ผลของการใช้น้ำเม่า (*Antidesma* sp.) ต่อการต้านเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่ก่อโรคในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

Effect of Mao juice (*Antidesma* sp.) to Preventing *Streptococcus* spp. in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ณรงค์ กมลรัตน์[1*] และ พีชานิกา ชอบจิตต์[2]

Narong kamolrat[1*] and Peechanika chopjit[2]

[1]ภาควิชาเกษตรและทรัพยากร คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร 47000

[2]ภาควิชาอนามัยชุมชน คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร 47000

[1]Department of agriculture and Resources Faculty of Natural Resources and Agro-Industry Kasetsart University Chalermphrakiat SakonNakhon Province Campus 47000

[2]Department of Community Health Faculty of Public Health KasetsartUniversity Chalermphrakiat SakonNakhon Province Campus 47000

*Corresponding author: narong.ka@ku.th

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเม่าเพื่อใช้ต้านเชื้อ *Streptococcus* spp. ทำการทดสอบกับเชื้อที่ก่อโรคในปลานิล2 ชนิดคือ *S.agalactiae* และ *S.iniae* ที่ก่อให้เกิดโรคในปลานิล ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHIA ใช้สารทดสอบ 5 ชนิดคือ1.ยา Oxytetracycline 2.กรดอะซีติค 3.น้ำ 4.น้ำเม่าสด และ 5.น้ำกากเม่า บริเวณที่ต้านเชื้อ *S.agalactiae* คือ 1.43±0.05, 0, 0, 1.00±0.08 และ1.07±0.12 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนของเชื้อ *S.iniae* คือ 1.67±0.4, 0,0, 1.40±0.17 และ 1.43±0.25 เซนติเมตร ตามลำดับ พบว่าบริเวณที่ต้านเชื้อ *S.agalactiae* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับยา Oxytetracycline ในส่วนของเชื้อ *S.iniae* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) การทดสอบความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ(MIC) ทำการเจือจางน้ำเม่าที่อัตราส่วน 1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ BHIB พบความขุ่นที่ทุกระดับการเจือจางของเชื้อทั้ง 2 ชนิด แต่พบความขุ่นน้อยที่อัตราส่วน 1และ 1:2 การทดสอบกลับบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบจำนวนโคโลนีของเชื้อขึ้นในทุกระดับความเจือจาง (>300 โคโลนี) แต่จำนวนโคโลนีของเชื้อมีปริมาณจากน้อยไปมากตามระดับการเจือจางน้ำเม่า ผลการศึกษาในครั้งทำให้ทราบว่าน้ำเม่ามีความสามารถในการต้านเชื้อ *Streptococcus* spp.ได้

คำสำคัญ: เชื้อสเตรปโตคอคคัส, ปลานิล, เม่า

ABSTRACT

This study investigated the effectiveness of Mao juice for antimicrobial activity *Streptococcus* spp. was tested on two pathogenic bacteria causing disease in tilapia namely, *S.agalactiae* and *S.iniae* that caused disease in tilapia. Culture pathogen in BHIA media. There are 5 types of test compound: 1. Oxytetracycline 2. Aceticacid 3.Sterile Water 4. Mao juice and 5. Mao juice from residue.The inhibition zone

of *S.agalactiae* was 1.43 ± 0.05, 0, 0, 1.00 ± 0.08 and 1.07 ± 0.12 cm, respectively. *S.iniae* were 1.67 ± 0.4, 0.0, 1.40 ± 0.17 and 1.43 ± 0.25 cm respectively. The inhibition zone of *S.agalactiae* was statistically significantly different (P<0.05) compare with Oxytetracycline but *S.iniae* was not significant (P>0.05). [Minimal inhibitory concentration (MIC) was tested by diluting Mao juice 1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 and 1:32 in BHIB media]. Turbidity from all dilution levels of both species was observed, but low turbidity at 1 and 1: 2 dilution of Mao juice lower than another dilution. On the culture medium, the number of colonies was higher at all dilutions (>300 colonies) but number of colony shown from low to high depend on Mao juice dilution. The results of the study indicate that Mao juice have the ability to inhibit disinfection from *Streptococcus* spp.

Keywords: Mao, Nile tilapia, *Streptococcus* spp.

บทนำ

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจมากชนิดหนึ่งของประเทศไทยปลานิลเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว เพาะขยายพันธุ์ได้ง่าย ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี เกษตรกรจึงนิยมเลี้ยงไว้เพื่อบริโภคในครัวเรือนและเพื่อการค้าทั้งในประเทศและส่งออกต่างประเทศ ซึ่งในพื้นที่บริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนนิยมเลี้ยงกันมาก เช่น สกลนคร นครพนม มุกดาหาร หนองคาย เป็นต้น แต่ปัญหาที่พบในการเพาะเลี้ยงปลานิลคือ การเกิดโรคระบาด ซึ่งเป็นสาเหตุของปัญหาการเพาะเลี้ยงปลานิลทำให้ได้ผลผลิตน้อย โดยโรคหลักๆที่เกิดความเสียหายแก่ปลานิล เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียกลุ่ม *Streptococcus* spp. เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรค Streptococcosis ซึ่งเป็นโรคเรื้อรังและก่อให้เกิดการอักเสบและเกิดบาดแผลตามอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย (Pungpang *et al,* 2007) ทำให้ปัจจุบันมีการศึกษาการใช้สมุนไพรเพื่อทดแทนการใช้ยา พบว่าเม่าที่เป็นไม้ผลกลุ่มเบอรรี่ พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือผลหมากเม่าเมื่อสุกมีสีแดงไปจนถึงม่วงเข้มจากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการเม่าหลวง (*Antidesma* sp.) พบว่ามีคุณค่าของสารอาหารที่จำเป็นต่อความต้องการของมนุษย์หลายชนิด เช่น แคลเซียม (Ca) เหล็ก (Fe) สังกะสี (Zn) วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 และ วิตามิน E มีกรดอะมิโนถึง 18 ชนิด (Lokaewmanee and Sansupha, 2015) และที่สำคัญมีสารแอนติออกซิแดน (Antioxidants) ในรูป แอนโธไซยานิน (Anthocyanins) ที่แสดงผลยับยั้ง การเจริญเติบโตในเซลล์มะเร็ง กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และมีฤทธิ์ต้านเชื้อ Human Immunodeficiency Virus (HIV) (Kumklang and Sengkeaw, 2000 ; Jorjong *et al*, 2008) จึงได้ตระหนักถึงคุณสมบัติที่น่าสนใจนำมาศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการต้านทานเชื้อก่อโรคในปลานิลในการทดลองครั้งนี้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ทดสอบการต้านเชื้อ

นำเชื้อ *Streptococcus* spp. (*S.agalactiae* และ *S.iniae*) แยกได้จากปลาป่วย เจือจางใน 0.9 normal saline ให้เชื้อมีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6cfu/ml swab ลงบนเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Brain Heart Infusion Agar (BHIA) ทำการเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อในเพลทให้เป็นหลุมด้วย Cork borer ขนาด 6 มิลลิเมตร เพื่อใส่สารที่จะใช้ทดสอบ ทำการเตรียมสารทดสอบ 5 ชนิดได้แก่ 1. ยา Qxytetracycline, 2. กรดอะซีติค, 3. น้ำ 4. น้ำเม่าสด และ 5. น้ำกากเม่า ใส่สารทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20-24 ชั่วโมงหลังจากนั้นวัดเคลียร์โซนที่เกิดขึ้น

2. ทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Minimal inhibitory concentration (MIC)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว Brain Heart Infusion broth (BHIB) 1 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลอง 7 หลอดใส่น้ำเม่าสด2 มิลลิลิตรในหลอดที่1 แล้วทำการเจือจางความเข้มข้น 1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมหลอดที่ 7 ใส่ยา Qxytetracycline ความเข้มข้น 10 ppm ปริมาตร1 มิลลิลิตร หลอดที่8 ใส่น้ำเปล่า 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำเชื้อ *S.agalactiae* และ *S.iniae* ที่ทำการเจือจางไว้ 10^6cfu/ml มาใส่ในหลอดสารทดสอบ 100 ไมโครลิตร จากนั้นก็ทำงานบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20-24 ชั่วโมง แล้วทำการสังเกตการเกิดขึ้นของเชื้อ โดยดูจากความขุ่นและปริมาณตะกอน

3. ตรวจสอบการต้านเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำน้ำเม่าจากขั้นตอนMIC มาทำการ streak ลงบนเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ BHIA เพื่อดูปริมาณเชื้อที่เกิดขึ้นจากขั้นตอนการทดสอบการยับยั้งเชื้อ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส นาน 20-24 ชั่งโมง

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาการต้านเชื้อ

จากการศึกษาการต้านเชื้อ *Streptococcus* spp. โดยใช้สารทดสอบดังนี้ 1. ยา Oxytetracycline, 2. กรดอะซิติก, 3. น้ำเปล่า, 4. น้ำเม่าสด และ 5. น้ำกากเม่า ตามลำดับ พบว่าน้ำเม่าและน้ำกากเม่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ*S.agalactiae* และ *S.iniae* พบว่า *S.agalactiae* เกิดวงเคลียร์โซนขนาดความกว้างเฉลี่ย 1.43±0.05, 0, 0, 1.00±0.08 และ1.07±0.12 เซนติเมตร ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยที่ยา Oxytetracyclineให้ผลในการต้านเชื้อได้ดีที่สุด น้ำเม่า 100% และน้ำกากเม่า สามารถทำให้เกิดวงเคลียร์โซนได้แต่แตกต่างจากยาในส่วนของเชื้อ *S.iniae* เกิดวงเคลียร์โซนขนาดความกว้างเฉลี่ย 1.67$\pm$0.4, 0,0, 1.40$\pm$0.17 และ 1.43$\pm$0.25 เซนติเมตรตามลำดับ พบว่าน้ำเม่าและน้ำกากเม่าให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อเทียบกับยา Oxytetracycline ส่วนกรดอะซิติกและน้ำเปล่า ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S.agalactiae* และ *S.iniae* (Table 1)

ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration: MIC)

จากการศึกษาทดสอบเพื่อหาผล MIC ของสารทดสอบที่ทำการเจือจางน้ำเม่า 1, 1:2, 1:4,1:8, 1:16 และ1:32 ตามลำดับ โดยสังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้น เทียบผลกับสารทดสอบกลุ่มควบคุมคือยาและน้ำเปล่า พบว่าประมาณตะกอนของเชื้อ *S. agalactiae* และ *S.iniae* ทั้ง 2 ชนิดที่เกิดขึ้น มีปริมาณตะกอนจากน้อยไปมาก ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยที่ น้ำเม่าสดมีความขุ่นและตะกอนที่เกิดขึ้นน้อยที่สุด

ตรวจสอบการต้านเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการนำน้ำเม่าที่เจือจางในขั้นตอนMIC มาทำการ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHIA เพื่อหาความสามารถในการยับยั้งของสารทดสอบน้ำเม่าสด, 1:2, 1:4,1:8, 1:16 และ1:32 ตามลำดับเทียบผลกับสารทดสอบกลุ่มควบคุมคือยาและน้ำเปล่า โดยการนับปริมาณโคโลนีของเชื้อ *S.agalactiae* และ *S.iniae* ที่เกิดขึ้นพบว่ามีเชื้อขึ้นในทุกระดับความเข้มข้น ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน (เกิน300 โคโลนี) โดยที่ น้ำเม่าสด มีจำนวนของโคโลนีเชื้อ *Streptococcus* spp. ทั้ง 2 ชนิดน้อยที่สุด

จากการศึกษาการทดสอบการต้านเชื้อของน้ำเม่า ได้แก่ ยา Oxytetracycline, กรด, น้ำเปล่า, น้ำเม่าสด และน้ำกากเม่า ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าน้ำเม่ามีความสามารถในการต้านเชื้อโดยดูจากความกว้างเฉลี่ยของวงเคลียร์โซนแต่ให้ผลที่แตกต่างกันระหว่างเชื้อทั้ง 2 ชนิด โดยที่ *S.agalactiae* ให้ค่าที่แตกต่างจากยา Oxytetracycline ส่วน *S.iniae* มีความกว้างใกล้เคียงกับยา Oxytetracycline แสดงถึงความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำเม่าได้ ในส่วนการทดสอบเทียบกับกรดอะซิติก เนื่องจากเม่าเป็นผลไม้ที่มีรถเปรี้ยวเมื่อวัดค่า pH มีค่าเท่ากับ 4 จึงได้ทำการทดสอบเทียบกับ

กรดอะซิติก ให้มีค่า pH เท่ากับ 4 เพื่อดูความสามารถในการต้านเชื้อ พบว่ากรดอะซิติกไม่เกิดวงเคลียร์โซน อธิบายได้ว่าในสภาวะที่เป็นกรดไม่สามารถต้านเชื้อ *S.agalactiae* และ *S.iniae* ได้ แต่ในน้ำเม่าที่มีค่าความเป็นกรดสามารถต้านเชื้ออาจมาจากสารชนิดอื่นที่ทำให้เกิดวงเคลียร์โซนในสภาวะที่เป็นกรด

จากการทดสอบ MIC พบว่าน้ำเม่าที่ระดับความเข้มข้นต่างๆไม่มีความสามารถในการต้านเชื้อได้ โดยความเข้มข้นของน้ำเม่า 100% จะมีความขุ่นในหลอดทดลองน้อยที่สุด และ การทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีจำนวนโคโลนีน้อยที่สุด ให้ผลในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อดีที่สุดและลดลง ตามลำดับการเจือจาง ความสามารถในการต้านเชื้อเป็นผลที่เกิดมาจากสารที่ประกอบในน้ำเม่า เช่น แอนโธไซยานิน แทนนิน และ ฟลาโวนอยด์เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่ม ฟีนอลิกซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Talpur,2014) จากการทดลองของ Durdin (2009) ทำการทดสอบความไวของเชื้อ *S.agalactiae* ต่อพืชสมุนไพรด้วยวิธี Disc diffusion method โดยนำเปลือกมังคุดมาสกัดด้วยน้ำประปาที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ทดสอบกับเชื้อ *S.agalactiae* สายพันธุ์ KKU 02057 พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดสามารถต้านเชื้อ *S.agalactiae* ได้ ในเปลือกมังคุดพบสารฟีนอลิกที่สำคัญ ได้แก่ แซนโทน แทนนิน และ โปรแอนโทไซยานิน มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย และมีสรรพคุณทางยาในคนโดยใช้เป็นยาฝาดสมานแก้ท้องเสีย (Suksamrarn *et al,* 2003) และนอกจากนี้ในน้ำเม่ายังพบสารแทนนิน เป็นสารที่พบมากในพืชที่มีรสฝาด ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย จากการทดลองของ Janesantor (1998**)** ทำการทดสอบการใช้สารแทนนินยับยั้งแบคทีเรียบนเนื้อหมูด้วยสารสกัดจากเปลือกมังคุด พบว่าสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ได้ ร้อยละ 62.5เมื่อเทียบกับยา Oxytetracycline จากผลการทดสอบสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อเชื้อแบคทีเรียจะเห็นได้ว่ามีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งในเม่าและเปลือกมังคุดเป็นพืชที่มีผลสีม่วงแดงมีสารออกฤทธิ์ในกลุ่มฟีนอลิกที่คล้ายคลึงกัน แต่การทดสอบครั้งนี้เป็นการนำน้ำเม่าสดมาทำการทดสอบซึ่งในน้ำผลไม้สดมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลักและสารออกฤทธิ์มีความเจือจางเมื่อเทียบกับสารสกัดที่ถูกนำมาทดสอบ ในข้างต้น จึงมีผลทำให้ความสามารถในการต้านเชื้อได้ต่ำดังนั้นสิ่งที่ต้องดำเนินการต่อไปคือการสกัดสารจากน้ำเม่าหรือสกัดน้ำออกเพื่อให้สารออกฤทธิ์ในน้ำเม่ามีความเข้มข้นมากขึ้น

การทดสอบในครั้งนี้เป็นการทดสอบขั้นต้นเพื่อหาความสามารถในการต้านเชื้อของน้ำเม่า ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาถึงสารที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อที่แท้จริง และการนำไปประยุกต์ใช้ และควรทำการเปรียบเทียบผลซ้ำเนื่องจากปัจจัยของช่วงเวลาฤดูกาล ในแต่ละปีให้ผลต่อเม่าในระดับที่ไม่เท่ากันจึงทำให้เกิดผลที่คลาดเคลื่อนได้

สรุป

จากการทดลองพบว่าน้ำเม่ามีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *Streptococcus* spp. โดยมีความสามารถในการต้านเชื้อ และลดปริมาณเชื้อลงได้ แต่ไม่มีความสามารถในการฆ่าเชื้อ *Streptococcus* spp. ได้ ซึ่งเป็นแนวทางในการนำพืชสมุนไพรท้องถิ่นมาใช้ในการเป็นสารเพิ่มภูมิคุ้มกันและต้านเชื้อ *Streptococcus* spp. ในปลานิลได้ และยังเป็นการลดการใช้ยาปฏิชีวนะ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนงบวิจัยในครั้งนี้ ทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Durdin, A. 2009. Utilization of herbs to control *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Ms thesis. Khonkhan University, Khonkhan. (in Thai)

Janesantor, V. 1998. Effect of plant extracts containing high tannins for Inhibits the growth of bacteria causes of rotten pork. Ms thesis. Chiangmai University, Chiangmai. (in Thai)

Jorjong,S., K. Rujipot and S. Sakunku. 2008. Growth of Mao loung (*Antidesma thwaitesianum* Muell. Arg) 10 Accessions from Different Districts in Sakon Nakhon province. Available: http://www.lib.ku.ac.th/KUCONF/data53/KC4801054.pdf. Accessed Aug. 13, 2017.

Kumklang, A and W. Sengkeaw. 2000. Invented Mao products. Kurusapa Printing Ladphrao, Bangkok

Lokaewmanee, K. and S. Sansupha. 2015. Nutritive Values of Mao Pomace (*Antidesma sp*.) Agricultural Sci. J. 46 (3) (Suppl.): 569-572 (in Thai)

Pungpang,S., K. Boonprab, S. Tunkijjanukij and N. Areechon 2007. Efficiency of bacteria isolated from fish ponds on controlling of pathogenic bacteria, *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Agricultural Science Journal. 38(6), 571-580 (in Thai)

Suksamrarn, S., N. Suwannapoch, W. Phakhodee, J. Thanuhiranlert, P. Ratananukul, N. Chimnoi and A. Suksamrarn. 2003. Antimycobacterial activity of prenylated xanthones from the fruits of Garcinia mangostana. Chem. Pharm. Bull. 51 (7), 857-859. (in Thai)

Talpur,A.D. 2014. *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growthperformance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture 420-421: 71-78.

Table1 Inhibition zone of resistance efficiency's *Streptococcus* spp.

	Treatment				
Clean Zone (cm)	Oxytetracycline	Arctic Acid	Water	Mao juice	Mao residue
S.agalactiae	1.43±0.05[a]	0[c]	0[c]	1.00±0.08[b]	1.07±0.12[b]
S.iniae	1.67±0.4[a]	0[b]	0[b]	1.40±0.17[a]	1.43±0.25[a]

Different letters within a row indicate differences determined by scheffe's method at the 95 percent level of significance.