



การยับยั้งกระบวนการสปอร์เรชั่นของเชื้อบิดในไก่ด้วยสารแทนนินจากสารสกัดใบกะเม็ง

คมปร ตาณะสุต^{1,*} วิภาพร จารุจาริต¹ กรจักร หรั่งทอง² และชินกฤต พฤกษฤติ²

¹คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช 80240

²นักศึกษาคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช 80240

บทคัดย่อ: กะเม็งเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ มีการแพร่กระจายพันธุ์ไปยังประเทศเขตอบอุ่นและเขตร้อน ในประเทศไทยพบได้ทั่วไปทุกภูมิภาค สารออกฤทธิ์ที่สำคัญในการต้านโปรโตซัวคือสารแทนนิน เนื่องจากประเทศไทยตั้งอยู่บริเวณเขตร้อนชื้นซึ่งเหมาะแก่การเจริญของเชื้อไอโมเรีย (*Eimeria spp.*) ไอโมเรียในไก่เป็นโรคก่อให้เกิดอาการบิด ท้องเสีย อัตราการป่วยและตายสูงขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตลดลง ส่งผลให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจแก่เกษตรกร การศึกษาชิ้นนี้มุ่งเน้นศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบกะเม็งต่อกระบวนการสปอร์เรชั่นของโอโอซิสต์ (oocyst) ของไอโมเรียในไก่เนื้อในหลอดทดลอง (in vitro) โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 6 กลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ความเข้มข้นสารแทนนินจากสารสกัดใบกะเม็งที่ 70 700 7,000 และ 70,000 ppm กลุ่มยาต้านบิด Toltrazuril และกลุ่มควบคุม โดยเปรียบเทียบลักษณะสัญญาณวิทยาของโอโอซิสต์และเปอร์เซ็นต์การสปอร์เรชั่นของแต่ละกลุ่มการทดลองภายหลังการผสมสารสกัดใบกะเม็งกับโอโอซิสต์ที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งกระบวนการสปอร์เรชั่นขึ้นกับความเข้มข้นของแทนนิน สารแทนนินจากสารสกัดใบกะเม็งที่ความเข้มข้น 70,000 ppm ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของผนังโอโอซิสต์และการแตกของผนังโอโอซิสต์มากที่สุด นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์การเกิดสปอร์เรชั่นน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละกลุ่มการทดลอง จากผลการศึกษาดังกล่าวผนังของโอโอซิสต์ที่เปลี่ยนแปลงและอัตราการสปอร์เรชั่นที่ลดลงจะช่วยลดความสามารถในการก่อโรคในไก่ได้

คำสำคัญ: กะเม็ง สารสกัดใบกะเม็ง แทนนิน ไอโมเรีย สปอร์เรชั่น

*ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2566. 18(2): 171-180.

E-mail address: khompakorn.t@rmuts.ac.th

Inhibition of Sporulation of Chicken *Eimeria* by Tannin from Kameng Leaf Extract

Khompakorn Thanasut^{1,#}, Wipaporn Jarujareet¹, Korrachark Rungthong², and
Chinnakrit Phruksarudi²

¹Faculty of Veterinary medicine, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Thungyai, Nakhon Si Thammarat 80240

²Veterinary student, Faculty of Veterinary medicine, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Thungyai, Nakhon Si Thammarat 80240

Abstract: Kameng is a plant native to Central and South America. The species has spread to temperate and tropical countries. In Thailand, it can be found everywhere in every region. The main active ingredient against protozoa is tannin. Since Thailand is located in a tropical area suitable for the growth of *Eimeria* spp., this protozoa in chickens is a disease that causes dysentery, diarrhea and a higher morbidity and mortality rate and the growth rate was decreased. This results in economic damage to farmers. The aim of this study was to investigate the efficacy of a Kameng leaf extract on the sporulation rate of *eimeria* oocysts in broiler (in vitro). Experiment was separated into 6 groups. The tannin concentrations from Kameng leaf extract were at 70, 700, 7,000 and 70,000 ppm, the Toltrazuril anticoccidial group and the control group. The morphological characteristics of oocysts and sporulation rate of each experimental group were compared after mixing the leaf extract with oocysts at 24, 48 and 72 hours. The inhibition of the sporulation depends on the concentration of tannin. Tannin from Kameng leaf extract at a concentration of 70,000 ppm resulted in oocyst wall deformity and oocyst wall rupture the most. In addition, the sporulation rate was the lowest compared to each experimental group. According to the results of the study, the altered oocyst wall and reduced sporulation rate reduce the pathogenic capacity in chickens.

Keywords: Kameng, Kameng leaf extract, Tannin, *Eimeria* spp., Sporulation

#Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2023 18(2): 171-180.

E-mail address: khompakorn.t@rmutsv.ac.th

บทนำ

โรคบิด (Coccidiosis) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัว สัตว์เซลล์เดียวในสกุลของไอเมอเรีย (*Eimeria* spp.) เป็นโรคที่มีผลโดยตรงต่อลำไส้ เพราะเชื้อไอเมอ

เรียจะทำลายเยื่อเมือกของลำไส้ ทำให้ลำไส้อักเสบ ท้องเสียหรือถ่ายเป็นมูก หรือเลือด ซึ่งจะส่งผลต่อการแสดงอาการของไก่ คือ ไก่ไม่ยอมกินอาหาร อาหารไม่ดูดซึม ไม่เจริญเติบโต ท้องเสีย ถ่ายเป็นมูกเลือดจนไปถึง

เสียชีวิตได้ อีกทั้งยังสามารถพบไก่ที่เป็นภาวะไม่แสดงอาการซึ่งเป็นปัญหาที่ทำให้เกิดความเสียหายที่หนักได้ ถ้าหากไก่เป็นตัวที่ไม่แสดงอาการแล้วไม่นำออกจากฝูง เลี้ยงจะสามารถไปติดตัวอื่นได้ผ่านการติดผ่านอุจจาระ จากตัวที่ติดเชื้อทำให้เกิดความเสียหายระดับสูงได้

ไอเมอเรียที่พบได้ในไก่ทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. hagani*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. mivati*, *E. praecox*, *E. necatrix* และ *E. tenella* (Tsuiji et al., 1997; Vrba et al., 2011; Aziza et al., 2016) โดยเชื้อชนิดที่สำคัญ และก่อให้เกิดผลเสีย ต่อ เศรษฐกิจมี 7 ชนิด คือ *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. necatrix* และ *E. tenella* และชนิดที่มีความสำคัญและก่อโรค รุนแรง มากที่สุดมีอยู่ 5 ชนิด ตามลำดับความรุนแรงคือ *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. maxima*, *E. brunetti* และ *E. acervulina* (Allen and Fetterer, 2002; Kawahara et al., 2014) ซึ่งการเกิดโรคจากเชื้อชนิดแต่ละชนิดจะมีความรุนแรง และลักษณะของการเกิดโรคที่แตกต่างกันในแต่ละตำแหน่งของลำไส้ โดย *E. acervulina* เกิดโรคที่ลำไส้เล็กส่วนต้นโดยจะมองเห็น แถบขาวตามขวางลำไส้ซึ่งเกิดจากโอโอซิสต์และผนัง ลำไส้ หนาขึ้น *E. tenella* เกิดโรคที่ลำไส้ตันโดยจะเกิดเป็น จุดเลือดออก ผนังลำไส้หนาขึ้น เยื่อเมือกเป็นสีขาวและมี ลิ่มเลือดติดอยู่และมีเลือดออกปนมากับอุจจาระ *E. necatrix* เกิดโรคที่ลำไส้เล็กส่วนกลางทำให้เกิดลำไส้โป่ง พอง มีจุดสีขาว มีเยื่อเมือกและเลือดปนกับเนื้อตาย และ มีเลือดออกปนมากับอุจจาระ *E. maxima* เกิดโรคที่ ลำไส้เล็กส่วนกลาง โดยทำให้ผนังลำไส้ หนาขึ้น มีเยื่อ เมือกปนเลือดและมีเนื้อตาย *E. brunetti* เกิดโรคที่ลำไส้ เล็กส่วนปลาย ไปจนถึงลำไส้ใหญ่ทำให้เกิดเนื้อตายมี เลือดออกและลำไส้อักเสบ *E. praecox* เกิดโรคที่ลำไส้ เล็ก ส่วนต้น รอยโรคไม่แสดงอาการชัดเจนนัก มีเยื่อ เมือกหลุดลอก *E. mitis* เกิดโรคที่ลำไส้เล็กส่วนต้น ไม่ แสดงรอยโรคให้เห็นหรืออาจจะมีเยื่อเมือกหลุดลอก

(Johnson and Reid, 1970; Hafez, 2008; Quiroz-Castaneda and Dantan-Gonzalez, 2015) และอาจ มีการติดเชื้อ ไอเมอเรียมากกว่า 1 ชนิด ในเวลาเดียวกันได้ แต่อย่างไรก็ตาม เชื้อไอเมอเรียมีความเฉพาะเจาะจงต่อ ชนิดสัตว์ เช่น เชื้อไอเมอเรียที่ทำให้เกิดโรคในไก่จะไม่ก่อ โรคในสัตว์ปีกอื่นๆ และไม่ส่งผลเสียต่อสุขภาพของคน (Sasipreeyachan, 2010) การติดต่อติดผ่านทางการบิน โดยเชื้อที่ขับออกมาทางอุจจาระแพร่กระจายไปตามพื้น วัสดุรองพื้นหรือติดไปกับร่องเท้าผู้เลี้ยง ระยะฟักตัว ประมาณ 4 – 6 วัน อาการไก่ที่ป่วยเป็นโรคบิดจะกิน อาหารน้อยลงแต่กินน้ำมากขึ้น หงอยซึม ขนยุ่ง ปีกตก ท้องร่วง มีเลือดปนออกมาในอุจจาระโดยมักจะเห็นเป็นสี แดง น้ำตาล หรือแดงเข้ม

เชื่อนี้จะสามารถอยู่ได้เป็นเดือนถึงปี เพราะไอเมอเรียเป็นเชื้อที่มีผนังโอโอซิสต์ (oocyst wall) ที่หนาและ มีความทนต่อสิ่งแวดล้อมหากมีอุณหภูมิที่ต่ำและมีความชื้นเหมาะกับการดำรงชีวิตของเชื้อและยังมีความ ทนต่อน้ำยาฆ่าเชื้อวิธีป้องกันโรคบิดของฟาร์มไก่ส่วนใหญ่ มักทำโดยการใช้อายกั้นบิต แต่ในขณะเดียวกันก็ พบว่า ในฟาร์มไก่ที่มีการใช้อายกั้นบิตยังคงตรวจพบไก่ที่เป็นโรคบิด ดังนั้นการใช้อายกั้นบิตที่ไม่ได้ผล อาจมีสาเหตุ มาจากเชื้อบิตมีการดื้อต่อยาเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งมีการ จัดการภายในฟาร์มที่ไม่ดี เช่น วัสดุรองนอนชื้นแฉะ ทำให้โอโอซิสต์สามารถพัฒนาไปเป็นระยะติดโรค (sporulated oocyst) ได้ นอกจากนี้การมีโอโอซิสต์ ปนเปื้อนในน้ำและอาหาร การระบายอากาศที่ไม่ดี และความหนาแน่นของการเลี้ยงต่อฝูงมากเกินไปล้วนแล้วแต่ เป็นสาเหตุของการเกิดโรคบิดได้ทั้งสิ้น

พืชกะเม้งมีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกากลางและ อเมริกาใต้แล้วมีการแพร่กระจายพันธุ์ไปยังประเทศเขต อบอุ่น เขตโซนร้อน ในประเทศไทยพบได้ทั่วทุกภูมิภาค ส่วนมากจะพบขึ้นเองตามริมทางที่ชุ่มชื้นและขึ้นแฉะที่รก ร้างทั่วไป เช่น ริมคูน้ำ นาข้าว ริมคลอง และในแปลง พืชผักต่างๆไป ปัจจุบันมีการศึกษามากมายได้รายงาน

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลายของพืชชนิดนี้ได้แก่ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเชื้อรา (Atawongsa, 2018) ฤทธิ์ต้านไวรัส ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (SemSri *et al.*, 2017) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Tewtrakul *et al.*, 2011) ฤทธิ์ระงับปวด ลดระดับไขมันในเลือด (Kim *et al.*, 2008) ฤทธิ์ปกป้องตับ ฤทธิ์ปกป้องไต ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ปกป้องระบบประสาท ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ลดความดันโลหิต ฤทธิ์ป้องกันอันตรายจากรังสี ฤทธิ์กระตุ้นการเจริญเติบโตของเส้นผม (Jaisin, 2016) และฤทธิ์การรักษาโรคผิวหนัง แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาความเป็นไปได้ของการต้านโปรโตซัวของสารออกฤทธิ์แทนนินในใบกะเม็งในสัตว์นั้นยังไม่ได้ได้รับการศึกษาและเผยแพร่ที่มากพอ มีเพียงงานวิจัยบางชิ้นที่รายงานผลของสกัดสารแทนนินจากสมอติ่ง (gallnut) ต่อไอเมอเรียในไก่เนื้อ ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตในระยะสปอริเชนที่ความเข้มข้น 500 ppm (Tonda *et al.*, 2018) ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จะมุ่งเน้นถึงการพิสูจน์หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่จะตอบคำถามถึงสารแทนนินจากสารสกัดใบกะเม็งมีผลต่อการยับยั้งกระบวนการสปอริเชนและความผิดปกติที่เกิดขึ้นที่ผนังของโอโอซิสต์ของโปรโตซัวชนิดไอเมอเรียของไก่เนื้อในหลอดทดลอง (in vitro)

อุปกรณ์และวิธีการ

การสกัดและการหาความเข้มข้นสารออกฤทธิ์แทนนินจากใบกะเม็ง

เก็บรวบรวมพืชสมุนไพรกะเม็ง จากพื้นที่ในเขตจังหวัดนครศรีธรรมราช และตรวจสอบเอกลักษณ์ทางพืช (identification) โดยผู้เชี่ยวชาญ นำเฉพาะส่วนใบมาล้างด้วยน้ำสะอาดเพื่อนำเศษดินและสิ่งสกปรกออก ตากให้แห้งในที่ร่มจนใบแห้งประมาณ 15-20 วัน หรือทำการอบด้วยลมร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งใบแห้งแล้วนำใบมาทำการปั่นหรือสับ ทำให้ละเอียดโดยการบดจนได้ผงใบกะเม็ง หลังจากนั้นผงดังกล่าวนำมาถูกแช่ใน

เมทานอล เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และเก็บส่วนสารสกัด จากนั้นทำการระเหยเมทานอลออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40°C เก็บสารสกัดในภาชนะมิดชิด เลี่ยงการโดนความร้อน และแสง

การทดสอบสารออกฤทธิ์โดยวิธีทางเคมี Phytochemical test (Gopiesh and Kannabiran, 2007) ซึ่งเป็นการทดสอบเชิงคุณภาพ แล้วทำการหาค่าความเข้มข้นของสารแทนนินโดยวัดปริมาณแสง และค่าความเข้มแสงในช่วงความยาวคลื่นแสงที่มองเห็นได้ ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ด้วยวิธี Folin-Denis (Kalpana *et al.*, 2013) สารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกเข้มข้น 100 ppm เจือจางด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้น 0 20 40 60 และ 80 ppm ตามลำดับ นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin denis จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต จำนวน 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ถึง 10 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน จากนั้นทำการเตรียมสารสกัดใบกะเม็งจำนวน 1 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร คนให้ละลายบนแผ่นความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองสาร (Whatman) เบอร์ 1 ใส่สารละลายต่างๆเช่นเดียวกันกับสารละลายมาตรฐานแทนนิก วัดค่าดูดกลืนแสงแล้วคำนวณหาสารแทนนินเทียบกับกราฟมาตรฐาน จดบันทึกค่าความเข้มข้นแทนนินในหน่วย ppm

โปรโตซัวไอเมอเรีย

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างอุจจาระจากฟาร์มไก่เนื้อที่ทราบประวัติการระบาดของโรคบิดในอำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช และนำตัวอย่างอุจจาระไก่ที่เก็บได้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 10 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปใช้ ในขั้นตอนถัดไป

การตรวจหาโอโอซิสต์ด้วยวิธี sugar centrifugal flotation นำตัวอย่างอุจจาระของไก่ที่เก็บได้ในแต่ละฟาร์มแยกตรวจหาโอโอซิสต์ซึ่งมีวิธีการดังนี้ นำอุจจาระที่ได้ทั้งหมดผสมให้เข้ากันแล้วตักแบ่ง อุจจาระมาประมาณ 1 กรัมผสมกับน้ำประปา 50 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านตะแกรงสแตนเลสตาถี่ ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 mesh จากนั้นแบ่งสารละลายปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองพลาสติกขนาดความจุ 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว $1,610 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำตาลและเกลือที่มีค่าความถ่วงจำเพาะ 1.28 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว $1,610 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำตาลและเกลือจนกระทั่งเต็มปริมาตรถึงขอบหลอดทดลอง นำ cover glass ขนาด 18×18 มิลลิเมตร วางปิดด้านบน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วนำกระจกปิดสไลด์มาวางบนแผ่นกระจกสไลด์ ตรวจหาโอโอซิสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ที่กำลังขยายเลนส์วัตถุ $10\times$ และ $40\times$

ทำการเก็บแยกโอโอซิสต์เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป โดยมีวิธีเก็บโอโอซิสต์ดังนี้ นำอุจจาระที่ได้ทั้งหมด ผสมกับน้ำประปาแล้วกรองผ่านตะแกรงสแตนเลสตาถี่ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 mesh จากนั้นนำสารละลายที่ผ่านการกรองแล้วมาแบ่งใส่ในหลอดทดลองความจุขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว $1,610 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที หลังจากปั่นเหวี่ยงเสร็จ เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เติมน้ำตาลและเกลือที่มีค่าความถ่วงจำเพาะ 1.28 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว $1,610 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ทำการดูดสารละลายส่วนบนที่มีตะกอนโอโอซิสต์ลอยตัวอย่างใสในหลอดทดลองหลอดใหม่ เทน้ำกลั่นใส่ลงไป แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว $1,610 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทน้ำใสส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำขั้นตอนนี้ 3 ครั้ง เพื่อ

ล้างเอาสารละลายน้ำตาลและเกลือออกจากตะกอนโอโอซิสต์ ตรวจนับจำนวนโอโอซิสต์ โดยใช้ McMaster chamber เพื่อหาจำนวนโอโอซิสต์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อมาทำการเจือจางให้ได้ จำนวน 50,000 โอโอซิสต์ใน 100 ไมโครลิตรของสารละลาย 2.5% โพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ใส่ในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตรเพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

การแบ่งกลุ่มการทดลอง

ทำการแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่มสารแทนนินจากสารสกัดใบกะเม็ง 4 ความเข้มข้น กลุ่มยาต้านบิด Toltrazuril (5 mg/kg) และกลุ่มควบคุม นำ 100 ไมโครลิตรของสารสกัดใบกะเม็งหรือสารละลายยาต้านบิดหรือน้ำกลั่นผสมให้เข้ากันกับโอโอซิสต์จำนวน 50,000 โอโอซิสต์ใน 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร เก็บในที่มืดสังเกตการณ์ในระยะเวลา 0 24 48 และ 72 ชั่วโมงภายหลังการบ่มเชื้อกับสารสกัด เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของโอโอซิสต์และอัตราการสปอรูเรชัน ในแต่ละกลุ่มการทดลอง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

อัตราการสปอรูเรชันของโอโอซิสต์

สารละลายในหลอดทดลองของแต่ละกลุ่มปั่นล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้งโดยใช้เครื่องปั่นที่มีความเร็ว 5000 รอบต่อนาที ใช้เวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและเติมน้ำโพแทสเซียมไดโครเมต ปริมาตร 200 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันโดยดูดสารขึ้นลงด้วยปิเปต เมื่อผสมกันเสร็จให้ดูดสารออกมาปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนสไลด์แก้วและปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ สังเกตตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง นับโอโอซิสต์ 300 โอโอซิสต์ แยกแยะจำนวนโอโอซิสต์ที่เกิดและไม่เกิดการสปอรูเรชัน จดบันทึกอัตราการสปอรูเรชันในหน่วยเปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งสังเกตผนังโอโอซิสต์ของเชื้อโอโอซิสต์

การทดสอบเชิงสถิติ

การเปรียบเทียบความต่างของอัตราการสปอรูเรชันของโอโอซิสต์ด้วย one-way ANOVA และ post-hoc t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $P 0.05$

ผลการทดลอง

โปรโตซัวไอเมอเรียที่แยกได้จากอุจจาระของไก่เนื้อด้วยวิธี sugar centrifugal flotation นั้นพบไอเมอเรียมากกว่า 1 ชนิด ในเวลาเดียวกัน ได้แก่ ไอเมอเรีย เนคาทริกซ์ (*E. necatrix*) ไอเมอเรีย แมกซิมา (*E. maxima*) และ ไอเมอเรีย อะเซอร์วูลินา (*E. acervulina*) โดยการสังเกตจากขนาดของโอโอซิสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

สารสกัดใบกะเม็งภายหลังระเหยเอาเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสารในสภาวะสุญญากาศ พบว่าสารสกัดมีสีเขียวน้ำตาล หนืดคล้ายน้ำมัน เปอร์เซ็นต์ที่ได้รับ (yield percentage) เท่ากับ 3.25 เปอร์เซ็นต์ ถูกส่งต่อเพื่อทดสอบสารออกฤทธิ์เชิงคุณภาพ พบว่าในสารสกัดมีส่วนประกอบของสารฟีนอล (phenol) แทนนิน (tannin) และฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และเมื่อตรวจหาความเข้มข้นของสารแทนนินด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เปรียบเทียบกับค่าดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น ความเข้มข้นของแทนนินเท่ากับ 70,000 ppm

สารสกัดใบกะเม็งถูกเตรียมที่หลากหลายความเข้มข้นได้แก่ 70 700 7,000 และ 70,000 ppm โดยการเจือจาง 10 เท่า เพื่อใช้เป็นกลุ่มการทดลองหาอัตราสปอริชันของโอโอซิสต์ รวมถึงการสังเกตลักษณะรูปร่างของโอโอซิสต์ ร่วมกับกลุ่มยาต้านบิต Toltrazuril และกลุ่มควบคุม สารละลายที่ผสมกันระหว่างสารสกัดใบกะเม็งหรือยาต้านบิตหรือน้ำกลั่นกับโอโอซิสต์ ถูกนับจำนวนโอโอซิสต์ในระยะสปอริเรเตต (sporulated oocyst) คิดคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การสปอริเรชันที่ 0 ชั่วโมง เพื่อเป็นฐานในการคำนวณหาอัตราสปอริเรชันที่เปลี่ยนแปลงไปในภายหลังที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์การสปอริเรชันของไอเมอเรียในความเข้มข้นสารแทนนินที่ 70,000 ppm สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้มากกว่ากลุ่มสารแทนนินที่ความเข้มข้นต่างกัน กลุ่มยาต้านบิต และกลุ่มควบคุม

ตามลำดับ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับทางสถิติในแต่ละกลุ่มในช่วงเวลาเดียวกันที่ 24 ชั่วโมงแรกนั้นพบว่าอัตราสปอริเรชันของโอโอซิสต์ของกลุ่มทดลองสารสกัดแทนนินจากใบกะเม็งที่ความเข้มข้น 70,000 ppm นั้นอยู่ที่ 8.53 ± 0.86 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลการสร้างสปอร์น้อยที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มความเข้มข้นสารแทนนิน 700 ppm และ 70 ppm ในช่วง 48 และ 72 ชั่วโมง อัตราสปอริเรชันของกลุ่มทดลองความเข้มข้นสารแทนนิน 70,000 ppm นั้นอยู่ที่ 12.73 ± 1.50 และ 13.87 ± 2.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการเกิดสปอริเรชันน้อยที่สุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มทดลองอื่นๆ ยกเว้นกลุ่มความเข้มข้นสารแทนนิน 7,000 ppm ในช่วงเวลาเดียวกัน ในทำนองเดียวกันนี้กลุ่มความเข้มข้นสารแทนนิน 7,000 ppm อัตราสปอริเรชันนั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มสารแทนนิน 700 70 ppm กลุ่มยาต้านบิต และกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 1) ในส่วนการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างของโอโอซิสต์พบว่าสารแทนนินที่ความเข้มข้น 70,000 ppm ยังส่งผลให้เกิดความผิดปกติของผนังโอโอซิสต์ ผนังมีลักษณะไม่เรียบขรุขระ พบการแตกออกของผนังโอโอซิสต์มากที่สุดและพบการจับกลุ่มกันของโอโอซิสต์บางส่วน (ตารางที่ 2) (รูปที่ 1)

วิจารณ์

สารสกัดใบกะเม็งนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสปอริเรชันของไอเมอเรียเนื่องจากในใบกะเม็งมีสารชนิดหนึ่งที่ชื่อว่าสารแทนนินเป็นสารประกอบที่ได้มาจากกรดฟีนอลิก (Phenolic acids) และจัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบที่เรียกว่าโพลีฟีนอล (Polyphenols) นอกจากนี้แทนนินสามารถต่อต้านปรสิตในทางเดินอาหารชนิดอื่นได้นอกจากนี้ไอเมอเรีย (Min and Hart, 2003) สารออกฤทธิ์กลุ่มนี้มีฤทธิ์ในด้านอื่นกล่าวคือฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบ

Table 1 Sporulation rate (%) of *Eimeria* oocysts at 24, 48 and 72 hours after mixing with a solution each experimental groups

Group	Sporulation rate ($\pm$ SD)		
	Time (hour)		
	24	48	72
Tannin 70,000 ppm	8.53 $\pm$ 0.86 ^a	12.73 $\pm$ 1.50 ^a	13.87 $\pm$ 2.21 ^a
Tannin 7,000 ppm	14.00 $\pm$ 1.46	16.47 $\pm$ 0.68 ^a	17.67 $\pm$ 1.15 ^a
Tannin 700 ppm	15.7 $\pm$ 0.50 ^b	24.17 $\pm$ 1.66 ^b	26.80 $\pm$ 1.42 ^b
Tannin 70 ppm	18.67 $\pm$ 1.19 ^b	29.70 $\pm$ 1.30 ^b	37.33 $\pm$ 4.45 ^b
Toltrazuril	11.63 $\pm$ 2.12	26.10 $\pm$ 2.01 ^b	30.57 $\pm$ 2.71 ^b
Control	12.90 $\pm$ 2.76	29.33 $\pm$ 2.21 ^b	31.80 $\pm$ 2.17 ^b

^{a,b}Within a column, means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$)

Table 2 Morphological change of oocysts and oocysts wall at 24, 48 and 72 hours after mixing with a solution each experimental groups

	Tannin (ppm)				Toltrazuril	Control
	70,000	7,000	700	70		
Morphological change of oocysts wall	Slight deformation and rupture of the oocysts wall					
Oocysts wall breakage (%)	6.33	5.11	3.76	2.71	4.10	2.20
Average size of oocysts (micrometer)	20.5 x	19.30 x	19.10 x	17.60 x	18.00 x	20.10 x
	15.85	15.08	14.33	14.58	16.50	17.30

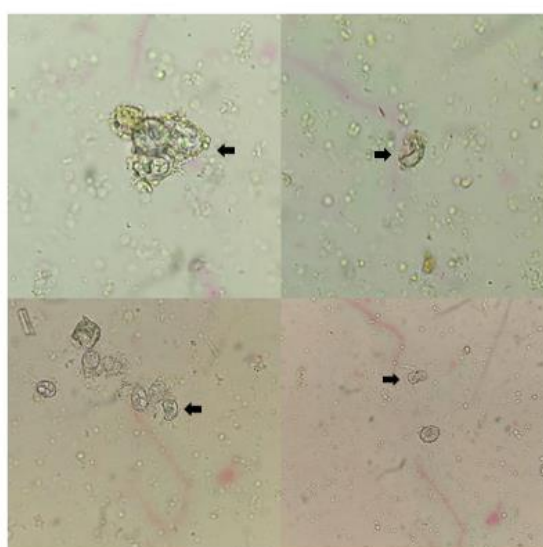


Figure 1 Deformation and rupture of the oocysts wall of Tannin 70,000 ppm group under the light microscope (40x objective)

การทำงานเหล่านี้มีความเป็นไปได้ที่อาจช่วยปกป้องเชื้อพยาธิในลำไส้จากความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Kaur *et al.*, 2008; Hamiza *et al.*, 2012) และฤทธิ์ต้านจุลชีพเนื่องจากความสามารถในการรบกวนการทำงานของเอนไซม์จุลินทรีย์ของจุลชีพและปรสิต (Scalbert, 1991; Chung *et al.*, 1998) แต่อย่างไรก็ตามขบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นในร่างกายของสิ่งมีชีวิตไม่ใช่ในหลอดทดลองเช่นการศึกษานี้ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในสิ่งมีชีวิตหรือในไก่เนื้อในฟาร์ม

อัตราการสปอร์เรชันไอเมอเรียของกลุ่มสารสกัดใบกะเม็งที่ความเข้มข้นสารแทนนิน 70,000 และ 7,000 ppm มีค่าที่ต่ำมาก ผลการวิจัยสอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานผลของสกัดสารแทนนินจากสมอติ่งต่อไอเมอเรียในไก่เนื้อซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตในระยะสปอร์เรชันที่ความเข้มข้น 500 ppm (Tonda *et al.*, 2018) ถึงแม้กลุ่มความเข้มข้นสารแทนนิน 700 ppm ซึ่งมีความเข้มข้นของสารแทนนินใกล้เคียงกันไม่สามารถยับยั้งอัตราการสปอร์เรชันได้ดีที่สุดแต่ยังให้ผลที่ดีกว่ากลุ่มควบคุม นั้นแสดงให้เห็นว่าในช่วงความเข้มข้นนี้เพียงพอในการยับยั้งการสปอร์เรชัน และจะดียิ่งขึ้นหากความเข้มข้นของสารแทนนินมีมากกว่า

สิ่งที่น่าสนใจอื่น ๆ จากการศึกษานี้พบว่าอัตราการสปอร์เรชันไอเมอเรียของกลุ่มยาต้านบิด (Toltrazuril 5 mg/kg) นั้นกลับมีอัตราที่สูงทั้งที่ยาต้านบิดชนิดนี้มีใช้กันอย่างแพร่หลายและมีประสิทธิภาพในการต้านบิดที่ดี คาดว่าสารแทนนินจากสารสกัดใบกะเม็งนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการสปอร์เรชันของไอเมอเรียนอกตัวไก่ (in vitro) หรือในระยะไอเมอเรียอยู่นอกสิ่งมีชีวิต (Sporogony stage) และออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ของโอโอซิสต์ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการก่อโรคในไก่เนื้อแต่ยาต้านบิดมีฤทธิ์ยับยั้งการสปอร์เรชันของไอเมอเรียในตัวไก่ (in vivo) ซึ่งยาต้านบิดนั้นต้องได้รับการดูดซึมภายในตัวไก่หลังจากที่ได้รับโดยการกินและถูกสะสมและเมตาบอลิซึมที่ตับจนกลายเป็นอนุพันธ์ซัลโฟน (Ponazuril) ใน

การออกฤทธิ์ยับยั้งการสปอร์เรชันของไอเมอเรีย (Plumb, 2008)

การศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาในหลอดทดลอง (in vitro) ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในสิ่งมีชีวิตหรือในไก่เนื้อในฟาร์ม หรือการทดสอบความสามารถของไอเมอเรียที่สารแทนนินทำให้เกิดความผิดปกติของผนังโอโอซิสต์และการลดลงของโอโอซิสต์ในระยะสปอร์เรชันต่อการทำให้เกิดโรค รอยโรค ปริมาณการปลดปล่อยโอโอซิสต์จากอุจจาระ (fecal shedding) รวมถึงสมรรถนะการผลิตของไก่ (performance index)

References

- SemSri, S., Kawon, T., Sukasem, J., Chanwittayanuchit, W., Nilsri, N. and Homwisetwongsa, S. 2017. Effects of kameng leaf extracts, sap suea leaves, centella asiatica and bengganu cubs on blood clotting system. *Huachiew Chalermprakiet Sci. Technol. J.* 3(2): 42-53. (in Thai)
- Allen, P.C. and Fetterer, R.H. 2002. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clin. Microbiol.* 15: 58-65.
- Atawongsa, K. 2018 (cited 3 May 2022). Kameng: Valuable Weed. Available from: http://medherbguru.gpo.or.th/articles/D38_eclipta.pdf. (in Thai)
- Aziza, A.E., Orma, O.A., Awadin, W.F. and Seady, Y.E.L. 2016. Effects of supplementation of broiler diets with fish oil and linseed oil on growth performance, cytokine, and cecal histopathological changes in broiler

- chicken infected by *Eimeria tenella*. *Int. J. Agric. Sc. & Vet. Med.* 4: 12–27.
- Chung, K.T., Lu, Z. and Chou, M.W. 1998. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food Chem. Toxicol.* 36: 1053–1060.
- Gopiesh, V. & Kannabiran, K. 2007. Larvicidal effect of *Hemidesmus indicus*, *Gymnema sylvestre*, and *Eclipta prostrata* against *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. *Afr. J. Biotechnol.* 6(3): 307–311.
- Hafez, H.M. (2008). Poultry coccidiosis: Prevention and control approach. *Eur. Poult. Sci.* 72: 2–7.
- Hamiza, O.O., Rehman, M.U., Tahir, M., Khan, R., Khan, A.Q., Lateef, A., Ali, F. and Sultana, S. 2012. Amelioration of 1,2Dimethylhydrazine (DMH) induced colon oxidative stress, inflammation and tumor promotion response by tannic acid in wistar rats. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 13: 4393–4402.
- Jaisin, Y. (2016). Ka-meng. *Thai J. Pharmacol.* 38(2): 30–47.
- Johnson, J. and Reid, W.M. 1970. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp. Parasitol.* 28: 30–36.
- Kalpna, P.R., Padma, R., Parvathy, N.G. and Renjith, V. 2013. Qualitative estimation of tannins, phenols and antioxidant activity of methanolic extract of *Imperata cylindrica*. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 4(1): 73–77.
- Kaur, G., Athar, M. and Sarwar Alam, M. 2008. *Quercus infectoria* galls possess antioxidant activity and abrogates oxidative stress induced functional alterations in murine macrophages. *Chem. Biol. Interact.* 171: 272–282.
- Kawahara, F., Zhang, G., Suzuki, T., Iwata, A. and Nagamune, K. 2014. Characterization of *Eimeria brunetti* isolated from a poultry farm in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 76: 25–29.
- Kim, D.I., Lee, S.H., Choi, J.H., Lillehoj, H.S., Yu, M.H. and Lee, G.S. 2008. The butanol fraction of *Eclipta prostrata* (Linn) effectively reduces serum lipid levels and improves antioxidant activities in CD rats. *Nutr. Res.* 28(8): 550–554.
- Min, B.R. and Hart, S.P. 2003. Tannins for suppression of internal parasites. *J. Anim. Sci.* 81(E. Suppl. 2), E102–E109.
- Plumb, D.C. 2008. Plumb's Veterinary Drug Handbook. 6th ed. Blackwell Publishing. Iowa. 1136 p.
- Quiroz-Castañeda, R.E. and Dantán-González, E. 2015. Control of avian coccidiosis: future and present natural alternatives. *BioMed Res. Int.* 2015, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/430610>.
- Sasipreeyachan, J. 2010. Disease in Poultry. 1st ed. Thana Press. Bangkok. 338 p. (in Thai)
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochem.* 30: 3875–3883.
- Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S., Tansakul, P., Cheenpracha, S. and Karalai, C. 2011. Antiinflammatory constituents from *Eclipta prostrata* using RAW264.7

macrophage cells. *Phytother. Res.* 25(9): 1313-1316.

Tonda, R., Rubach, J., Lumpkins, B., Mathis, G. and Poss, M. 2018. Effects of tannic acid extract on performance and intestinal health of broiler chickens following coccidiosis vaccination and/or a mixed-species *Eimeria* challenge. *Poult. Sci.* 97: 3031–3042.

Tsuji, N., Kawazu, S., Ohta, M., Kamio, T., Isobe, T., Shimura, K. and Fujisaki, K. 1997. Discrimination of eight chicken *Eimeria* species using the two-step polymerase chain reaction. *J. Parasitol.* 83: 966–970.

Vrba, V., Poplstein, M. and Pakandl, M. 2011. The discovery of the two types of small subunit ribosomal RNA gene in *Eimeria mitis* contests the existence of *E. mivati* as independent species. *Vet. Parasitol.* 183: 47–53.

