ Gibbons *et al.* (2002)

นำ plate ที่เลี้ยงแบคทีเรียตามวิธีการข้างต้นนำหลุมที่ใสทุกความเข้มข้น และความเข้มข้นสูงสุดที่ขุ่นดูดสารละลายมา 100 ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA แล้ว spread plate บ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ถ้าพบว่าความเข้มข้นใดที่แบคทีเรียสามารถเจริญได้ แสดงว่าความเข้มข้นนั้นไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ เพียงแต่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้เท่านั้น ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่แบคทีเรียไม่เจริญเป็นค่า MBC

4. การศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดใบหูกวางที่ทำให้ลูกปลากัดตายครึ่งหนึ่งภายใน 24 ชั่วโมง (Median Lethal Concentration : LC_{50})

ทำการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดใบหูกวางที่ทำให้ลูกปลากัดตาย 50% ภายใน 24 ชั่วโมง โดยวิธีชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง (static bioassay) (APHA *et al.*, 1992) โดยนำลูกปลากัดเลี้ยงในตู้ทดลอง ตู้ละ 20 ตัว ทำการใส่สารสกัดใบหูกวางความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไป 6 ระดับความเข้มข้น และกลุ่มควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลการตายของลูกปลาที่ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์หาค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง และค่าฟังก์ชันความลาดเอียง (slope function) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตามวิธีของ Litchfield and Wilcoxon (1949)

ผลการทดลอง

1. การศึกษาแบคทีเรียที่พบในปลากัด

จากตัวอย่างปลากัดจีนจำนวน 60 ตัว พบปลากัดที่ติดเชื้อแบคทีเรีย 42 ตัว คิดเป็น 70% โดยแบคทีเรียที่พบมี 7 ชนิด แบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ 6 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* sp., *Edwardsiella tarda, Plesiomonas shigelloides* และ *Enterobacter* sp. แบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus* sp. และ *Staphylococcus* sp. โดยเปอร์เซ็นต์ที่พบแบคทีเรียแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 1

Table 1 Percent of Siamese Fighting Fish infected with bacteria

species	percent	Species	percent
Aeromonas hydrophila	26.67	*Enterobacter* spp.	3.33
Pseudomonas spp.	11.67	*Streptococcus* spp.	8.33
Edwardsiella tarda	3.33	*Staphylococcus* spp.	6.67
Plesiomonas shigelloides	8.33	Unidentified	25.00

2. การสกัดใบหูกวาง

การสกัดใบหูกวางโดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ เอทิลแอลกอฮอล์ 70% และ เอทิลแอลกอฮอล์ 95% หลังจากทำให้สารสกัดแห้งเป็นผงโดยใช้เครื่อง freeze dry พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การสกัด 11.28, 13.05 และ 12.45% ตามลำดับ

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดใบหูกวางที่สกัดโดยใช้น้ำ เอทิลแอลกอฮอล์ 70% และ เอทิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นตัวทำละลายในการยับยั้ง และทำลายเชื้อแบคทีเรียในปลากัด

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion method แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบหูกวางที่สกัดโดยใช้น้ำและเอทิลแอลกอฮอล์ 70% สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียใกล้เคียงกันโดยพิจารณาจากขนาดของ clear zone แต่สารสกัดใบหูกวางที่สกัดโดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 95% จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียน้อยกว่า ซึ่งพบว่าขนาดของ clear zone มีขนาดเล็กกว่าสารสกัดที่สกัดโดยตัวทำละลายชนิดอื่น (ตารางที่ 2) และเมื่อนำสารสกัดใบหูกวางหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และทำลายเชื้อแบคทีเรียที่พบในปลากัด (MBC) พบว่าค่า MIC ของสารสกัดใบหูกวางที่สกัดโดยใช้น้ำ เอทิลแอลกอฮอล์ 70% และ เอทิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นตัวทำละลายมีค่า MIC เท่ากับ 375-750, 375 และ 375-750 ppm ตามลำดับ ส่วนค่า MBC มีค่า 1,500-3,000, 1,500 และ 1,500-3,000 ppm ตามลำดับ ค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรียดีที่สุดได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ 70% ส่วนน้ำ และเอทิลแอลกอฮอล์ 95% นั้นจะมีประสิทธิภาพรองลงมาตามลำดับ (ตารางที่ 3)

Table 2 Inhibition zones of bacteria growth caused by *Terminalia catappa* which extracted by water, ethyl alcohol 70% and ethyl alcohol 95% at 12,000 ppm

	inhibition zone in mm.		
	Water	Alc. 70%	Alc. 95%
Aeromonas hydrophila PT01	8.5	9	7
Pseudomonas spp. PT03	9.5	10.1	6.8
Edwardsiella tarda PT08	8.0	9.2	6.4
Plesiomonas shigelloides PT02	10	10.1	6.5
Enterobacter spp. PT06	7.5	6	5.5
Streptococcus sp. PT10	7	6.1	6
Staphylococcus sp. PT11	10	10.1	7

Table 3 MIC and MBC of *Terminalia catappa* which extracted by water, ethyl alcohol 70% and ethyl alcohol 95%

Bacteria	Water		Alc. 70%		Alc. 95%	
	MIC (ppm)	MBC (ppm)	MIC (ppm)	MBC (ppm)	MIC (ppm)	MBC (ppm)
Aeromonas hydrophila PT01	375	3000	375	1500	750	1500
Pseudomonas spp. PT03	375	1500	375	1500	750	1500
Edwardsiella tarda PT08	375	1500	375	1500	750	1500
Plesiomonas shigelloides PT02	375	1500	375	1500	750	1500
Enterobacter spp. PT06	750	1500	375	1500	375	1500
Streptococcus sp. PT10	375	3000	375	1500	750	1500
Staphylococcus sp. PT11	750	3000	375	1500	750	1500

4. การศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดใบหูกวางที่ทำให้ลูกปลากัดตายครึ่งหนึ่งภายใน 24 ชั่วโมง (Median Lethal Concentration : LC_{50})

ผลการศึกษาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดใบหูกวางที่สกัดโดยใช้น้ำ เอทิลแอลกอฮอล์ 70% และ เอทิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นตัวทำละลาย ที่ทำให้ลูกปลากัดตายครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) ที่ 24 ชั่วโมง มีค่า 2200, 750 และ 880 ppm ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

Table 4 LC_{50} at 24 hours of *Terminalia catappa* which extracted by water, ethyl alcohol 70% and ethyl alcohol 95% in Siamese Fighting Fish

Solvent	LC_{50} at 24 hrs. (ppm)	Slope Function
Water	2,200 (1921.25 – 2519.19)	1.461 (1.329 – 1.606)
ethyl alcohol 70%	750 (552.81 – 1017.53)	2.347 (1.551 – 3.551)
ethyl alcohol 95%	880 (682.43 – 1134.77)	2.036 (1.527 - 2.715)

วิจารณ์ผลการทดลอง

แบคทีเรียที่พบในปลากัด มี 7 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* sp., *Edwardsiella tarda, Plesiomonas shigelloides*, *Enterobacter* sp., *Streptococcus* sp. และ *Staphylococcus* sp. โดย *A. hydrophila* เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุด *Pseudomonas* sp. เป็นแบคทีเรียที่พบรองลงมา ส่วนแบคทีเรียชนิดอื่นพบในปริมาณที่น้อย คือประมาณ 3.33-8.33% อย่างไรก็ตามการนำสารสกัดใบหูกวางมาควบคุมโรคที่เกิดจากแบคทีเรียควรที่จะต้องทำการศึกษาแบคทีเรียทุกชนิด เนื่องจากการใช้สารสกัดใบหูกวางจะใช้เพื่อควบคุมและกำจัดแบคทีเรียในภาพรวมทุกชนิดไม่เจาะจงไปที่แบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่ง

ต้นหูกวาง เป็นไม้ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์หลายประการ ส่วนประกอบต่าง ๆ ของต้นหูกวางนั้น พบว่ามีคุณสมบัติในด้านการต้านทานแบคทีเรีย เช่น ผล (Nagappa *et al*., 2003) เปลือก (Burapadaja *et al*., 1994) และใบ (Chitmanat *et al*., 2003) โดยตัวทำละลายที่ได้ผลดีในการสกัด ได้แก่ น้ำและแอลกอฮอล์ ซึ่งให้ผลในการต้านทานแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri* และ *Bacillus subtilis* ดีกว่าการใช้อีเธอร์และคลอโรฟอร์ม (เดชา และพัชรี, 2528) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้น้ำ และเอทิลแอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายในการสกัดใบหูกวาง โดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 2 ระดับความเข้มข้น คือ 70% และ 95% ซึ่งผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่เป็นน้ำและเอทิลแอลกอฮอล์ 70% จะได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ในการควบคุมแบคทีเรียสูงกว่าการใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 95%

ถึงแม้ว่าสารสกัดที่สกัดโดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 70% จะมีประสิทธิภาพดีในการควบคุมและกำจัดเชื้อแบคทีเรีย แต่เมื่อพิจารณาถึงค่าความเป็นพิษของสารสกัดต่อลูกปลากัดพบว่าความเป็นพิษสูงกว่าการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายประมาณ 3 เท่า โดยค่าความเป็นพิษของสารสกัดที่สกัดโดยใช้น้ำมีค่า LC_{50} เท่ากับ 2,200 ppm แต่เมื่อเทียบกับค่าความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (1,500 ppm) พบว่ายังมีค่าที่สูงอยู่ แต่ในการทดลองนั้นจะใช้ลูกปลากัดในการทดสอบค่าความเป็นพิษ ซึ่งหากนำสารสกัดดังกล่าวไปใช้ในการเลี้ยงปลากัดขนาดที่อายุมากขึ้นก็จะมีความปลอดภัยในการใช้มากขึ้นเช่นกัน

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นคุณสมบัติของสารสกัดใบหูกวางในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตาม Burapadaja *et al.* (1994) ได้ทำการศึกษาพบว่าเปลือกของใบหูกวางก็สามารถที่ควบคุมเชื้อแบคทีเรียได้ดีเช่นเดียวกัน โดยสารสกัดจากเปลือกใบหูกวางสามารถใช้ควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* และ *Shigella flexneri* ได้ นอกจากคุณสมบัติในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียแล้ว สารสกัดใบหูกวางที่ใช้ในการเลี้ยงปลากัดนั้น ยังมีคุณสมบัติที่น่าสนใจอื่น ๆ ที่อาจมีผลต่อปลากัด เช่น antiinflammatory activity (Fan *et al*., 2004) และ antioxidant activity (Chyau *et al*., 2002) ซึ่งจะได้ทำการวิจัยต่อไป

สรุป

ผลจากการใช้สารสกัดใบหูกวางที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ เอทิลแอลกอฮอล์ 70% และเอทิลแอลกอฮอล์ 95% เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียในปลากัด พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดคือน้ำ โดยพิจารณาจากค่า MIC, MBC และค่า LC_{50} โดยการใช้สารสกัดใบหูกวางควรนำปลากัดแช่ในน้ำที่มีความเข้มข้นของสารสกัดใบหูกวาง 375 ppm ก็จะสามารถควบคุมแบคทีเรียในการเลี้ยงปลากัดได้โดยวิธีธรรมชาติ

คำนิยม

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ขอขอบคุณ Dr. Simon Gibbons, The School of Pharmacy, University of London ที่ให้คำแนะนำและเทคนิคการหาค่า MIC

เอกสารอ้างอิง

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 2545. คู่มือการวิจัยสมุนไพรในการผลิตสัตว์. โรงพิมพ์แสงเทียนการพิมพ์. 87 หน้า

ชาติ ไชยณรงค์. 2542. ปลากัด. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรคพิมพ์สหมิตรพริ้นติ้ง, นนทบุรี.

เดชา สุวรรณชัยยง และ พัชรี ชัยจารุณพันธุ์. 2528. การทดสอบฤทธิ์การต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ของพืชในตระกูล *Terminalia*. Special project คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2527-2528.

ธนากร ฤทธิ์ไธสง. 2546. ครบเครื่องเรื่องปลาสวยงาม. บริษัทนาคาอินเตอร์มีเดียจำกัด. กรุงเทพมหานคร. 196 หน้า

ปัญญา สุวรรณสมุทร. 2545. คู่มือการเลี้ยงปลากัด. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน กรุงเทพมหานคร. 72 หน้า.

พฤษภา ณ อยุธยา. 2544. เคล็ดลับการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ปลากัด. สำนักพิมพ์แนวเกษตรกรรม, กรุงเทพมหานคร.

สถาบันพัฒนาปลาสวยงามและพรรณไม้น้ำ. 2540. การทำธุรกิจปลาสวยงาม. กรมประมง, กรุงเทพมหานคร.

APHA, AWWA and WPCF. 1992. Standard Methods for the Examination of water and Wastewater. 18th ed. American Public Health Association, Washington D.C.

Buchanan, R. E. and N.E. Gibbons. 1974. The Shorten Bergey's Manual of Determination Bacteriology 8th, ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Burapadaja, S., P. Tuntiwechwuttikul and A. Bunchoo. 1994. A constituent with antibacterial action from *Terminalia catappa*. Thai J. Pharm. Sci. 18: 42-46.

Chitmanat, C., K. Tongdonmuan and W. Nunsong. 2003. Antimicrobial activity derived from *Terminalia catappa* solution against some *Tilapia* pathogens. The 3rd world congress on medicinal plant and aromatic plants for human welfare, 3-7 Feb 2003, Chiang mai, Thailand.

Chyau, C., S. Tsai, P. Ko and J. Mau. 2002. Antioxidant properties of solvent extracts from *Terminalia catappa* leaves. Food Chem. 78: 483-488.

Fan, Y.M., L.Z. Xu, J. Gao, Y. Wang, X.H. Tang, X.N. Zhao and Z.X. Zhang. 2004. Phytochemical and antiinflammatory studies on *Terminalia catappa*. Fitoterapia 75: 253-260.

Gibbons, S., B. Ohlendorf and I. Johnsen. 2002. The genus Hypericum-a valuable resource of Anti-Staphylococcal leads. Fitoterapia 73: 300-304.

Litchfield, J.T. and F. Wilcoxon. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol and Exper. Ther. 96: 99-113.

Nagappa, A.N., P.A. Thakurdesai, N. Venkat Rao and J. Singh. 2003. Antidiabetic activity of *Terminalia catappa* Linn. fruits. J. Ethnopharmacol. 88: 45-50.