Lioalfa 6-50) เก็บผงสารสกัดที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการทดสอบละลายสารสกัดสมุนไพรในเอธานอลเข้มข้น 50% (ตัวทำละลายแอลกอฮอล์ที่เป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าเมธานอล และสามารถใช้กับสิ่งมีชีวิตได้) ให้ได้ความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถละลายได้ (ตารางที่ 2)

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Bovine Embryonic Kidney (BEK) และ Swine Kidney 6 (SK-6) ในไมโครเพลทสำหรับเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงแบบ 96 หลุม (Nunclon™) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Minimum Essential Medium (GIBCO®) ที่เสริมด้วย 5% fetal calf serum (GIBCO®) ที่อุณหภูมิ 41 และ 37 องศาเซลเซียส สำหรับเซลล์ BEK และ SK-6 ตามลำดับ ที่สภาวะมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตลักษณะเซลล์เทียบกับเซลล์ควบคุมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสารสมุนไพร

2. เชื้อ coccidia ที่ทดสอบ

แยกเก็บ oocyst ของ coccidia จากมูลของสุกรและไก่ ด้วยเทคนิค floatation ด้วยสารละลายน้ำเกลืออิ่มตัว และ identify แยกชนิดด้วยลักษณะของ sporulated oocyst จากนั้นเพิ่มจำนวน oocyst เพื่อใช้ในการทดสอบโดยการป้อน sporulated oocyst ของ *I. suis* ให้หมูทดลอง และ *E. tenella* ให้ไก่ทดลอง แล้วแยกเก็บ oocyst จากมูลสัตว์ทดลองด้วยเทคนิค floatation และเตรียมให้เข้มข้น 50,000-250,000 oocyst/มิลลิลิตร ในน้ำเกลือ 0.9% เพื่อใช้ทดสอบต่อไป

3. การทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการทำลาย oocyst (oocysticidal activity)

ทำการทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อ oocyst (Williams, 1997) ดังนี้ เตรียมสารสกัดสมุนไพร และเอธานอลความเข้มข้นต่าง ๆ (ตารางที่ 3) ในหลอดทดสอบหลอดละ 100 ไมโครลิตรจำนวน 2 ซ้ำ โดยใช้น้ำเกลือ 0.9% เป็นสารควบคุม แล้วเติม unsporulated oocyst เข้มข้น 50,000-250,000 oocyst/มิลลิลิตร หลอดละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ในที่มืด 24 ชั่วโมง แล้วปั่นล้าง oocyst ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (Merck®) เข้มข้น 2% เพื่อทำการ sporulation (Tomley, 1997) โดยแบ่งส่วนหนึ่งมานับแยกจำนวน unsporulated oocyst และ sporulated oocyst เพื่อหาอัตรา sporulation เริ่มต้นไว้ ส่วนที่เหลือนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 48 ชั่วโมง แล้วนับแยกจำนวน unsporulated oocyst และ sporulated oocyst เพื่อหาอัตรา sporulation อีกครั้ง จากนั้นนำอัตรา sporulation เริ่มต้นมาหักลบออกได้เป็นอัตรา sporulation หลังสัมผัสสารทดสอบ

4. การทดสอบทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของอัตรา sporulation ของ oocyst ในการทดสอบโดยการเปรียบเทียบสัดส่วนของอัตราการ sporulation ของกลุ่มทดสอบสารสกัดสมุนไพรกับกลุ่มควบคุม ด้วย Chi-Square ที่ระดับความเชื่อมั่น $\alpha = 0.05$

ผลการวิจัย

1. สารสกัดสมุนไพร

ชนิดและส่วนของสมุนไพรที่ใช้เตรียมสารสกัดมี 3 ชนิด (ตารางที่ 1) โดยผงสารสกัดสมุนไพรที่ได้จากการสกัดเมล็ดน้อยหน่า เมล็ดสะแก และเปลือกข่อย มีปริมาณเนื้อสาร (yield) เป็นร้อยละ 4.9 8.2 และ 2.7 ตามลำดับ และมีค่าความสามารถในการละลายในเอธานอลเข้มข้น 50% เป็น 218 320 และ 120 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง BEK และ SK-6 พบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด มีความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อ 50% ของเซลล์เพาะเลี้ยงดังตารางที่ 2

2. ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการทำลาย oocyst

ผลการทดสอบพบว่า มีเพียงสารสกัดเมล็ดสะแกที่ความเข้มข้น 32 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่มีผลทำให้อัตราการ sporulation (%sporulation) ของ *I. suis* หลังสัมผัสสารสกัดมีอัตราที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p \leq 0.001$) เมื่อเทียบกับการทดสอบควบคุมในน้ำเกลือ 0.9% (ตารางที่ 3) แต่สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าและเปลือกข่อย ไม่มีผลต่ออัตราการ sporulation ของ *I. suis* ส่วนกรณีของ *E. tenella* พบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดไม่มีผลทำให้อัตราการ sporulation ของ *E. tenella* ลดลงแต่อย่างใด นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเมล็ดสะแกสามารถทำให้เกิดการจับกันเป็นกลุ่ม (aggregation) ของ oocyst ได้ด้วย (รูปที่ 1)

สรุปและวิจารณ์ผล

จากผลการศึกษานี้พบว่าสารสกัดเมล็ดสะแกมีฤทธิ์ทำลาย oocyst ของ *I. suis* ได้โดยสารสกัดเมล็ดสะแกความเข้มข้น 32 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำให้อัตราการ sporulation ลดลงประมาณร้อยละ 51 และยังพบว่าสารสกัดเมล็ดสะแกสามารถเหนี่ยวนำให้ oocyst ของ *I. suis* และ *E. tenella* เกิดการจับกันเป็นกลุ่มได้ ซึ่งในการทดสอบนี้สันนิษฐานว่าน่าจะเกิดจากสารสกัดเมล็ดสะแกที่มีลักษณะค่อนข้างเหนียวหนืดที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ (32 และ 16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ทั้งนี้สารเคมีในสารสกัดเมล็ดสะแกอาจเป็นสารในกลุ่ม steroid หรือ flavonoid glycosides (Khesorn et al., 2004) ผลดังกล่าวพอจะบ่งชี้ได้ว่าน่าจะมีความเป็นไปได้หากจะนำสารสกัดเมล็ดสะแกไปประยุกต์ใช้เป็นสารกำจัด oocyst ในคอกเลี้ยงสุกรหรือไก่ทดแทนสารเคมี (disinfectants) เช่น แอมโมเนีย เมธิลโบรไมด์ คาร์บอนไดซัลไฟด์ และฟีนอล (Williams, 1997) ที่ใช้ในฟาร์มทั่วไป และเป็นวิธีการจัดการฟาร์มเพื่อป้องกันและลดการติดเชื้อที่นิยมทำกันอยู่แล้ว แต่ทั้งนี้ควรต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในระดับฟาร์มทดลองก่อน

ปัญหาที่สำคัญยิ่งในปัจจุบันประการหนึ่งคือ การใช้สารเคมีหรือสารปฏิชีวนะเพื่อการป้องกัน รักษา และควบคุมโรคในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เพื่อการบริโภคเริ่มถูกจำกัดการใช้ด้วยเหตุผลความปลอดภัยของผู้บริโภค โดยปัจจุบันสหภาพยุโรปอนุญาตให้ใช้เพียง flavomycin และ avilamycin เท่านั้น และจะห้ามใช้ทั้งหมดเด็ดขาดในปี พ.ศ. 2552 ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องหาสารทดแทนเพื่อใช้แทนสารปฏิชีวนะทางเลือกหนึ่งที่ดีและเป็นที่ยอมรับว่าปลอดภัย คือ การใช้สมุนไพร ดังนั้นผลการศึกษานี้จึงน่าจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาในอนาคตเพื่อหาสมุนไพรทดแทนการใช้สารเคมีหรือยาที่ใช้ในการควบคุม และป้องกันโรคบิดที่เกิดจาก coccidia ในสุกร และไก่ ตลอดจนในสัตว์อื่นๆ โดยเฉพาะสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภค

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่า สารสกัดเมล็ดสะแกที่ความเข้มข้น 32 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถทำลาย oocyst (oocysticidal effect) ของ *I. suis* ได้ แต่ไม่สามารถทำลาย oocyst ของ *E. tenella* ได้ ขณะที่สารสกัดเมล็ดน้อยหน่า และเปลือกข่อยไม่สามารถทำลาย oocyst ของ *E. tenella* และ *I. suis* ได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

มานพ ม่วงใหญ่. 2534. **โรคโปรโตซัวและริกเกตเซียของสัตว์**. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุพจน์ เมธิยะพันธ์ ลัดดา ตรงวงศา จิรา วายุโชติ และประทีป เปมะโยธิน. 2534. โรคคอกซิดิโอซิสในลูกสุกรในประเทศไทย. **สัตวแพทย์สาร** 42(1): 27-31.

Brennan, J., Bagg, R., Barnum, D., Wilson, J. and Dick, P. 2001. Efficacy of narasin in the prevention of necrotic enteritis in broiler chickens. **Avian Dis** 45(1): 210-214.

Brill, H.C. and Wells, A.H. 1971. The physiological active constituents of certain Philippine medicinal plants II. **Philippine J Sci** 2: 16-95.

Chae, C., Kwon, D., Kim, O., Min, K., Cheon, D.S., Choi, C., Kim, B. and Suh, J. 1998. Diarrhoea

in nursing piglets associated with coccidiosis: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. **Vet Rec** 143(15): 417-420.

Das, M.K. and Beuria, M.K. 1991. Anti-malarial property of an extract of the plant *Streblus asper* in murine malaria. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 85(1): 40-41.

Driesen, S.J., Fahy, V.A. and Carland, P.G. 1995. The use of toltrazuril for the prevention of coccidiosis in piglets before weaning. **Aust Vet J** 72(4):139-141.

Euswas, P., Srirod, S., Choontanom, P. and Chompoochant, T. 1988. Studies on antihelmintic activity of sakae (*Combretum quadrangulare* Kurz). **J Agri (Sci)** 22: 201-206.

Higgins, R.J. 1999. Diagnosis of porcine coccidiosis. **Pig J** 43: 80-87.

Khesorn Nanthajit, Damrong Santiarvorn and Banyong Khantawa. 2004. Antibacterial activity of the seeds of *Combretum quadrangulare*, Kurz. In: **Proceeding of 30th Congress on Science and Technology of Thailand**, Bangkok, 19-21 October 2004.

McDougald, L. R. 1998. Intestinal protozoa important to poultry. **Poult Sci** 77(8): 1156-1158.

Mundt, H.C., Cohnen, A., Daugschies, A., Joachim, A., Prosl, H., Schmaschke, R. and Westphal, B. 2005. Occurrence of *Isospora suis* in Germany, Switzerland and Austria. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health** 52(2): 93-97.

Pecelunas, K., Danforth, H.D., Schildknecht, E.G. and Davis, S. 2000. Efficacy evaluation of lasalocid plus roxarsone combination medication with different geographic field strains of *Eimeria acervulina*. **Avian Dis** 44(1): 1-7.

Reza Razmi, G. and Kalideri, G.A. 2000. Prevalence of subclinical coccidiosis in broiler-chicken farms in the municipality of Mashhad, Khorasan, Iran. **Prev Vet Med** 44(3-4): 247-253.

Sayd, S.M. and Kawazoe, U. 1996. Prevalence of porcine neonatal isosporosis in Brazil. **Vet Parasitol** 67(3-4): 169-174.

Somanabandhu, A, Wungchinda, S. and Wiwat, C. 1980. Chemical composition of *Combretum quadrangulare* Kurz. In: **Abstract 4th Asian Symp. Med Plants Spices**, Bangkok, Thailand, Septemper 15-19, p. 114.

Tomley, F. 1997. Techniques for Isolation and Characterization of Apical Organelles from *Eimeria tenella* Sporozoites. **Methods: A Companion to Methods in Enzymology** 13: 171-176.

Weng, Y.B., Hu, Y.J., Li, Y., Li, B.S., Lin, R.Q., Xie, D.H., Gasser, R.B. and Zhu, X.Q. 2005. Survey of intestinal parasites in pigs from intensive farms in Guangdong Province, People's Republic of China. **Vet Parasitol** 127 (3-4): 333-336.

Williams, R.B. 1997. Laboratory tests of phenolic disinfectants as oocysticides against the chicken coccidium *Eimeria acervulina*. **Vet Rec** 25: 447-448.

Youn, H.J. and Noh, J.W. 2001. Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. **Vet Parasitol** 96(4): 257-263.

ตารางที่ 1 ชนิด และส่วนของพืชสมุนไพร

Scientific name	Thai name	English name	Plant part	Location
Annona sguamosa	Noi-nah	Sugar Apple, Custard Apple	seed	Nakhonratchasima
Combretum quadrangulare	Sa-kae	-	seed	Loei
Streblus asper	Khoi	Tiger Herbal	Stem-bark	Khon Kaen

ตารางที่ 2 ปริมาณเนื้อสาร การละลาย และความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงของสารสกัดสมุนไพร

Plants	Parts	Yield (%)	Solubility* (mg/ml)	Cell Toxicity (mg/ml)**	
				BEK	SK-6
Noi-nah	seed	4.9	218	0.213	0.213
Sa-kae	seed	8.2	320	0.16	0.08
Khoi	Stem-bark	2.7	120	0.03	0.015

*Dissolve in 50% ethanol

**Concentration that affect to 50% of cell population

BEK: Bovine Embryonic Kidney cell line; SK-6: Swine Kidney cell line

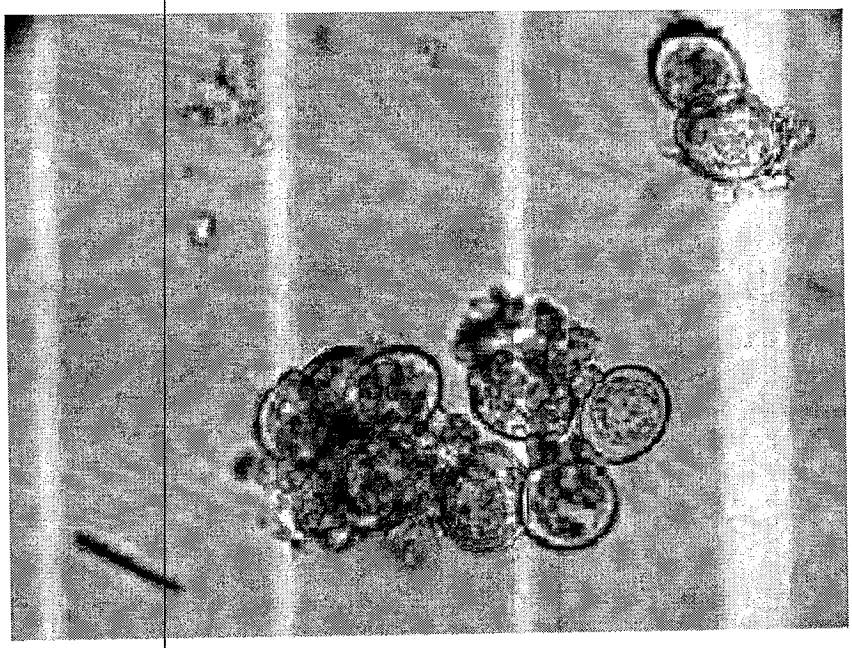
ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดสมุนไพรในการทำลาย oocyst ของ *E. tenella* and *I. suis*

Plant Extracts	Concentration	Oocyst sporulation rate (%) *	
		E. tenella	*I. suis*
Noi-Nah	22 (mg/ml)	25	40
	11 (mg/ml)	25	52
Sa-kae	32 (mg/ml)	27	22[a]
	16 (mg/ml)	25	42
Khoi	12 (mg/ml)	36	47
	6 (mg/ml)	30	38
Ethanol **	5%	28	53
	2.5%	27	50
Nacl	0.9%	35	45

*subtracted with % sporulation before sporulation incubation

**corresponding to concentration of ethanol in extract solutions

[a] significantly different ($p \leq 0.001$), comparing to 0.9% Nacl-treated



รูปที่ 1 ผลของสารสกัดเมล็ดสะแกที่ทำให้เกิดการจับกันเป็นกลุ่มของ oocysts