รหัสโครงการ SUT1-104-58-24-16

รายงานการวิจัย

ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงและเมทัลดีไฮด์ต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata* Lamarck)

Effects of *Plumbago indica* extract and metaldehyde on mortality of golden apple snail (*Pomacea canaliculata* Lamarck)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-104-58-24-16

รายงานการวิจัย

ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงและเมทัลดีไฮด์ต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata* Lamarck)

Effects of *Plumbago indica* extract and metaldehyde on mortality of golden apple snail (*Pomacea canaliculata* Lamarck)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นฦวรรณ เสาวคนธ์

สาขาวิชาปรีคลินิก

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤศจิกายน 2561

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงกมล แม้นศิริ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ชี้แนะ และให้ความช่วยเหลือในการศึกษาวิจัยอย่างดียิ่งตลอดมา รวมทั้งกรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมืออุปกรณ์และให้ยืมสารเคมีเบื้องต้น ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สันติ วัฒฐานะ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยจำแนกพันธุ์พืช นอกจากนี้ ขอขอบคุณนายพิเชษฐ์ มะลิกุลและนายญาณวรุตม์ คำชื่น นักศึกษาปริญญาโทและเอก สาขาวิชาปรีคลินิกที่ช่วยเหลือทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องสัตว์ทดลองศูนย์เครื่องมือกลาง 9 และศูนย์สัตว์ทดลองของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่ ในการทำวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือ 1, 9 และ 10 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่านที่เสียสละเวลา ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยด้วยดีมาตลอด ขอขอบคุณสัตว์ทดลองทุกชีวิตที่เสียสละทำให้เกิดการวิจัยในครั้งนี้ สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2558 ที่สนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นฤวรรณ เสาวคนธ์

พฤศจิกายน 2561

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

พลัมบาจินเป็นอนุพันธ์ของแนฟโทควิโนน ซึ่งพบในรากของเจตมูลเพลิงแดงสามารถต้านหอย *Biomphalaria glabrata* ซึ่งเป็นพาหะกลางให้กับพยาธิใบไม้เลือด แต่ไม่มีรายงานเกี่ยวความสามารถของเจตมูลเพลิงแดงเป็นยาฆ่าหอยเชอรี่ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata* Lamarck) โดยการวิเคราะห์การกิน อัตราการตายและพยาธิสภาพที่เปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อหอย หลังได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้น 100, 250 และ 500 mg/L ตามลำดับ เมทัลดีไฮด์ใช้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวกที่ความเข้มข้น 10 mg/L อัตราการตายของหอยและอัตราการกินของหอยตรวจสอบที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลังจากฆ่าหอยเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อนำมาย้อมด้วยวิธี H&E and PAS-Alcian blue ผลการทดลองพบว่าทั้งสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงและสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับสารสกัดกากชา มีคุณสมบัติเป็นยาฆ่าหอยที่ 96 ชั่วโมงมีค่า LC_{50} เท่ากับ 3.97 และ 2.67 ppm ในขณะที่เมทัลดีไฮด์มีค่า LC_{50} เท่ากับ 2.2 ppm อัตราการกินลดลงทุกกลุ่มที่ได้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดง เนื้อเยื่อหอย (ริ้วเหงือก, เท้าและระบบย่อยอาหาร) เกิดการหลุดลอกของเยื่อบุและมีการสะสมรงควัตถุภายในกล้ามเนื้อเท้า มีการลดทั้งความยาวและจำนวนซิเลียในริ้วเหงือก มีการเสื่อมสภาพของเซลล์ทรงแท่งและมีแวคิวโอลในเซลล์สร้างเมือกในเยื่อบุทางเดินอาหาร เยื่อบุทางเดินอาหารส่วนใหญ่หายไปและพบว่า เซลล์สร้างเมือกมีการหลั่งเมือกออกมาตามทางเดินอาหารเป็นจำนวนมากหลังได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงและเมทัลดีไฮด์ ต่อมในระบบย่อยอาหารมีแวคิวโอลและเซลล์เสื่อมสภาพเป็นจำนวนมาก ผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงต่อข้าวหอมมะลิ กข 105 ในระยะงอก โดยประเมินจากความยาวของรากและความยาวของยอดแรกเกิดและปริมาณเซลล์ที่ตาย ผลการทดลองพบว่าไม่มีผลต่อความยาวของรากและความยาวของยอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ปริมาณเซลล์ที่ตายของต้นข้าวที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้การศึกษาพิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันของเจตมูลเพลิงแดงที่เวลา 24 ชั่วโมงและ 7 วัน โดยใช้หนูแฮมสเตอร์ทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของเจตมูลเพลิงแดงพบว่า เจตมูลเพลิงแดงมีความเป็นพิษต่อหนูค่อนข้างน้อยเพราะ ปริมาณสารที่ใช้ค่อยข้างสูง โดยได้ผล LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงและ 7 วันของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงถูกจัดอยู่ในกลุ่มระดับ 5 ทั้งระยะเฉียบพลันและระยะกึ่งเฉียบพลัน จากการศึกษาครั้งนี้เสนอว่าสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงเป็นตัวเลือกอีกหนึ่งอย่างที่ใช้เป็นยาฆ่าหอยเชอรี่ และมีผลข้างเคียงต่ำทั้งในพืชและในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

The plumbagin is the naphthoquinone analogs, which is found in the *Plumbago indica* root that against *Biomphalaria glabrata*, is an intermediated host of blood fluke, but the molluscicide activity against *Pomacea canaliculata* is still not observed. Therefore, the aim of this study was evaluated the effect of crude extract of *P. indica* on mortality of golden apple snail (*Pomacea canaliculata* Lamarck) by measuring feeding rate, mortality and histopathological changes in tissues after treated with crude extract of *P. indica* at the concentration of 100, 250 and 500 mg/L, respectively. Metaldehyde was used as a positive control at 10 mg/L. Snail mortality and feeding rate of snails were daily observed at 24, 48, 72 and 96 h. After scarification, histopathological changes in tissues were evaluated by H&E and PAS-Alcian blue techniques. The results showed that both *P. indica* extracts and a combination of *P. indica* with camellia extracts had molluscicidal effects at 96 h with 50% lethal concentration (LC_{50}) at the concentration of 3.97 and 2.67 ppm, respectively, while metaldehyde had LC_{50} at a concentration of 2.2 ppm. The decreased feeding rate has occurred in *P. indica*-treated groups. Snail tissues (gill, foot, and digestive system) showed disruption of epithelium lining and accumulation with pigment in the foot muscle, reduction of the length and loss number of gill cilia, degeneration of columnar cells and numerous mucous vacuoles in digestive tract epithelium. The dominant absence epithelial lining in digestive tract was observed, and the excessive expression of mucus-secreting goblet cells secreted in the digestive luminal area after treated with crude extract or metaldehyde. The digestive gland showed severed alternation vacuolization and degeneration of cells. The effects of *P. indica* extract on germination stage of jasmine rice (*Oryza sativa* L. cv KDML 105) were investigated by primary root and shoot lengths, number of dead cells. The results showed insignificant differences in root and shoot lengths, while number of dead cells showed significant differences between *P. indica* treated group and control group. Moreover, the acute and subacute toxicities of *P. indica* extract in Golden Syrian Hamsters were investigated at 24 h and 7 days of LC_{50}. The results indicated that the toxic level of crude extract of *P. indica* in hamsters was very low because of the high dose of LC_{50}. The LC 50 was classified in category 5 in both acute and subacute toxicities. This finding suggested that *P. indica* extract is a one of choice of molluscicides against *P. canaliculata* and has very low side effect on plant and mammal.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ-ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	
ลักษณะของหอยเชอรี่	3
วงจรชีวิตของหอยเชอรี่	4
การกำจัดหอยเชอรี่	6
เจตมูลเพลิงแดง	9
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
แหล่งที่มาของข้อมูล	12
วิธีการเก็บตัวอย่างและสกัดสารจากพืชตัวอย่าง	13
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	18
บทที่ 4 ผลการวิจัย	19
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลองและบทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	48
ข้อเสนอแนะ	53
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	53
บรรณานุกรม	54
ภาคผนวก	
งานวิจัยจากโครงการนี้ได้เผยแพร่ในการประชุมระดับชาติและนานาชาติ	63
ประวัติผู้วิจัย	67

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **เรื่อง** **หน้า**

ตารางที่ 3.1 การทดสอบผลของยากำจัดหอยเชอรี่และสารสกัดสมุนไพรต่อหอยเชอรี่ระยะตัวเต็มวัย ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน..... 15

ตารางที่ 3.2 การทดสอบผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา และเมทัลดีไฮด์ต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่ระยะตัวเต็มวัย ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 16

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงและเมทัลดีไฮด์ต่ออัตราการกิน อัตราการตายของหอยเชอรี่และหาค่า LC_{50} ณ ชั่วโมงที่ 96..... 22

ตารางที่ 4.2 การทดสอบผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา และเมทัลดีไฮด์ต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่ระยะตัวเต็มวัย ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ..... 27

ตารางที่ 4.3 แสดงน้ำหนักตัวและน้ำหนักอวัยวะของหนูแฮมสเตอร์ หลังได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ณ 24 ชั่วโมงและ 7 วัน..... 42

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าผลตรวจทางห้องปฏิบัติการชีวเคมีของหนูแฮมสเตอร์ หลังได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ณ 24 ชั่วโมงและ 7 วัน..... 47

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
รูปที่ 2.1	แสดงลักษณะของหอยเชอรี่ golden apple snail, *Pomacea canaliculata* Lamarck	4
รูปที่ 2.2	แสดงวงจรชีวิตของหอยเชอรี่ และไข่หอยเชอรี่ที่ยังไม่ฟักตัวและฟักตัวออกมาจากไข่แล้ว.....	5
รูปที่ 2.3	แสดงโครงสร้างสารเคมีของ niclosamide และสารเคมีทางการค้าเป็นผงละเอียดสีเหลือง	6
รูปที่ 2.4	แสดงสารเคมี metaldehyde	7
รูปที่ 2.5	แสดงต้นชาน้ำมัน ผลชา และเมล็ดชาเพื่อมาผลิตสาร saponin	9
รูปที่ 2.6	แสดงต้น ดอก และรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงและ สูตรโครงสร้างของ plumbagin ($C_{11}H_8O_3$)	10
รูปที่ 3.1	ลักษณะของใบ ลำต้น รากและดอกของ *Plumbago indica* (*P. rosea*) ส่วนของใบและลำต้น (1), ราก (2) และดอก (3)	12
รูปที่ 3.2	แสดงการเรียงเมล็ดข้าวในจานเพาะเชื้อโดยหัวลูกศรคือส่วนของจมูกข้าว.....	17
รูปที่ 3.3	แสดงการเตรียมการแช่ข้าวในสารละลาย Evans blue และการชะล้างสารด้วยน้ำกลั่น.....	28
รูปที่ 4.1	แสดงค่าความจำเพาะของรากเจตมูลเพลิงแดง ด้วย HPLC.....	20
รูปที่ 4.2	ผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงด้วยน้ำและด้วยแอลกอฮอล์ต่ออัตราการกินของหอยเชอรี่ในระยะตัวเต็มวัย	22
รูปที่ 4.3	แสดงระบบทางเดินอาหารของหอยเชอรี่ หลังทดสอบด้วยเมทัลดีไฮด์และสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงด้วยน้ำ เมื่อย้อมสี Hematoxylin และ Eosin	24
รูปที่ 4.4	แสดงส่วนทางเดินอาหารและริ้วเหงือกของหอยเชอรี่ หลังทดสอบด้วยเทมัลดีไฮด์และสารสกัด เจตมูลเพลิงแดงด้วยน้ำเมื่อย้อมสี PAS-Alcian blue pH2.5.	25
รูปที่ 4.5	แสดงหลอดอาหารของหอยเชอรี่ หลังทดสอบด้วยสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยแอลกอฮอล์ร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อย้อมสี Hematoxylin และ Eosin.....	28
รูปที่ 4.6	แสดงกระเพาะอาหารของหอยเชอรี่ หลังทดสอบด้วยสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยแอลกอฮอล์ร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อย้อมสี Hematoxylin และ Eosin.....	30

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
รูปที่ 4.7	แสดงลำไส้ของหอยเชอรี่ หลังทดสอบด้วยสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยแอลกอฮอล์ร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อย้อมสี Hematoxylin และ Eosin	31
รูปที่ 4.8	แสดงต่อมทางเดินอาหาร (digestive gland) ของหอยเชอรี่ หลังทดสอบด้วยสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยแอลกอฮอล์ร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อย้อมสี Hematoxylin และ Eosin	34
รูปที่ 4.9	แสดงริ้วเหงือกของหอยเชอรี่ หลังทดสอบด้วยสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยแอลกอฮอล์ร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อย้อมสี Hematoxylin และ Eosin สัปดาห์	35
รูปที่ 4.10	แสดงกล้ามเนื้อเท้า (foot muscle : M) และผิว (epidermis : Ep) ของหอยเชอรี่ หลังทดสอบด้วยสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยแอลกอฮอล์ร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อย้อมสี Hematoxylin และ Eosin	36
รูปที่ 4.11	แสดงค่าเฉลี่ยความยาวของรากและความยาวยอด หลังจากแช่สารทดสอบการงอกและการเจริญของลำต้น	38
รูปที่ 4.12	แสดงลักษณะของต้นข้าวที่งอกหลังจากแช่สารที่ทดสอบการงอกและการเจริญของลำต้นเป็นเวลา 7 วัน	39
รูปที่ 4.13	แสดงค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ของสีย้อม Evans blue	40
รูปที่ 4.14	แสดงพยาธิสภาพของตับของสัตว์ทดลองหลังได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 24 ชั่วโมง	43
รูปที่ 4.15	แสดงพยาธิสภาพของไตของสัตว์ทดลองหลังได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 24 ชั่วโมง	44
รูปที่ 4.16	แสดงพยาธิสภาพของอวัยวะสืบพันธุ์เพศชายของสัตว์ทดลองหลังได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 24 ชั่วโมง	45
รูปที่ 4.17	แสดงพยาธิสภาพของอวัยวะสืบพันธุ์เพศหญิงของสัตว์ทดลองหลังได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 24 ชั่วโมง	45

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจและอาหารหลักคนไทย แต่ละปีมีการปลูกข้าวเพื่อบริโภคในประเทศและเพื่อการส่งออกมีมูลค่านับหลายล้านๆบาท การแพร่กระจายและระบาดของหอยเชอรี่กลายเป็นศัตรูที่สำคัญของทั้งในนาข้าวและสวนผักผลไม้ โดยมีรายงานการระบาดของหอยเชอรี่ในนาข้าว ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2531 (ชมพูนุชและคณะ, 2549) โดยทำความเสียหายแก่ต้นข้าวที่ปักดำใหม่และต้นข้าวที่เริ่มงอก เนื่องจากหอยกัดกินส่วนต่างๆ ของต้นข้าว ทั้งราก ลำต้น ใบ ทำให้การเจริญเติบโตของต้นข้าวชะงักลง เนื่องจากหอยเชอรี่ มีการเจริญแพร่พันธุ์อย่างรวดเร็ว ทำให้มีการระบายของหอยเชอรี่ในแปลงนาข้าวมากกว่า 65 จังหวัด ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมาในประเทศไทย (ชุมพูนุช, 2540) ปัจจุบันทั้งในประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้าน เช่น ฟิลิปินส์ มาเลเซีย อินโดนิเซีย จีน และประเทศอื่นๆ ในอาเซียนพบว่ามีการแพร่กระจายของหอยเชอรี่ไปทั่ว และมีรายงานความเสียหายต่อเนื่องกันตลอดมา (Naylor, 1996) การแพร่กระจายของหอยเชอรี่ส่งผลเสียหายต่อเกษตรกรอย่างมาก ดังนั้นจึงมีการรณรงค์ป้องกัน ควบคุมและกำจัดอย่างจริงจัง ได้มีงานวิจัยด้านการป้องกันกำจัดหอยเชอรี่โดยแนะนำสารเคมีฆ่าหอย (molluscicides) และยาฆ่าแมลงเป็นวิธีที่นิยมใช้กันทางประเทศแถบเอเชีย แต่พบว่ามีผลกระทบต่อระบบนิเวศน์สัตว์น้ำ เกิดสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมและมนุษย์ (Duke et al., 2010; Joshi, 2005; Joshi, 2008; Liu et al., 2006 และ Wu et al., 2010) ซึ่งชมพูนุทและคณะ (2549) ได้ทดสอบสาร niclosamide, metaldehyde และ copper sulphate (Joshi, 2005) และได้แนะนำให้ใช้ในการกำจัดหอยเชอรี่มาแล้ว แต่มีพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม อีกทั้งหอยเชอรี่มีการทำลายสารพิษในร่างกายของมัน เพื่อให้มีพิษน้อยลงภายในตัวหอย ทำให้ต้องใช้สารเคมีในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นหรือใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์ที่รุนแรงมากขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนในการทำนาแก่เกษตรกรและมีอันตรายต่อเกษตรกรมากขึ้น ในระยะต่อมามีความพยายามลดการใช้สารเคมีต่างๆ ลง สารสกัดจากพืชหลายๆชนิดที่มีฤทธิ์ใช้ฆ่าหอยเชอรี่หรือยับยั้งการแพร่พันธุ์ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ไม่ทำให้สิ่งแวดล้อมเปลี่ยนไป ชมพูนุทและคณะ (2539) ได้ทดสอบสารสกัดจากพืช 3 ชนิด คือ ใบของเทียนหยด (Golden Dewdrop, *Duranta repens* L.) ต้นและใบของมะไฟนกคุ่ม (*Ammonnia baccifera*) และผลของประคำดีควาย (Soapberry tree, *Sapindus emarginatus* Wall.) กับหอยเชอรี่ พบว่าใน 24h สารสกัดต่อน้ำ 8 L ทำให้หอยตายสูงสุด คือ ประคำดีควาย, เทียนหยด และมะไฟนกคุ่ม โดยใช้ปริมาณเท่ากับ 0.6, 6 และ 8 g/ น้ำ 8 L ทำให้หอยตายสูงสุด 75.56%, 75.56% และ 64.44% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยใช้สารสกัดจากกากชา (tea seed, Camellia sp.) และสะเดาในการกำจัดหอยเชอรี่พบว่ากากเมล็ดชา ทำให้หอยเชอรี่ตาย 97.78% ภายหลังได้รับสาร 48 h ในห้องปฏิบัติการ (ชมพูนุชและคณะ, 2538) เนื่องจากทำให้เซลล์เม็ดเลือดของหอยแตก (Hostettman et al., 1982) และทำให้ผนังเซลล์ของอวัยวะภายในหอยเชอรี่แตกและตายในที่สุด (ปราสาททองและชมพูนุช, 2546) ผลการทดสอบสารสกัดจากสะเดา (*Azadiracta indica*) สำเร็จรูปกับหอยเชอรี่ พบว่า ภายหลังใส่สาร 72 h ที่ความเข้มข้น 2 และ 3 ppm ทำให้หอยตาย 73–100 % แต่ผลการทดลองในแปลงนาทดลอง ต้องใช้ความเข้มข้น 6 และ 9 ppm จึงจะทำให้หอยตาย 70–80% เท่ากับในห้องปฏิบัติการ (อัญชลีกร, 2542) เนื่องจากไปยับยั้งการกิน

การทำงานของระบบประสาท ทำให้สัตว์ตายในที่สุด (ชัยพัฒน์, 2539) นอกจากนี้ยังมีพืชอีกหลายชนิดที่มีการศึกษาเพื่อใช้เป็นสมุนไพรฆ่าหอยเชอรี่ เช่น ส่วนแกนของมะละกอ ฝักคูณ มะขาม ดอกลำโพง ยี่โถ หนอนตายหยากและหัวแห้วหมู เป็นต้น

พลัมบาจิน (plumbagin) เป็นสารสกัดบริสุทธิ์ได้จากรากเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica*) ซึ่งมีรายงานว่าให้ผลต่อการฟักตัวของพยาธิตัวกลม *Haemonchus contortus* และ *Ascaris suum* (Fetterer and Fleming, 1991) และมีผลต่อการเคลื่อนไหวของพยาธิตัวกลม *Caenorhabditis elegans* และพยาธิตัวแบน *Schistosoma mansoni* (Atjanasuppat et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า naphthoquinones ซึ่ง plumbagin เป็นอนุพันธ์ของ naphthoquinones สามารถฆ่าหอย *Biomphalaria glabrata* ในระยะตัวเต็มวัยได้ (Ribeiro et al., 2009) ซึ่งหอยชนิดนี้เป็นสัตว์พาหะของพยาธิ *S. mansoni* ดังนั้น plumbagin น่าจะมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยากำจัดหอยเชอรี่ได้เช่นกัน

จากการนำสารสกัดทางธรรมชาติมาประยุกต์ใช้โดยนำมาควบคุม กำจัดหอยเชอรี่เป็นการไม่ทำลายระบบนิเวศน์ ลดการใช้สารเคมีและยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของทรัพยากรที่มีอยู่ให้เกิดประโยชน์สูงสุด ลดต้นทุนทางการเกษตรและเป็นการต่อยอดองค์ความรู้ที่มีอยู่นำมาใช้กับประเทศ ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดง และสารเสริมฤทธิ์ต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata* Lamarck) และเนื่องจากนำสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงในการประยุกต์ใช้เป็นยาฆ่าหอย จึงต้องมีรายงานการศึกษาความเป็นพิษของเจตมูลเพลิงแดงต่อพืชและสัตว์

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.1 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงและเมทัลดีไฮด์ ต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่

1.2 เพื่อศึกษาหาค่า LC_{50} ของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงที่มีผลต่อการตายของหอยเชอรี่

1.3 เพื่อศึกษาผลกระทบของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงต่อหนูแฮมสเตอร์

ขอบเขตของโครงการวิจัย

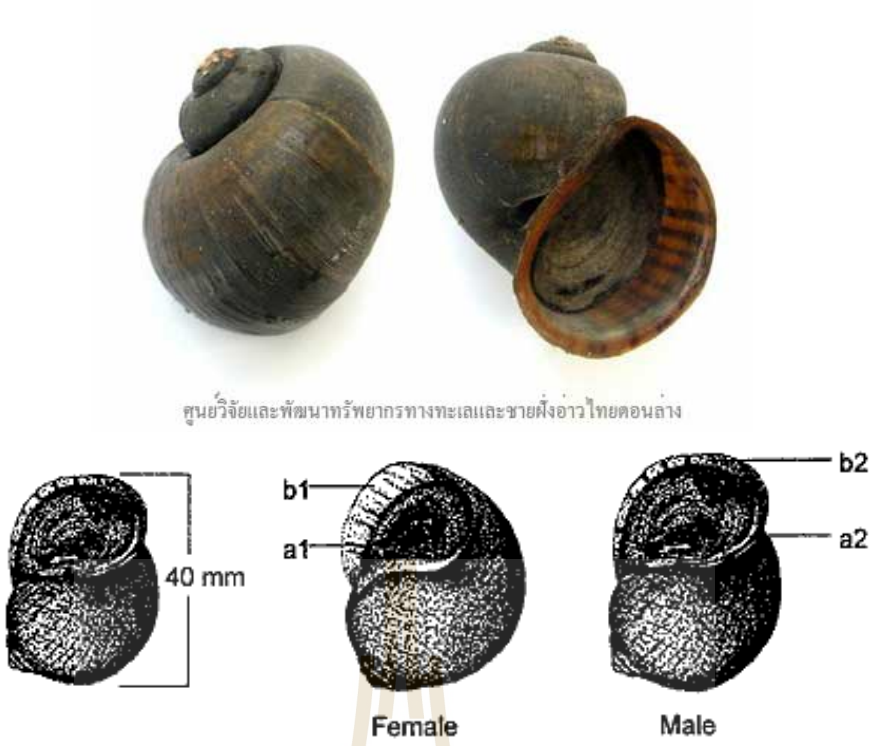
ในการวิจัยครั้งนี้ จะทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงและเมทัลดีไฮด์ต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่ในหลอดทดลอง ด้วยการวัดอัตราการตายของหอยเชอรี่ระยะตัวเต็มวัยหลังจากสัมผัสสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงและหาค่า LC_{50} เพื่อใช้เป็นเกณฑ์อ้างอิงในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบทางเดินอาหารของหอยเชอรี่หลังการทดลอง โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ปราศจากสารเคมี โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ส่วนการศึกษาผลกระทบของสารสกัดต่อสัตว์ที่ไม่ใช้เป้าหมาย โดยใช้หนูแฮมสเตอร์ทดสอบกับสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดง เพื่อหาร้อยละการตายของสัตว์ทดลองตาม Abott's formula (Matsumura, 1967) โดยใช้ค่าสถิติ one-way ANOVA ที่ความน่าเชื่อถือ 95% ด้วยโปรแกรม SPSS software การติดตามผลของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงต่อระยะการงอกของข้าวหอมมะลิ จะทำโดยการตรวจวัดหาความยาวรากและความยาวยอดและการตรวจวัดเซลล์ที่ตาย

บทที่ 2
วรรคกรรมทบทวน

หอยเชอรี่หรือมีชื่อเรียกอื่น ๆ ได้แก่ หอยโข่งอเมริกาใต้ หอยเป๋าฮื้อน้ำจืด หอยโข่งเหลือง หอยโข่งอเมริกาใต้ ซึ่งในประเทศฟิลิปปินส์เรียกโกลเด้น คูฮอล (*Pomacea canaliculata*, Lamarck) ถูกนำเข้าสู่ฟิลิปปินส์ระหว่างปี 2525 – 2527 โดยมาจากประเทศในทวีปอเมริกาใต้ (บราซิล และ อาร์เจนตินา) โดยผ่านทางประเทศไต้หวัน เนื้อหอยเชอรี่นับว่ามีคุณค่าทางอาหารสูงสำหรับมนุษย์และสัตว์เลี้ยง จึงเป็นที่สนใจของทั้งภาครัฐและเอกชนที่ต้องการนำเข้ามาเลี้ยงและขยายพันธุ์ต่อไป แต่เพียงไม่กี่ปีหลังจากนั้นก็พบว่าหอยเชอรี่กลายเป็นศัตรูข้าวที่สำคัญไปเสียแล้ว บริเวณที่มีการปลูกข้าวในฟิลิปปินส์คิดเป็นเนื้อที่ประมาณ 3 ล้านเฮคตาร์นั้น ถูกหอยเชอรี่ระบาดทำความเสียหายไปถึง 1.2 – 1.6 ล้านเฮคตาร์ (Joshi, 2005; Joshi, 2008) ซึ่งในปี 2532 องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติได้ประมาณไว้ว่า หอยเชอรี่ทำให้ผลผลิตข้าวในประเทศฟิลิปปินส์สูญเสียอย่างมหาศาลไปถึง 1 – 40% ของทั้งประเทศ และในปี 2533 มีการใช้เงินถึง 212 ล้านเปโซ เพื่อที่จะป้องกันกำจัดมัน มีรายงานการระบาดของหอยเชอรี่เป็นครั้งแรกในประเทศไทยปี 2529 เมื่อพบว่านาข้าวเขตชลประทานของเขต 2 (Cagayan valley) ถูกหอยทำลายอย่างหนักและนับแต่นั้นมา นาข้าวแหล่งอื่นๆ ก็ถูกหอยทำความเสียหายเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนกลายเป็นเรื่องสำคัญระดับชาติไป (Kaewjam, 1987) การจะป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดนี้ เกษตรกรส่วนใหญ่ใช้สารเคมีฆ่าหอย ซึ่งมีราคาแพงและมีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม รวมทั้งสิ่งมีชีวิตอื่นๆ และตัวผู้ใช้เอง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องเสนอทางเลือกทางอื่นๆ เพื่อแนะนำเกษตรกรเพิ่มเติมในการป้องกันและกำจัดหอยเชอรี่ มีการค้นคว้าทดลองและงานวิจัยใหม่ๆ เพื่อที่จะลดการใช้สารฆ่าหอยแบบผิดประเภทดังเช่นที่เคยเป็นอยู่

ลักษณะของหอยเชอรี่

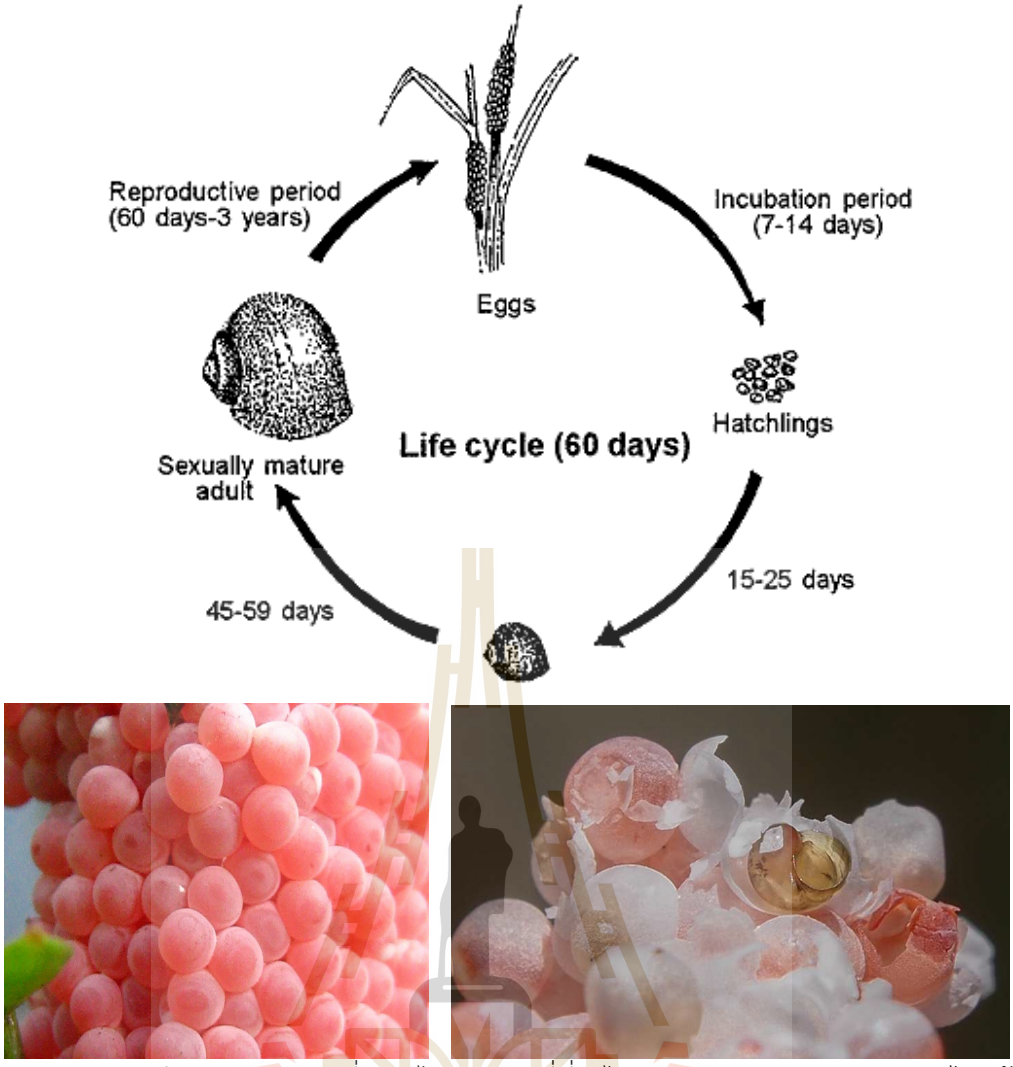
หอยเชอรี่เป็นหอยฝาเดียวน้ำจืด (fresh snail) จัดอยู่ใน Family Ampullariidae และ Genus *Pomacea* sp. ในประเทศไทยมีหอยเชอรี่ที่ระบาดในนาข้าว เช่น *Pomacea canaliculata* Lamarck, *P.insularus* และ *Pomacea* sp. (Kaewjam, 1987; Kaewjam and Upatham, 1990) ลักษณะเปลือกเป็นหอยวนขวา แต่ก็พบบางที่วนซ้าย มีชีวิตยืนยาวได้ 2 – 6 ปี และมีความสามารถในการขยายพันธุ์สูง เปลือกสีน้ำตาล เนื้อสีขาวครีมไปจนเหลืองส้ม ขนาดขึ้นกับการกินอาหาร ขนาดใหญ่สามารถกัดทำลายต้นข้าวได้มาก เมื่อหอยมีเปลือกสูง 10 มิลลิเมตร (ขนาดเท่าเมล็ดข้าวโพด) ถึง 40 มิลลิเมตร (เท่าลูกปิงปอง) หอยเพศเมียจะมีฝาปิดที่เว้าเข้า (รูปที่ 2.1) ในตัวผู้จะนูนออกเล็กน้อย (รูปที่ 2.1) ส่วนเปลือกหอยตัวเมียที่โตเต็มวัยแล้วจะโค้งเข้าด้านใน ในตัวผู้จะโค้งออก ตามการศึกษาของ เดลา ครูซ, อาร์ซี โจชิ, และ เอ อาร์ มาร์ติน (ที่มา Ghesquiere, 2000a. อ้างอิงจาก www.applesnail.net)



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของหอยเชอรี่ golden apple snail, *Pomacea canaliculata* Lamarck (ที่มา www.smcrrc.go.th และ http://www.applesnail.net)

วงจรชีวิต

หอยเชอรี่ระยะตัวเต็มวัยจับคู่ผสมพันธุ์ประมาณ 1-2 วัน หลังจากนั้นหอยตัวเมียวางไข่เวลากลางคืนตามต้นพืช ใบไม้ และสิ่งของต่าง ๆ (เช่น กิ่งไม้ ไม้หลัก ก้อนหิน) ที่อยู่เหนือผิวน้ำ โดยหอยจะวางไข่ได้ครั้งละ 300-3,000 ฟอง กลุ่มไข่ที่ออกมาใหม่ๆ มีลักษณะนิ่ม มีสีชมพูสดและมีเมือกติดอยู่ที่ไข่ และจะซีดจางลงเป็นสีชมพูอ่อนและขาวเมื่อใกล้ฟักเป็นตัว เปลือกไข่จะแตกออกเป็นลูกหอยร่วงลงสู่แหล่งน้ำ ไข่ฟักเป็นตัวภายใน 7 – 14 วัน หลังจากนั้นลูกหอยจะเจริญเติบโตเป็นหอยเชอรี่ในระยะตัวเต็มวัยต่อไป (รูปที่ 2.2) หอยเชอรี่กินพืชได้หลายชนิด เช่น สาหร่าย, แหนแดง, แหน, ผักตบชวา, พืชน้ำที่มีใบอวบน้ำและต้นข้าวระยะกล้าโดยเฉพาะต้นข้าวในระยะกล้าและที่ปักดำใหม่ ๆ ไปจนถึงระยะแตกกอ หอยเชอรี่มันจะชอบกินต้นข้าวในระยะกล้าที่มีอายุประมาณ 10 วัน มากที่สุด (ชมพูนุชและคณะ, 2532) เนื่องจากมันกินด้วยอวัยวะที่คล้ายลิ้นอันขรุขระ ขูดไปมาบนผิวพืชส่วนลำตัวที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม โดยเริ่มกัดส่วนโคนต้นที่อยู่ใต้น้ำเหนือจากพื้นดิน 1 – 1.5 นิ้ว จากนั้นกินส่วนใบที่ลอยน้ำจนหมด ใช้เวลากินทั้งต้นทั้งใบ นานประมาณ 1-2 นาที นอกจากนี้มันยังกินซากพืชสัตว์ที่เน่าเปื่อยเป็นอาหาร สามารถกินได้รวดเร็ว เฉลี่ยวันละ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว และกินได้ตลอด 24 ชั่วโมง ในเวลากลางวันที่มีแดดจัดจะหลบอยู่ใต้ร่มเงาของพืชน้ำต่าง ๆ หรืออาศัยอยู่ใต้ร่มเงาของต้นไม้ใหญ่ริมแหล่งน้ำหรือนาข้าวนั้น ๆ แล้วกินอาหารตลอดเวลา หอยจะฝังตัวในดินชื้นระหว่างฤดูแล้ง มันสามารถพักตัวหรือจำศีลได้นาน 6 เดือน เมื่อดินถูกน้ำท่วม หอยจะกลับสู่สภาวะปกติเช่นเดิม



รูปที่ 2.2 แสดงวงจรชีวิตของหอยเชอรี่ และไข่หอยเชอรี่ที่ยังไม่ฟักตัวและฟักตัวออกมาจากไข่แล้ว (ที่มา www.applesnail.net และ www.photo-cm.com)

การเป็นพาหะนำโรค เนื่องจากหอยเชอรี่อยู่ในวงศ์เดียวกับหอยโข่ง (*Pila* sp.) จึงอาจเป็นเจ้าบ้านตัวกลาง (intermediate host) ของหนอนพยาธิตัวกลม (nematode) เช่นเดียวกับหอยโข่ง นั่นคือพยาธิ *Angiostrongylus cantonensis* ซึ่งผ่านเข้าสู่คนโดยการกินเนื้อหอยสุกๆดิบๆ เช่น พล่า หรือยำหอย ถ้าหอยมีพยาธิอยู่ ตัวอ่อนระยะที่ 1 ของพยาธิก็เข้าสู่คน ถ้าหากไปอยู่ที่สมองจะมีอาการเยื่อหุ้มสมองบวมอักเสบ (Eosinophilic meningo-encephalitis) คือ ปวดศีรษะ ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน คอแข็ง มีอัมพาตของส่วนใดส่วนหนึ่ง ถ้าพยาธิไชเข้าสู่ดวงตาก็ทำให้ตาบอด นอกจากนี้ยังอาจเป็นตัวนำเจ้าบ้านตัวกลางของหนอนพยาธิ *Echinostoma ilocanum* ซึ่งเป็นพยาธิใบไม้ในลำไส้ เมื่อคนกินหอยที่มีตัวอ่อนพยาธิเข้าไปจะเกิดอาการระคายเคืองของกระเพาะอาหารและลำไส้ เช่น ปวดท้อง ท้องเดิน เช่นเดียวกับการบริโภคหอยโข่ง นอกจากนี้ยังมีรายงานพบตัวอ่อนระยะ cercaria ของพยาธิใบไม้เลือด *Schistosomes* spp. และพบระยะ metacercaria ของพยาธิใบไม้ชนิดอื่นๆ ในกล้ามเนื้อเท้า ไต และหัวใจของหอยเชอรี่ (Keawjam et al., 1993)

วิธีการกำจัดหอยเชอรี่ แบ่งออกเป็น 4 แบบหลักๆ คือ การใช้ศัตรูธรรมชาติ ใช้วิธีทางธรรมชาติ โดยไม่ใช้สารเคมี กำจัดโดยใช้สารเคมีและกำจัดโดยวิธีชีววิธีหรือสารสกัดจากพืช

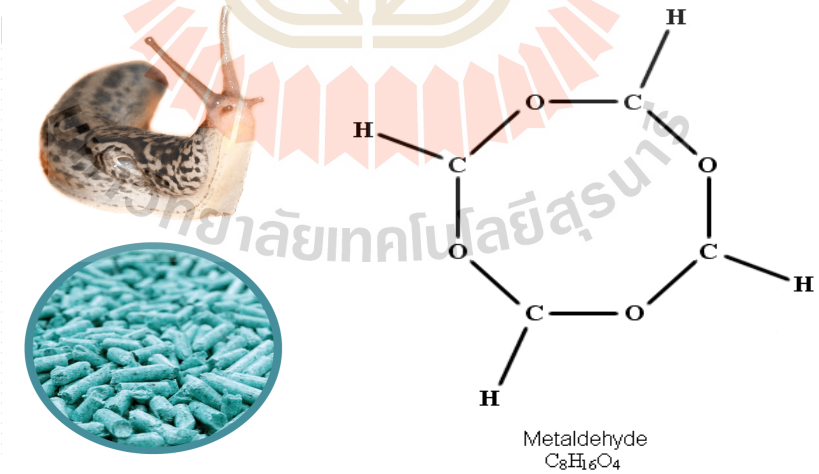
1. ศัตรูธรรมชาติของหอยเชอรี่โดยทั่วไปได้แก่ นกปากห่าง นกกระปูด หนูในนา เป็ด และ แมลง เช่น มดแดงกินไข่หอยเชอรี่ และตัวอ่อนแมลงปอ จับกินลูกหอย หรือแม้กระทั่งมนุษย์ก็นำเนื้อหอยมากิน
2. วิธีทางธรรมชาติ คือเก็บหอยเชอรี่ไปทำลาย โดยการใช้เหยื่อล่อ เครื่องดักและกั้น หรือใช้ไม้ปัก เพื่อหลอกให้หอยวางไข่
3. กำจัดโดยใช้สารเคมีจากการแนะนำของกองกีฏและสัตววิทยา กรมวิทยาการเกษตร ได้แนะนำให้ใช้สารเคมีดังต่อไปนี้

    3.1 *นิโคลซาไมด์ (niclosamide)* (รูปที่ 2.3) ชื่อทางการค้าว่า (ไบลูไซด์ : bayluside 70% WP) เป็นผงละเอียดสีเหลืองนำมาผสมน้ำในอัตราส่วน 50 g/raiหรือ160 ml/rai ผสมกับน้ำแล้วฉีดพ่นในนาข้าวที่มีระดับน้ำสูงไม่เกิน 5 cm พบว่ามีพิษต่อปลานิล ตะเพียนขาวและกุ้งก้ามกราม โดยมีค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมงเท่ากับ 0.47, 0.30 และ 0.80 ตามลำดับ (นนทวิทย์, 2540) สารนิโคลซาไมด์จะสลายไปเอง ภายใน 3-4 วัน โดยไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำ

รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างสารเคมีของ niclosamide และสารเคมีทางการค้าเป็นผงละเอียดสีเหลือง (ที่มา www.tjskl.org.cn)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 *สารเคมีเมทัลดีไฮด์ (metaldehyde : 2,4,6,8- tetramethyl-1,3,5,7-tetraoxycolo-octane)* (รูปที่ 2.4) ชื่อการค้า แองโกลสลัก เป็นเหยื่อพิษในรูปอัดเม็ดหรือที่เรียกว่า เดทมีล ซึ่งใช้ฆ่าหอยทากบกและทากที่เป็นศัตรูพืชผัก ใช้หว่านในนาข้าว อัตรา 0.5 kg/rai และมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดหอยเชอรี่ โดยทำให้หอยเกิดการระคายเคืองเมื่อกินอาหารเหยื่อพิษเข้าไป ซึ่งไปกระตุ้นให้มีการสร้างเมือกในปริมาณมาก ทำให้สูญเสียน้ำและเป็นพิษต่อระบบประสาทของหอย (Godan, 1983) เมื่อหอยกินเมทัลดีไฮด์เข้าไปจะเปลี่ยนเป็น อะเซทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) โดยกรดและจุลินทรีย์ภายในทางเดินอาหาร ซึ่งอะเซทัลดีไฮด์ทำให้หอยตื่นเต้น แล้วผลิตเมือก หลังจากนั้นจะสูญเสียการเคลื่อนไหวต่างๆ เกิดจากกล้ามเนื้อหดเกร็งเป็นอัมพาตในที่สุด สารเมทัลดีไฮด์สลายตัวง่ายภายใน 1-2 วัน จึงไม่ค่อยมีสารตกค้างทั้งในน้ำและในพืช ในขณะที่มีพิษต่อมนุษย์และสัตว์น้ำต่ำมากคือ LD_{50} ในระยะเฉียบพลันเมื่อให้ทางปาก ในหนูขาวเท่ากับมากกว่า 5,000 mg/kg และทางผิวหนังมากกว่า 2,000 mg/kg นับว่าความเป็นพิษต่อมนุษย์ค่อนข้างต่ำ ส่วนในสัตว์น้ำ สาหร่าย นก และไส้เดือนพบว่า metaldehyde มีพิษค่อนข้างต่ำมาก ทางหน่วยงานรายการแนะนำให้เกษตรกรใช้เดทมีลเพื่อกำจัดหอยเชอรี่ ในแหล่งน้ำ คลองชลประทานและจากรายงานในประเทศเวียดนามที่ใช้เดทมีลในอัตรา 1-4 kg/rai สามารถฆ่าหอยเชอรี่ได้ โดยไม่เป็นอันตรายต่อลูกปลานิลขนาดเล็ก (อนุสรณ์ และศุภชัย, 2542)



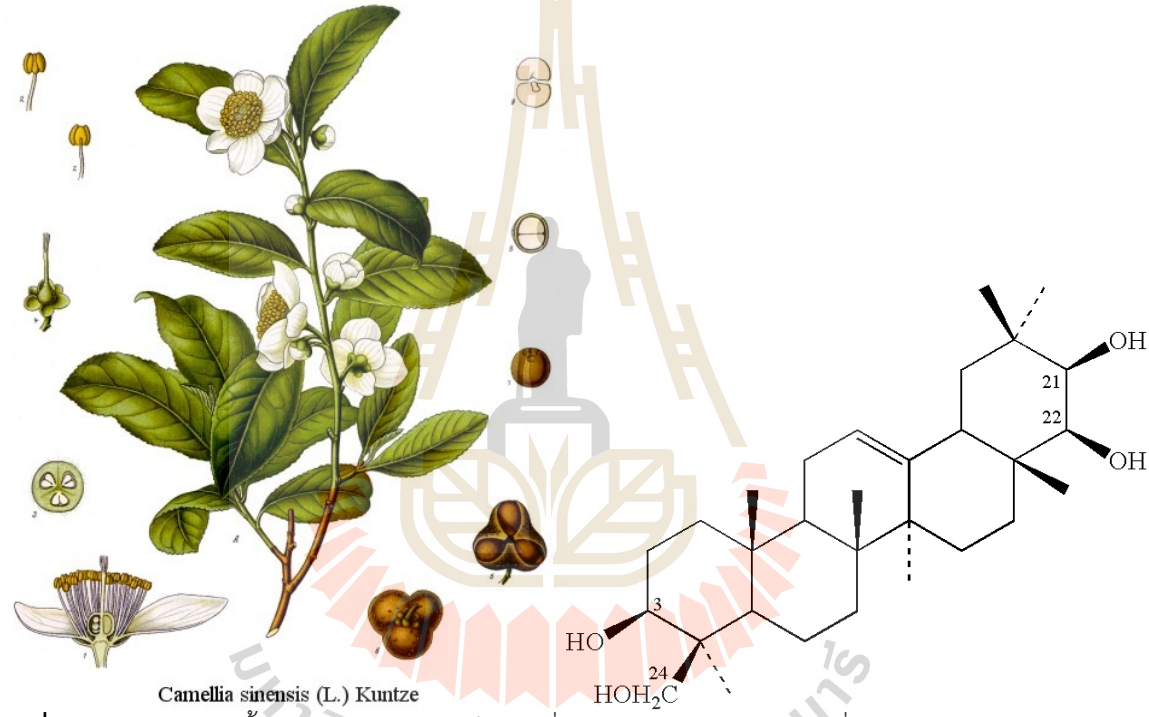
รูปที่ 2.4 แสดงสารเคมี metaldehyde (ที่มา www.compoundchem.com/2015/03/12/slug-pellets)

3.3 *สารคอปเปอร์ซัลเฟต* (จุนสี) ชนิดผงสีฟ้าเป็นสารที่ใช้ป้องกันและกำจัดหอยเชอรี่ได้เป็นอย่างดี มีประสิทธิภาพสูง ราคาถูกและไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม โดยใช้สารนี้ในอัตรา 1 กิโลกรัม/ไร่ ละลายน้ำแล้วฉีดพ่นด้วยเครื่องพ่น กลไกการออกฤทธิ์ ทำให้หอยเป็นอัมพาต โดยกล้ามเนื้อขาจะยืดออกไม่สามารถหดกลับเข้าไปในเปลือกได้ ทำให้เคลื่อนไหวไม่ได้ เนื่องจากไปออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetyl cholinesterase ทำให้หอยเป็นอัมพาตและตายในที่สุด (วิยะดา, 2535)

4. วิธีกำจัดโดยใช้สารสกัด

ได้มีการศึกษาโดยใช้สารสกัดจากพืชในการกำจัดหอยเชอรี่ จากต้นเทียนหยด มะไฟคุ่ม ผลประคำดีควาย ต้นลำโพง มะขาม สะเดา ผกากรอก ฟักคูณ กากเมล็ดชาและแห้วหมู (ชมพูนุชและคณะ, 2549; ชมพูนุชและคณะ, 2552 ; ปราสาททองและคณะ, 2545; Ramthum et al.,2001) โดยสารสกัดที่นิยมใช้กัน ณ ปัจจุบันคือกากเมล็ดชา(น้ำมัน) เป็นโครงการป้องกันกำจัดหอยเชอรี่ในพื้นที่นาข้าวแปลงสาธิตการทำนาในที่ดินของมูลนิธิชัยพัฒนา จ.พิษณุโลก เป็นการตอบสนองตามพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ที่มีพระราชดำริให้ดำเนินการทดลองการป้องกันกำจัดหอยเชอรี่ในพื้นที่ดินของมูลนิธิชัยพัฒนาเพื่อช่วยเกษตรกร (ที่มา http://www.chaipat.or.th/intranet/project) และประคำดีควาย เนื่องจากพืชทั้งสองชนิดนี้มีองค์ประกอบของสารซาโปนินอยู่ร้อยละ 10 -13 แต่กากเมล็ดชาส่งผลต่อสัตว์น้ำที่ไม่ใช่เป้าหมาย เช่น ลูกปลา กุ้ง กบ และเขียด ตายด้วย จึงเป็นข้อจำกัดของการใช้กากชาในแปลงนา

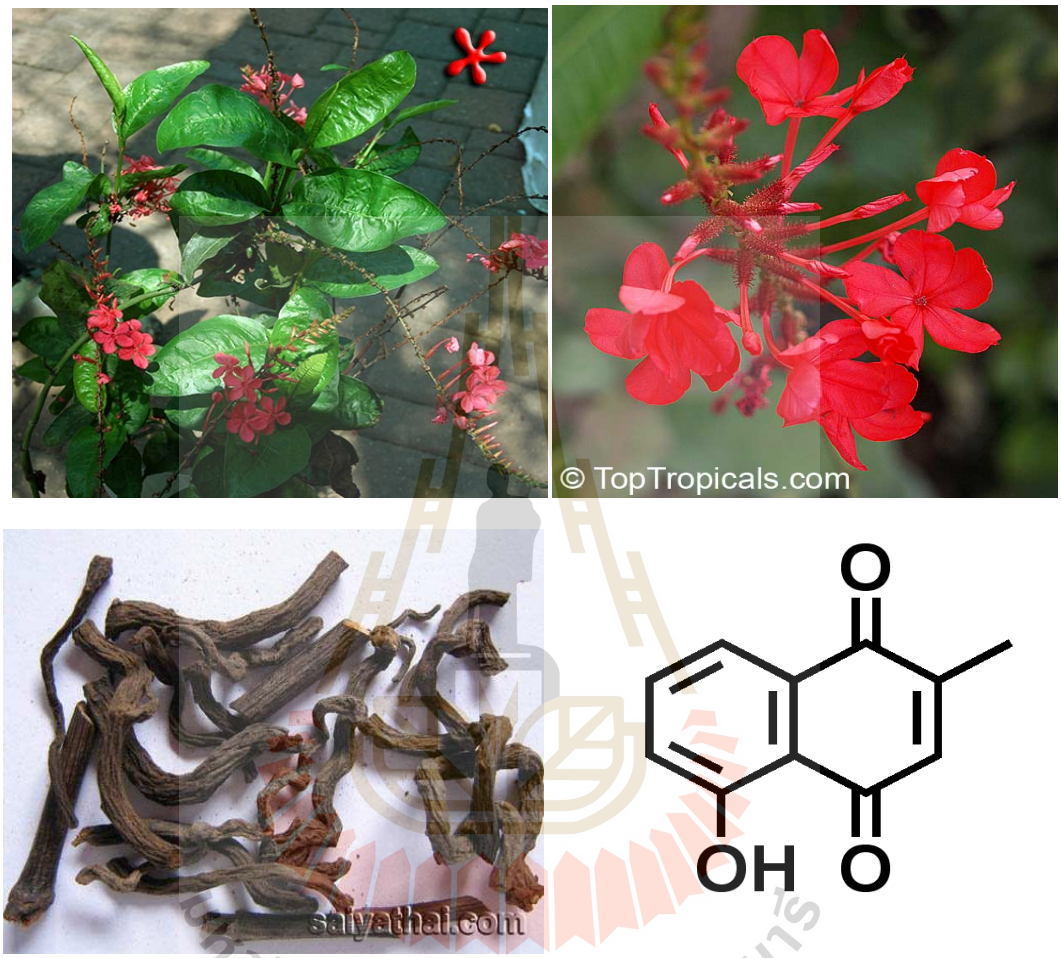
4.1 *ชาน้ำมัน (tea oil; Camellia oleifera Abel.)* ต้นชาน้ำมันซึ่งมีถิ่นกำเนิดแถบมณฑลเสฉวน ประเทศจีน ตามป่าดิบ ไหล่เขา ริมลำธารที่ระดับความสูง 400-1,300 m. จากระดับน้ำทะเล ลักษณะเป็นไม้พุ่ม สูง 1.5 – 4 m ดอกเป็นสีขาว เกสรสีเหลือง มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ผลรูปทรงกลม เมื่อสุกมีสีน้ำตาลเข้ม ผิวเรียบเป็นมัน (รูปที่ 2.5) ภายในมีเมล็ดซึ่งสามารถนำไปสกัดน้ำมัน ใช้ปรุงอาหารเป็นน้ำมัน เมล็ดชาใช้กันทั่วไปในประเทศจีนมานานกว่าพันปี สารซาโปนิน (saponin) ที่พบในกากเมล็ดชาน้ำมันจัดเป็น triterpenoid saponin มีอยู่ประมาณ 10-13% มีความเป็นพิษรุนแรงเฉพาะสัตว์เลือดเย็นหรือสัตว์ชั้นต่ำ เช่น ปลา กุ้ง และหอยเท่านั้น เมื่อสัตว์น้ำได้รับสารนี่ทำให้เกิดอาการสั่น กระตุกอย่างรุนแรง กล้ามเนื้อจะอ่อนเพลียและเป็นอัมพาต นอกจากนี้ยังมีผลต่อศูนย์ประสาทที่ควบคุมการหายใจอีกด้วย ทำให้เกิดการสลายตัวของเม็ดเลือดแดง แต่ในสัตว์ชั้นสูงหรือสัตว์เลือดอุ่น เช่น คนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สาร saponin จะทำให้เกิดอาการระคายเคืองต่อเยื่อบุช่องจมูก ทำให้น้ำมูกไหล จามและมึนงง พิษของเมล็ดชาสลายตัวได้ง่ายและไม่สะสมในร่างกายคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ความเป็นพิษต่อปลาจะหมดไปเร็วภายหลังการใช้สารละลายเมล็ดชาในนา 7-14 วัน ปัจจุบันนิยมใช้กากชาจากการผลิตน้ำมันจากต้นชาน้ำมันเพื่อจัดการกับหอยเชอรี่ในนาข้าว หรือสัตว์น้ำที่รบกวนในฟาร์มกุ้ง หรือฟาร์มหอยมุกน้ำจืด เนื่องจากหาง่ายราคาไม่แพง



รูปที่ 2.5 แสดงต้นชาน้ำมัน ผลชา และเมล็ดชาเพื่อมาผลิตสาร saponin (ที่มา www.21food.com และ www.freepatentsonline.com)

4.2 *สารสกัดบริสุทธิ์พลัมบาจินจากรากเจตมูลเพลิงแดง (Purified plumbagin of Plumbago indica root)* ต้นเจตมูลเพลิงแดง (รูปที่ 2.6) มีถิ่นกำเนิดในอินเดียและเขตร้อนทั่วไป เป็นไม้พุ่มสูง 0.8-1.5 m. ยอดอ่อนสีแดง ลำต้นกลมเรียบ มีสีแดงบริเวณข้อ เป็นพืชใบเดี่ยว ใบเรียวเรียงสลับรูปไข่แกมวงรีกว้าง 3-5 cm. ยาว 6-10 cm. ดอกช่อออกที่ปลายกิ่ง มีลักษณะกลีบดอกสีแดง ผลเป็นผลแห้งแตกได้ รากมีสรรพคุณบำรุงโลหิต ช่วยย่อยอาหารเจริญอาหาร แก้ปวดท้องแน่นจุกเสียด ขับลมในลำไส้ แก้ท้องร่วง แก้ริดสีดวงทวาร แก้บวม แก้ปวดบวม ฆ่าพยาธิ ระงับอาการปวดฟัน แก้ไข้ รักษาฝี แก้ปอดบวม แก้โรคข้อและเป็นอัมพาต ขับเหงื่อ แก้หนังด่างและโรคผิวหนัง แก้รังแค แก้ปวดศีรษะ ขับฟอกโลหิตระดู ทำให้แท้งลูก ต้นมีสรรพคุณขับโลหิตระดู แก้ปวดท้อง กระพี้มีสรรพคุณแก้เกลื้อนช้าง แก่นมีสรรพคุณแก้ขี้เรื้อนกวาง ขี้เรื้อนน้ำเต้า ดอกมีสรรพคุณแก้โรคตาและโรคที่ทำให้หนาวและเย็น ลูกมีสรรพคุณแก้โรคพยาธิ

ผิวหนัง แก้ฝี การใช้พืชชนิดนี้ต้องระมัดระวัง เพราะทำให้เกิดการระคายเคืองผิวหนังเป็นตุ่มพองได้ รายงานวิจัยพบว่า ทั้งต้นมีสาร plumbagin, sitosterol, stigmasterol, campesterol และ 6-hydroxyplumbagin สาร plumbagin มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในลำไส้ ต้านการเกิดเนื้องอก ต้านอนุมูลอิสระและต้านพยาธิบางชนิด (ที่มา: www.herbal.pharmacy.psu.ac.th/data/herbal/Plumbago_rosea.html)



รูปที่ 2.6 แสดงต้น ดอก และรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงและ สูตรโครงสร้างของ plumbagin ($C_{11}H_8O_3$) (ที่มา www. Toptropical.com และ www. saiyathai.com)

คุณสมบัติทางเคมีและการออกฤทธิ์ plumbagin มีสูตรโครงสร้างเป็น 2-Methyl-5-hydroxy-1,4-naphthoquinone ซึ่งเป็นสารสีเหลืองส้ม มีคุณสมบัติละลายน้ำ (http://sis.nlm.nih.gov/)(รูปที่ 2.6) Plumbagin มีฤทธิ์ในการฆ่าพยาธิตัวกลม *Setaria digitata* (Mathew et al., 2002; Srinivasan et al., 2009) และมีผลต่อการเจริญของตัวอ่อนในระยะติดเชื้อของพยาธิตัวกลม *H. contortus* และ *A. suum* (Fetterer and Fleming, 1991) นอกจากนี้มีรายงานว่า plumbagin สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ในหลอดทดลองได้ (สุนันท์, 2537) โดยมีบทบาทหลักในการทำให้เกิด superoxide ภายในเซลล์ ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายต่อผนัง tegumental surface และทำให้

antigen ของพยาธิถูกเปิดเผยต่อภูมิคุ้มกันของร่างกาย จากการศึกษาทดสอบพิทยาวิทยาของสารสกัดหยาบจากของรากเจตมูลเพลิงแดงในหนูถีบจักรและหนูขาวพบว่าค่า LD_{50} ในหนูถีบจักรผ่านทางช่องท้องเท่ากับ 239.88 mg และผ่านทางปากเท่ากับ 1148.15 mg/kg BW ตามลำดับ (Solomon et al., 1993) และมีน้ำหนักของตับ ม้ามและอัณฑะลดลงในเพศผู้ ส่วนในเพศเมียน้ำหนักของมดลูกและต่อมไธมัสลดลง มีรายงานว่า naphthoquinones สามารถฆ่าหอย *Biomphalaria glabrata* ในระยะตัวเต็มวัยได้ (Ribeiro et al., 2009) ซึ่งหอยชนิดนี้เป็นสัตว์พาหะของพยาธิ *S. mansoni* ซึ่ง plumbagin ก็เป็นพืชที่อยู่ในอนุพันธ์ของ naphthoquinones ดังนั้น plumbagin น่าจะมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยากำจัดหอยเชอรี่ได้เช่นกัน ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ของ plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดงว่า สามารถใช้เป็นยาฆ่าหอยได้เช่นเดียวกับ naphthoquinones หรือไม่ จึงนำมาเป็นโจทย์วิจัยในครั้งนี้

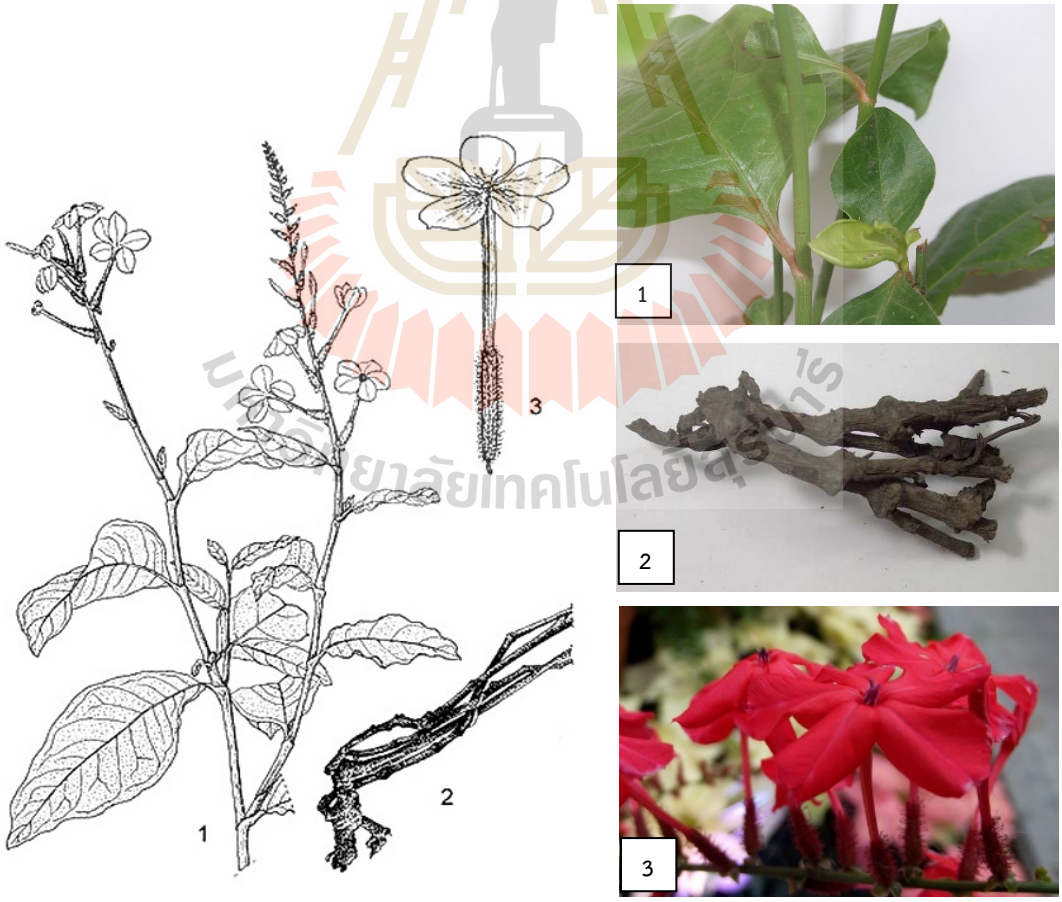
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. การเก็บตัวอย่างพืชและการสกัดสารจากพืชตัวอย่าง

สารสกัด plumbagin จากรากเจตมูลเพลิงแดง ได้จัดซื้อจากบริษัท SM. Chemical จำกัด ส่วนสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง ทำโดยนำรากเจตมูลเพลิงแดง ซื้อมาจากจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำปาง (อายุประมาณ 24-30 เดือน) นำมาพิสูจน์รูปพรรณสัณฐานทางชีววิทยา โดยผศ. ดร. สันติ วัฒฐานะ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยอ้างอิงจากลักษณะดอก ใบ ลำต้นและราก (รูปที่ 2.1) หลังจากล้างเศษดินและสิ่งที่ปนเปื้อนออกจนสะอาดด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นในครั้งสุดท้ายแล้ว เก็บตัวอย่างไว้ที่หอพรรณไม้ที่ห้องปฏิบัติการพืช สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (หมายเลขตัวอย่าง: N.Saowakon 01) นำรากที่ผ่านการทำความสะอาดเรียบร้อยแล้ว นำไปอบผ่านลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 °C หลังจากนั้นนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 100 ไมโครเมตร ผงสมุนไพรที่ได้ถูกเก็บในถุงที่ปิดสนิท ในขวดทึบแสงที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปสกัดต่อในขั้นต่อไป



รูปที่ 3.1 ลักษณะของใบ ลำต้น รากและดอกของ *Plumbago indica* (*P. rosea*) ส่วนของใบและลำต้น (1), ราก (2) และดอก (3)

ยาฆ่าหอยเมทัลดีไฮด์ ในชื่อการค้า แองโกลสลัก ซื้อจากร้านโฮมโปร แผนกขายยาฆ่าหอย ส่วนกากเมล็ดชา(น้ำมัน) หรือ ที-ซาโปนิน จัดซื้อจากร้านค้าออนไลน์ทางอินเตอร์เน็ต ในการทดลองครั้งนี้เลือกใช้ที-ซาโปนินซึ่งเป็นกากชาน้ำมัน ภายใต้แบรนด์“ภัทรพัฒน์” ในศูนย์วิจัยและพัฒนาชาน้ำมันและพืชน้ำมันชา มูลนิธิชัยพัฒนา จังหวัดเชียงราย

การเตรียมสารสกัดจากพืช

เนื่องจากไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับการใช้สารสกัดหยาบจากรากต้นเจตมูลเพลิงแดงมาก่อน จึงเริ่มต้นสกัดอย่างง่าย โดยนำผงสมุนไพรของรากเจตมูลเพลิงแดงที่ตากแห้ง ไปสกัดในน้ำกลั่น หรือใน 95% ethanol ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) เขย่าตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปกรองตะกอนด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) แล้วนำสารละลายดังกล่าว ทำให้เข้มข้นขึ้น โดยผ่านเครื่องระเหยแห้งความดันต่ำ (rotary evaporator) โดยค่อย ๆ ลดความดัน แล้วแยกน้ำกลั่นหรือ 95% ethanol ออก เมื่อของเหลวลดลงเหลือประมาณ 1/5 จึงนำสารสกัดที่ได้ ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะทดลองและหาเปอร์เซ็นต์ yield ที่ได้จากสารสกัดว่ามีปริมาณเท่าไหร่คิดเป็นกี่เปอร์เซ็นต์ดังสูตรคำนวณต่อไปนี้

$$\% \text{ Yield (g/100 g of dry plant material)} = (W1 \times 100) / W2$$

W1 คือ น้ำหนักของสารสกัดหยาบหลังทำให้แห้ง (กรัม) และ W2 น้ำหนักของสมุนไพรแห้ง (หยาบ) ก่อนทำการสกัด (กรัม)

ส่วนกากชาน้ำมันซื้อมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาชาน้ำมันและพืชน้ำมันชา มูลนิธิชัยพัฒนา จังหวัดเชียงราย ภายใต้แบรนด์“ภัทรพัฒน์”นำมาสกัดในน้ำกลั่นเท่านั้น โดยใช้ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) (เนื่องจากสกัดด้วยแอลกอฮอล์มีน้ำมันกากชาออกมาด้วย จึงเลือกน้ำเป็นตัวทำละลายเท่านั้น) และผ่านกระบวนการเช่นเดียวกับการสกัดเจตมูลเพลิงแดง นำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะทดลองและหาเปอร์เซ็นต์ yield ที่ได้จากสารสกัดเช่นเดียวกับสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดง

2. การตรวจสอบส่วนประกอบในสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง

การตรวจสอบชนิดของสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง โดยดัดแปลงจาก Nayak et al (2015) การตรวจสอบสารสกัดหยาบโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ทำได้โดยใช้เครื่อง High-pressure liquid chromatography (HPLC; Model Agilent 1100 series HPLC system) คอลัมน์ที่ใช้แยกสารคือ Agilent C18 reverse-phase column ขนาด 4.0 x 250 mm; 0.25 µm) โดยเตรียมสารมาตรฐาน plumbagin จากบริษัท SM. Chemical และสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงในสารละลาย methanol (HPLC grade, Merck Millipore, Germany) ความเข้มข้นที่ 100 µg/ml โดยใช้แผ่นกรองความละเอียดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.22 µm กรองสารทุกชนิดก่อนผ่านเข้าสู่ mobile phase ที่อัตราความดัน 0.5 ml/min ฉีดสาร plumbagin มาตรฐานที่ละลายใน methanol ความเข้มข้น 0.01-5 µg/ml ปริมาตร 10 µl ทุกครั้งเพื่อตรวจสอบความแม่นยำของเครื่องก่อน ทำการตรวจสอบสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงที่ผสมกับสารสกัด plumbagin และสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงเพียงอย่างเดียว ในการทดลองครั้งนี้ใช้สารสะลาย methanol เป็น blank และสารสกัด plumbagin เป็นตัวมาตรฐานเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดง ทำการทดลองซ้ำสามครั้ง

3. การทดสอบผลของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงต่อหอยเชอรี่

3.1 เก็บตัวอย่างหอยเชอรี่

เก็บตัวอย่างหอยเชอรี่ระยะตัวเต็มวัย จากแหล่งน้ำธรรมชาติ เช่นแปลงนาและอ่างเก็บน้ำอำเภอชุมพวง จังหวัดนครราชสีมา ที่มีขนาดของ operculum ประมาณ 20-30 mm และมีน้ำหนักตัวประมาณ 5 g สุขภาพแข็งแรง โดยดูจากลักษณะของเปลือก ขนาดของหอย และเป็นหอยที่อยู่ในช่วงการจับคู่ผสมพันธุ์ (นำมาเลี้ยงในอ่างก่อปูนซีเมนต์ที่มีขนาด 300 x 100 x 150 cm ได้รับการดูแลเป็นไปตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี รวมทั้งวิธีการทดลองของโครงการได้รับการรับรองแล้วจากคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์ทดลอง โดยเปลี่ยนน้ำทุก ๆ 2 วัน โดยควบคุมอุณหภูมิของน้ำ 26±2 °C และ pH 7.2 แสงสว่างมืดสลับกันอย่างละ 12 h ให้อาหารเลี้ยงหอยเป็นผักสลัดหรือผักบุ้ง ที่ล้างสะอาด เลี้ยงหอยในบ่อปูนเป็นเวลา 1 สัปดาห์เพื่อปรับสภาพ หลังจากนั้นนำหอยมาชั่งน้ำหนักและวัดขนาด เลือกหอยให้มีขนาดใกล้เคียงใส่ในภาชนะเหมือนกับที่จะนำมาทดลอง เพื่อให้หอยปรับตัว 24 h ก่อนนำไปทดสอบในการทดลองต่อไป

3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดง และเมทัลดีไฮด์ต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่และหาค่า LC_{50} ของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่เหมาะสม โดยวางแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มอิสระ (completely randomized design) โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 8 กลุ่ม (ดังรายละเอียดในตารางที่ 3.1) ในแต่ละกลุ่มทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ หอยเชอรี่ระยะตัวเต็มวัย ครั้งละ 10 ตัวต่อกลุ่ม โดยดำเนินการนำหอยเชอรี่ปรับสภาพน้ำ 6 L ที่ปราศจากคลอรีน 24 h แล้วนำสารสกัดที่เตรียมไว้ละลายในน้ำซึ่งแต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำและใช้ตะแกรงพลาสติกปิดปากอ่าง เพื่อป้องกันไม่ให้หอยหนีและป้องกันหนูซึ่งจะมากินหอยระหว่างการทดลอง เปลี่ยนน้ำที่มีสารที่นำมาทดสอบทุกวันเพื่อป้องกันน้ำเน่าจากหอยตายและทดสอบการตายของหอยเชอรี่ โดยใช้เข็มเขี่ยเป็นเวลา 5 min ที่บริเวณ operculum หอยที่ตายจะเอาออกจากกลุ่มการทดลอง ให้อาหารหอย (ผักบุ้ง) ทุกวันวันละ 10 g เปลี่ยนอาหารทุกวัน อาหารที่เหลือนำมาคำนวณอัตราการกินตามการศึกษาของ Dai และคณะ (2014) ดังนี้

$$F = \frac{V(A - B)}{nt}$$

เมื่อ F = อัตราการกินของหอย ใน 1 วัน, A= ปริมาณอาหารที่ให้ (g), B= ปริมาณอาหารที่เหลือในแต่ละวัน (g), V = ปริมาณสารที่ทดสอบในภาชนะ (L), n = จำนวนหอยที่ใช้แต่ละครั้งในการทดลอง และ t = ระยะเวลาทดสอบ (day)

ตารางที่ 3.1 การทดสอบผลของยากำจัดหอยเชอรี่และสารสกัดสมุนไพรต่อหอยเชอรี่ระยะตัวเต็มวัย ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

กลุ่มที่ 1	น้ำประปาที่ปราศจากสารสกัดและยาฆ่าหอย (negative control)
กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ได้รับสาร metaldehyde ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml (positive control*)
กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยน้ำ (cPI) ความเข้มข้นที่ 100 µg/ml
กลุ่มที่ 4	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยน้ำ (cPI) ความเข้มข้นที่ 250 µg/ml
กลุ่มที่ 5	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยน้ำ(cPI) ความเข้มข้นที่ 500 µg/ml
กลุ่มที่ 6	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยแอลกอฮอล์ (EtOH-cPI) ความเข้มข้นที่ 100 µg/ml
กลุ่มที่ 7	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยแอลกอฮอล์ (EtOH-cPI) ความเข้มข้นที่ 250 µg/ml
กลุ่มที่ 8	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยแอลกอฮอล์(EtOH-cPI) ความเข้มข้นที่ 500 µg/ml

(* ความเข้มข้นของสารสกัดอ้างอิงจากการทดลองของ ชมพูนุชและคณะ 2538 และปราสาททองและชมพูนุช, 2554)

สังเกตพฤติกรรมของหอยเชอรี่และตรวจนับการตายของหอยในช่วงเวลา 24, 48, 72 และ 96 h นำข้อมูลมาวิเคราะห์หาค่าเปอร์เซ็นต์การตายของหอยเชอรี่โดยใช้วิธี Abbott's formula ของ Matsumura (1976) เพื่อนำค่ามา plot graph ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงกับเปอร์เซ็นต์การตายของหอยเชอรี่หลังได้รับสารสกัด แล้วหาค่า LC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้หอยเชอรี่ตายหลังจากได้รับสารสกัดจากสมการการถดถอยเชิงเส้น (regression) และหาสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดต่อเปอร์เซ็นต์การตายของหอยเชอรี่ หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ริ้วเหงือก เท้า และตับ เพื่อดูอวัยวะเป้าหมายของสารสกัด

$$\% \text{ การตายของหอยเชอรี่} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A = เปอร์เซ็นต์การรอดในกลุ่มควบคุม B= เปอร์เซ็นต์การรอดในกลุ่มทดลอง

โดยเปอร์เซ็นต์การตายในกลุ่มควบคุมต้องน้อยกว่า 20 %

3.4 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากพืชบางชนิดหรือเมทิลดีไฮด์ร่วมกับสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงต่อการตายของหอยเชอรี่

หลังจากทราบผลการทดลองจากตารางที่ 3.1 เลือกตัวทำละลายที่ให้ผลฆ่าหอยเชอรี่ที่ดีที่สุด นำมาศึกษาเปรียบเทียบผลสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับสารสกัดจากกากชาที่สกัดด้วยน้ำ สังเกตการตายของหอยเชอรี่ เพื่อดูประสิทธิของสารสกัด โดยใช้สารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงที่สกัดจากแอลกอฮอล์ 95% ผสมกับสารสกัดหยาบ คือ สารสกัดจากกากเมล็ดชา (OL) และเมทัลดีไฮด์ (metaldehyde) (ตารางที่ 3.2) โดยใช้ความเข้มข้น 5%, 25% และ 50% จากการทดลองที่ 3.1 ผู้วิจัยจึงดำเนินการทดสอบ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงเทียบกับยาฆ่าหอยที่ใช้ในท้องตลาดคือ เมทัลดีไฮด์ต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่ โดยหาค่า LC_{50} ซึ่งผู้วิจัยได้คัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับการสกัดสารจากรากเจตมูลเพลิงแดง

ตารางที่ 3.2 การทดสอบผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา และเมทัลดีไฮด์ ต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่ระยะตัวเต็มวัย ที่ความเข้มข้นต่างๆ

กลุ่มที่ 1	น้ำประปาที่ปราศจากสารสกัดและยาฆ่าหอย (negative control)
กลุ่มที่ 2	น้ำประปาที่ผสมแอลกอฮอล์ 95% (กลุ่มควบคุมที่เป็น vehicle)
กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจาก EtOH-PI 500 µg/ml กับ OL ความเข้มข้น 0.5 µg/ml
กลุ่มที่ 4	กลุ่มที่ได้รับสารสกัด EtOH-PI 500 µg/ml กับ OL ความเข้มข้น 2.5 µg/ml
กลุ่มที่ 5	กลุ่มที่ได้รับสารสกัด EtOH-PI 500 µg/ml กับ OL ความเข้มข้น 5 µg/ml
กลุ่มที่ 6	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจาก EtOH-PI 500 µg/ml กับ metaldehyde ความเข้มข้น 0.5 µg/ml
กลุ่มที่ 7	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจาก EtOH-PI 500 µg/ml กับ metaldehyde ความเข้มข้น 2.5 µg/ml
กลุ่มที่ 8	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจาก EtOH-PI 500 µg/ml กับ metaldehyde ความเข้มข้น 5 µg/ml

หมายเหตุ EtOH-PI : เจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยแอลกอฮอล์ ; OL : กากเมล็ดชา และใช้ความเข้มข้นของเมทัลดีไฮด์ลดลงครึ่งหนึ่งของการทดลองที่ 3.1

สังเกตพฤติกรรมของหอยเชอรี่และตรวจนับการตายของหอยในช่วงเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง นำข้อมูลมาวิเคราะห์หาค่าเปอร์เซ็นต์การตายของหอยเชอรี่โดยใช้วิธี Abbott's formula ของ Matsumura (1976) เพื่อนำค่ามา plot graph ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับสารสกัดจากพืชชนิดอื่นๆ กับเปอร์เซ็นต์การตายของหอยเชอรี่หลังได้รับสารสกัด และ plot graph ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับยาฆ่าหอย metaldehyde กับเปอร์เซ็นต์การตายของหอยเชอรี่หลังได้รับสารสกัด แล้วหาค่า LC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้หอยเชอรี่ตายหลังจากได้รับสารสกัดจากสมการการถดถอยเชิงเส้น (regression) และหาสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดต่อเปอร์เซ็นต์การตายของหอยเชอรี่ หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ริ้วเหงือก เท้า และตับเพื่อดูอวัยวะเป้าหมายของสารสกัด

$$\% \text{ การตายของหอยเชอรี่} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A = เปอร์เซ็นต์การรอดในกลุ่มควบคุม B= เปอร์เซ็นต์การรอดในกลุ่มทดลอง

โดยเปอร์เซ็นต์การตายในกลุ่มควบคุมต้องน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์

4 ทดสอบสารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงกับเมล็ดข้าวในจานเพาะ

นำเมล็ดข้าวเปลือกพันธุ์ กข105 แช่อยู่ในสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 15% โดยปริมาตรต่อปริมาตร เป็นเวลา 10 min จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง แล้วแช่เมล็ดข้าวในสารละลาย

เจตมูลเพลิงแดง หรือสารละลายที่ผสมด้วยกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ เป็นเวลา 12-18 h (สารละลายของสารที่ทำการทดสอบมีค่าความเข้มข้นเท่ากับในการทดลองที่ 3.2 ที่ใช้ทดสอบหอยเชอรี่) จากนั้นทำการเรียงเมล็ดข้าวในจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่ชุ่มด้วยสารละลายของสารที่ทดสอบปริมาณ 5 ml (โดยรูปแบบการเรียงเมล็ดข้าวทำตามรูปที่ 3.2) โดยในแต่ละความเข้มข้นทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ ปิดจานเพาะเชื้อด้วยพาราฟิล์ม บ่มในตู้อุณหภูมิ 25 ºC เป็นเวลา 7 วัน

หมายเหตุ: ในการทดสอบผลของสารละลายเจตมูลเพลิงแดง และสารอื่นๆ ต่อการเจริญเติบโตของข้าว ในแต่ละครั้ง ต้องทำการเตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้ง เนื่องจากหากทิ้งสารละลายไว้เป็นระยะเวลานานจะเกิดการสลายของสารสำคัญไปบ้างส่วนได้

รูปที่ 3.2 แสดงการเรียงเมล็ดข้าวในจานเพาะเชื้อโดยหัวลูกศรคือส่วนของจมูกข้าว

4.1 การหาความยาวราก และความยาวยอด

หลังจากบ่มเมล็ดข้าวในตู้บ่มเป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการนับจำนวนเมล็ดที่งอก วัดความยาวรากและวัดความยาวยอด ของทุก ๆ เมล็ดแล้วทำการคำนวณค่าเฉลี่ยและทำการเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้น ในการวัดต้องระวังไม่ให้รากข้าวแห้ง เมื่อได้ผลค่าความยาวราก และความยาวยอดออกมาแล้วให้ทำการเฉลี่ยความยาวในแต่ละซ้ำ จะได้ค่าความยาวเฉลี่ยทั้งหมด 3 ค่าจากการทดลองใน 1 ความเข้มข้น นำไปวิเคราะห์สถิติแบบดันแคน (Duncan’s multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และจากนั้นนำค่าเฉลี่ยทั้ง 3 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยเพื่อเป็นตัวแทนของแต่ละความเข้มข้น และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบแนวโน้มและสร้างกราฟจากโปรแกรม

4. 2 การตรวจวัดเซลล์ที่ตาย (Cell Death Assay)

ตัดรากให้มีความยาว 3 เซนติเมตรจากส่วนปลายรากแช่ในสารละลาย Evans blue ความเข้มข้น 0.25% โดยมวลต่อปริมาตร (ละลายผง Evans blue 0.25 g ในน้ำ 100 ml) ปริมาณ 30 ml เป็นเวลา 15 min จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 min เพื่อล้างสีย้อมส่วนเกินออก แล้วนำรากไปแช่ในสารละลาย N, N-dimethylformamide เป็นเวลา 50 min เมื่อครบ 50 min ให้วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 600 nm โดยใช้ N, N-dimethylformamide เป็น blank โดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้น เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ของแต่ละซ้ำแล้ว นำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธีแบบดันแคน จากนั้นหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเพื่อจัดทำกราฟแสดงแนวโน้มตามความเข้มข้น

รูปที่ 3.3 แสดงการเตรียมการแช่ข้าวในสารละลาย Evans blue และการชะล้างสารด้วยน้ำกลั่น

5. การทดสอบสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงกับสัตว์ทดลอง

เพื่อเป็นการตรวจสอบสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่มีผลต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สำหรับการทดลองนี้เป็นการทดสอบกับหนูแฮมสเตอร์ อายุ 6 สัปดาห์ หนูเพศผู้และตัวเมียน้ำหนักเฉลี่ย 90-100 g นำมาพัก 7 วันเลี้ยงในกรง ซึ่งมีแสงสว่างสลับมืดเป็นเวลา 12 h ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 °C โดยการทดลองได้ผ่านการพิจารณาอนุมัติ จากคณะกรรมการสัตว์ทดลองของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีเรียบร้อยแล้ว (SUT4/2558) ทดสอบกับหนูแฮมสเตอร์เพศละ 30 ตัว ทำการทดลอง 2 ซ้ำ โดยแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มควบคุมเพศละ 6 ตัวและกลุ่มทดลองเพศละ6 ตัว โดยให้สารสกัดทางปาก (oral route) ผ่านทาง feeding tube ขนาดเบอร์ 18 สอดเข้าไปในปากผ่านลงไปถึงกระเพาะอาหารโดยตรง ซึ่งทำให้หนูได้รับสารสกัดเท่ากับ 100, 400, 1000 และ 3000 mg/kg BW ในปริมาณ 0.5 ml ครั้งเดียวตรวจสอบผลการตายและพฤติกรรม หลัง 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมงหลังการป้อนสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดง เพื่อศึกษาพิษในระยะเฉียบพลัน และให้สารสกัดความเข้มข้นเท่าเดิมติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 7 วัน เพื่อศึกษาพิษในระยะกึ่งเฉียบพลัน (เทียบจากการทดลองของ ปานเทพ, 2535) สังเกตพฤติกรรมและตรวจสอบการตายของหนู หลังจากหนูตายเก็บอวัยวะที่สำคัญคือ ตับ ไต ม้าม อัณฑะหรือรังไข่ และเลือด เพื่อนำมาวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยาเนื้อเยื่อและค่าเอนไซม์ตับและการทำงานของไตต่อไป โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อจากอวัยวะผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อย้อมด้วย H&E นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงแต่ละความเข้มข้นต่อการตายของสัตว์ทดลอง โดยใช้โปรแกรม SPSS แสดงผลในรูปแบบตารางแจกแจงความถี่ ร้อยละ ค่าความสัมพันธ์ (P-value < 0.05 ถือว่ามีระดับนัยสำคัญทางสถิติ) ข้อมูลจะถูกเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้สถิติ analysis of variance (ANOVA)

สถานที่ทำการทดลอง

1) ห้องวิจัยกลุ่มกายวิภาคศาสตร์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2) หน่วยสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
3) ห้องปฏิบัติการของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการวิจัย

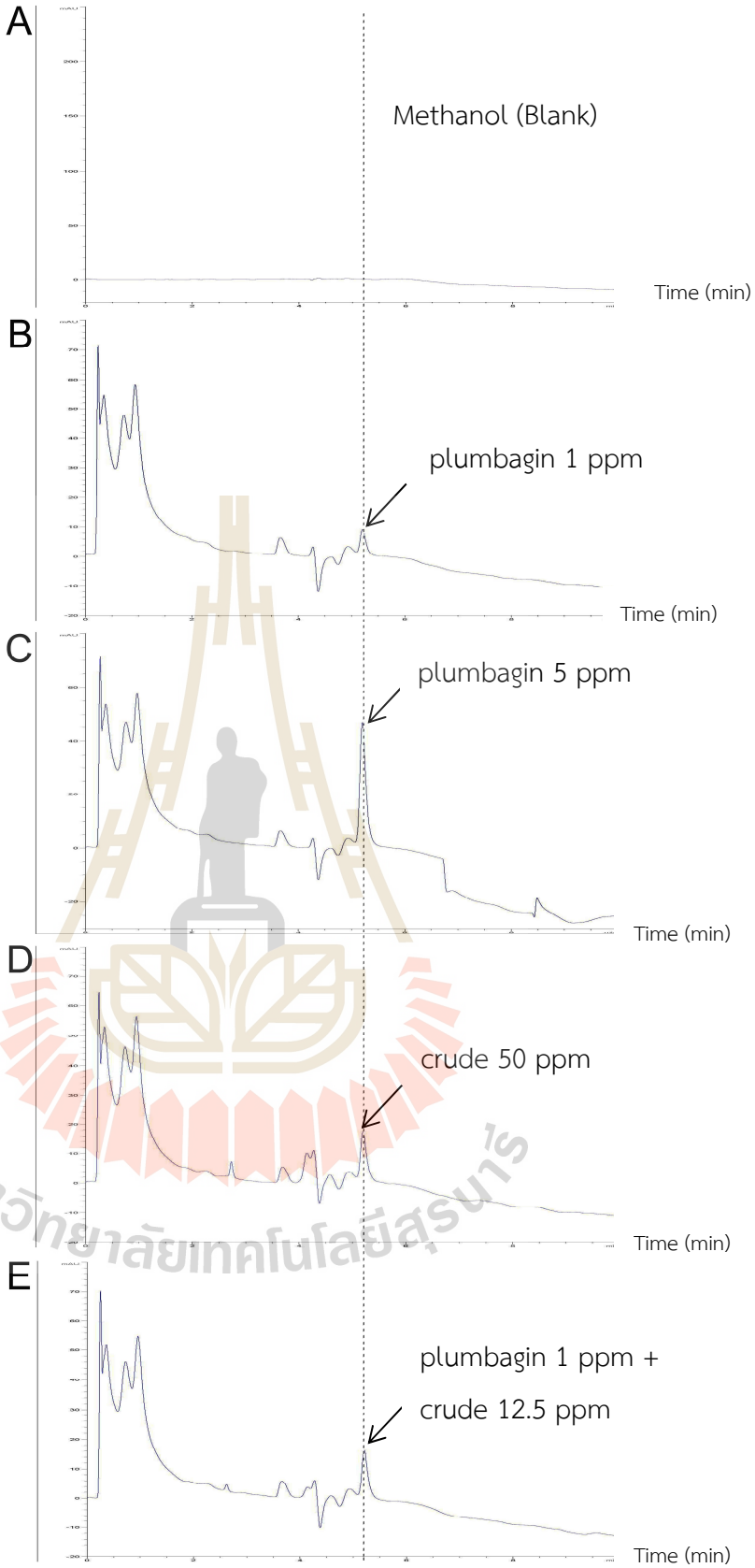
4.1 สารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงและกากชา

หลังจากคำนวณหาค่า % yield ของสารสกัดหยาบเท่ากับ 9.20 % เมื่อเทียบกับน้ำหนักของรากเริ่มต้น 100 g ในขณะที่กากชาคำนวณหาค่า % yield ของสารสกัดหยาบเท่ากับ 9.06 % เมื่อเทียบกับน้ำหนักของกากชาเริ่มต้น 100 g

4.2 การตรวจสอบส่วนประกอบในสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง

ค่ามาตรฐานของสารสกัด plumbagin บริสุทธิ์ที่ 1 และ 5 ppm แสดงออกมาที่เวลา 5.198 min เมื่อเทียบกับ methanol ที่ใช้เป็น blank ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ส่วนสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้น 5 ppm มีองค์ประกอบเป็น plumbagin เช่นเดียวกันกับสาร plumbagin บริสุทธิ์ แต่สารสกัดหยาบฯ มีปริมาณ plumbagin ต่ำกว่ามาก (รูปที่ 4.1D) จึงผสมสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง 12.5 ppm ร่วมกับสารสกัด plumbagin บริสุทธิ์ 1 ppm ได้กราฟแสดงออกมาเช่นเดียวกับสารสกัดหยาบรากเจตมูลเพลิงแดง (รูปที่ 4.1E) แต่มี peak สูงกว่าสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงที่ไม่ได้ผสม plumbagin ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงมีส่วนประกอบของ plumbagin

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 4.1 แสดงค่าความจำเพาะของรากเจตมูลเพลิงแดง ด้วย HPLC โดยใช้ methanol เป็น blank (A) สารสกัด plumbagin บริสุทธิ์ที่ 1 ppm (B) และ 5 ppm (C) สารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง (crude) ที่ 50 ppm (D) และสาร plumbagin 1 ppm ร่วมกับสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดง 12.5 ppm (E) ที่เวลา 5.198 min

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

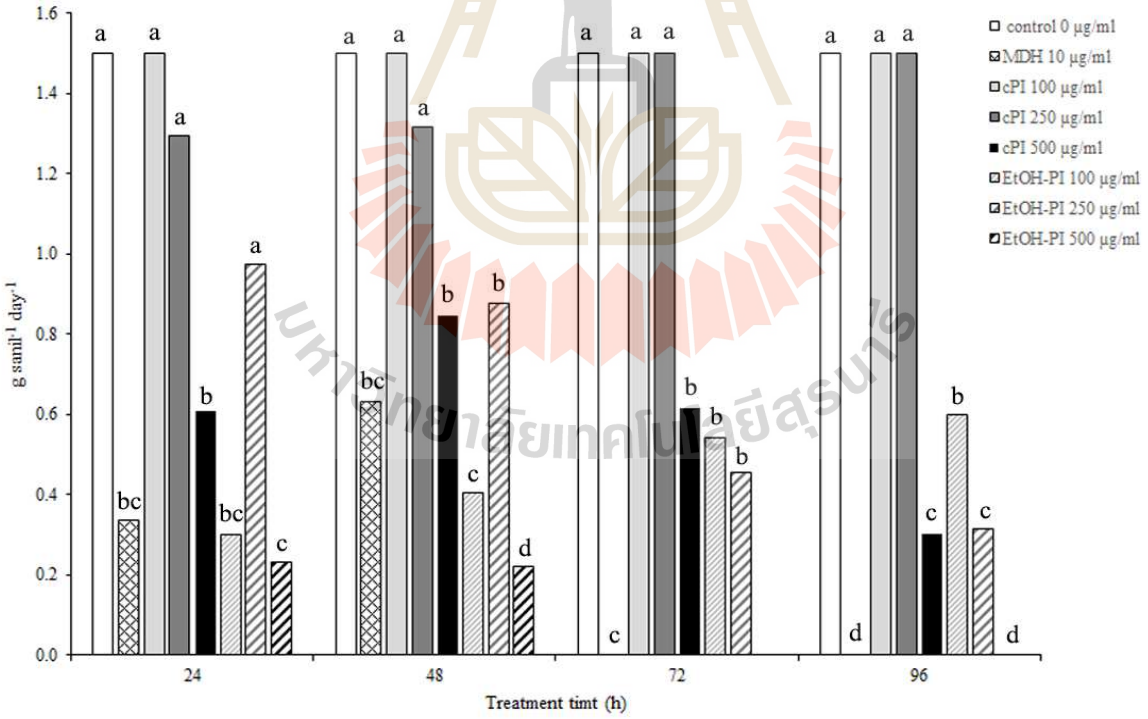
4.3 ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดง และเมทัลดีไฮด์ต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่และหาค่า LC_{50}

ผลของสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงต่ออัตราการกิน อัตราการตายของหอยเชอรี่ในตัวเต็มวัย และค่า LC_{50} ที่ 24-96 h ของแต่ละความเข้มข้น แสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.2 โดยหอยเชอรี่กลุ่มควบคุมมีอัตราการกินเฉลี่ยต่อตัวต่อวันประมาณ 1.5 g ในขณะที่หอยที่ได้รับยาฆ่าหอยเมทัลดีไฮด์พบว่ากินเพียงเล็กน้อย กินเฉพาะตอนเปลี่ยนน้ำใหม่ของแต่ละวัน โดยส่วนใหญ่หอยกลุ่มนี้จะปิดฝา operculum ตลอดเวลา ทำให้อัตราการกินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมถึง 6.25 เท่า จนเข้าสู่ 48-72 h เริ่มพบหอยเชอรี่ที่ได้รับยาฆ่าหอยมีลักษณะเปิดฝาค้าง ไม่ขยับเมื่อใช้เข็มเขี่ยเป็นเวลา 5 min หลังจาก 72 h อัตราการตายของหอยเชอรี่เท่ากับ 100% และ LC_{50} ยาฆ่าหอยเมทัลดีไฮด์เท่ากับ 2.2 µg/ml ส่วนหอยเชอรี่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่สกัดด้วยน้ำ พบว่าไม่มีผลต่ออัตราการกินและอัตราการตายของหอยเชอรี่ ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้น 500 µg/ml มีผลต่ออัตราการกินและอัตราการตายของหอยเชอรี่ โดยพบว่าหอยเชอรี่มีอัตราการกินน้อยลงกว่ากลุ่มควบคุม 2.5 เท่า ส่งผลให้หอยมีอัตราการตายถึง 40% ณ ที่เวลา 96 h และ LC_{50} เท่ากับ 4.15 µg/ml ส่วนกลุ่มหอยเชอรี่ที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์พบว่ามีผลต่ออัตราการกินทุกความเข้มข้น โดยหอยเชอรี่ทุกกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ ปิดฝาตั้งแต่ 24 h และมีเมือกเหนียวบริเวณปากฝา operculum เป็นส่วนใหญ่ อัตราการกินต่ำกว่ากลุ่มที่ได้สารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงที่สกัดในน้ำและกลุ่มควบคุม โดยอัตราการกินของทุกกลุ่มน้อยกว่ากลุ่มควบคุม 3.26, 2.27, 12.5 เท่า โดยเรียงตามลำดับความเข้มข้น อัตราการตายเพิ่มขึ้นจาก 15% เป็น 75% เมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จาก 250 µg/ml เป็น 500 µg/ml ยกเว้นกลุ่มที่ได้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ที่ไม่มีผลต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่ ส่วนค่า LC_{50} ของสารสกัดของเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้น 250 และ 500 µg/ml เท่ากับ 18.67 และ 3.97 µg/ml โดยเรียงตามลำดับความเข้มข้น ซึ่งผลจากการทดลองทำให้สรุปได้ว่า สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงใช้ตัวทำละลายเป็นแอลกอฮอล์จะให้ผลดีกว่ากลุ่มที่สกัดในน้ำ และสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงมีผลต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่ตัวเต็มวัย ผู้วิจัยจึงเลือกสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่สกัดในแอลกอฮอล์ นำไปใช้ศึกษาในการทดลองถัดไป

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงและเมทัลดีไฮด์ต่ออัตราการกิน อัตราการตายของหอยเชอรี่และหาค่า LC_{50} ณ ชั่วโมงที่ 96

ลำดับ		น้ำหนักเฉลี่ย (g)	อัตราการกิน (g/snail/day)	อัตราการตาย (%)	**ค่า LC_{50}** (µg/ml)
กลุ่มที่ 1	negative control	21.87±3.27	1.5±0.00^{a}	-	-
กลุ่มที่ 2	metaldehyde 10 µg/ml	22.52±4.02	0.24±0.30^{b}	100	2.2
กลุ่มที่ 3	cPI 100 µg/ml	21.24±9.13	1.50±0.00^{a}	0	-
กลุ่มที่ 4	cPI 250 µg/ml	21.86±3.18	1.40±0.11^{a}	0	-
กลุ่มที่ 5	cPI 500 µg/ml	22.85±3.58	0.59±0.22^{bc}	40	4.15
กลุ่มที่ 6	EtOH-cPI 100 µg/ml	21.65±3.34	0.46±0.13^{c}	0	-
กลุ่มที่ 7	EtOH-cPI 250 µg/ml	21.77±1.43	0.66±0.32^{a}	15	18.67
กลุ่มที่ 8	EtOH-cPI 500 µg/ml	21.94±1.97	0.12±0.12^{b}	75	3.97

อัตราการกินแสดงค่า means ±SD ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

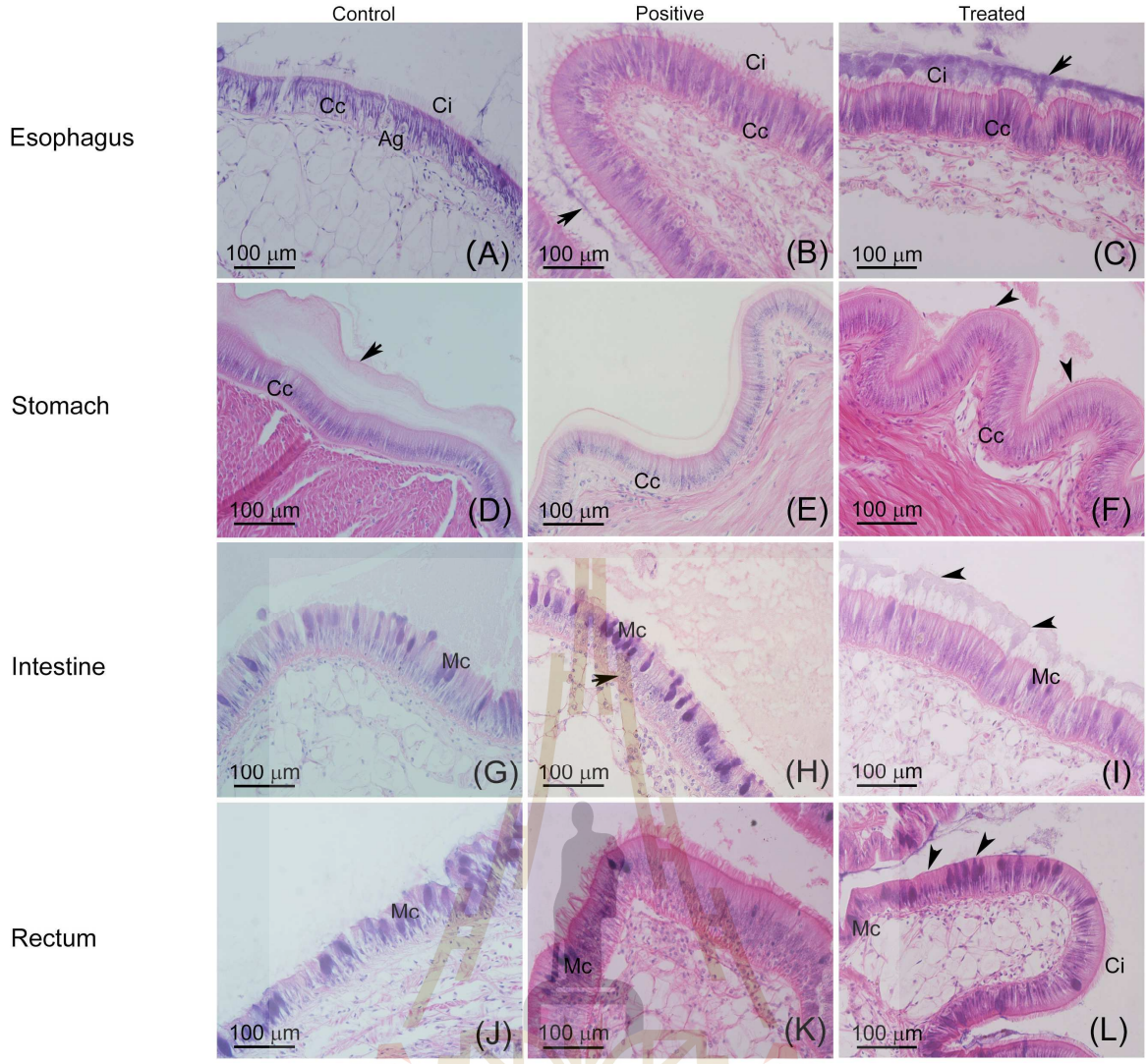


รูปที่ 4.2 ผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงด้วยน้ำและด้วยแอลกอฮอล์ต่ออัตราการกินของหอยเชอรี่ในระยะตัวเต็มวัย (N=10) ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

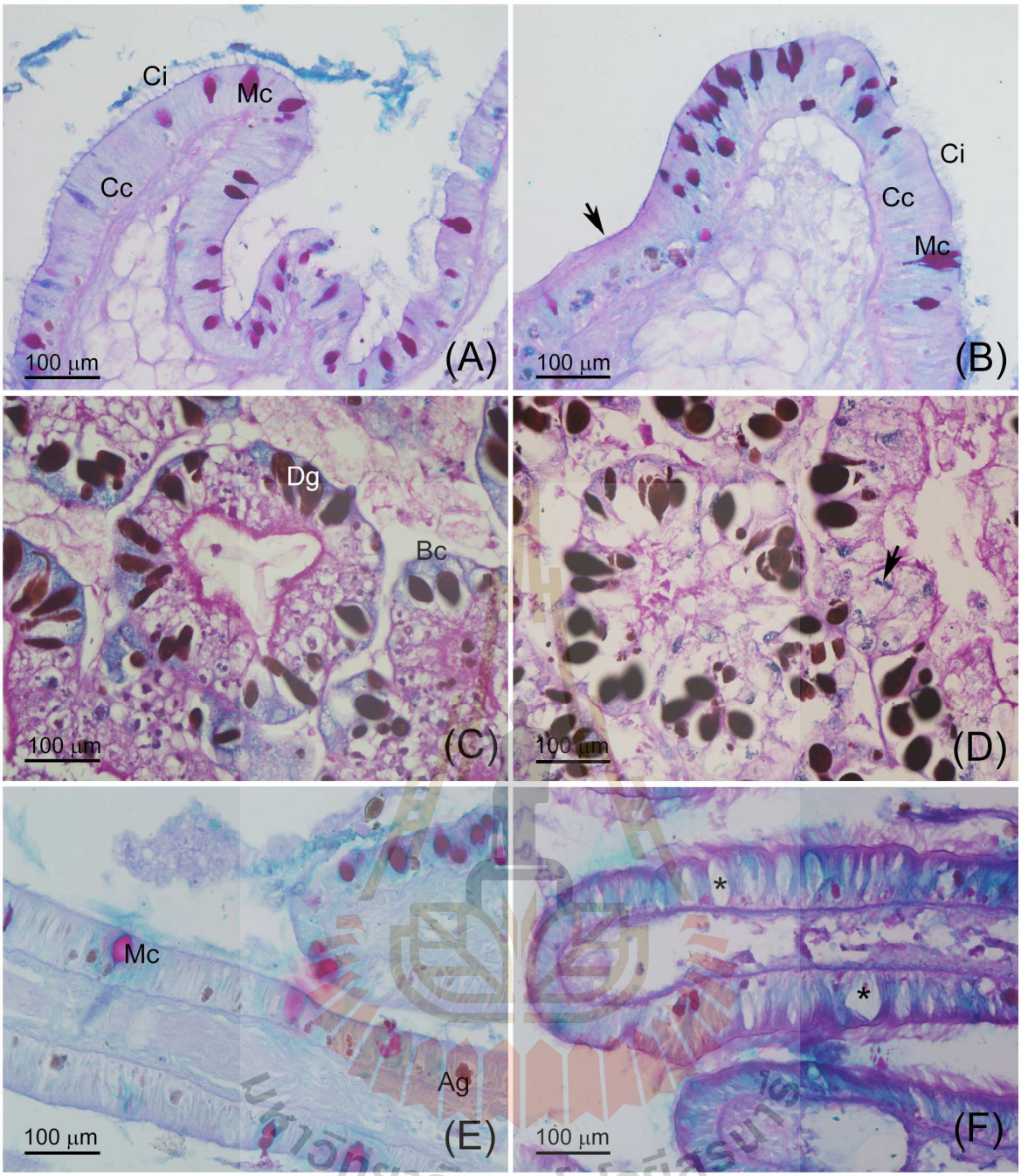
หลังจากนั้นตรวจสอบผลเจตมูลเพลิงแดงต่ออวัยวะเป้าหมายของหอยเชอรี่ ว่ามีผลต่ออวัยวะใดมากที่สุด โดยเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากทางเดินอาหารได้แก่ หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก และอวัยวะอื่นๆ เช่นริ้วเหงือก เท้าและตับ เพื่อดูพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นหลังได้รับสารสกัดหรือสารที่ทดสอบพบว่าทางเดินอาหารของหอยเชอรี่ประกอบด้วยเยื่อบุผิวแบบ simple ciliated columnar epithelium ซึ่งประกอบด้วย columnar cell ที่มี cilia มีนิวเคลียสรูปไข่อยู่ค่อนมาที่ฐานเซลล์และ mucus-secreting goblet cell (รูปที่ 4.3) ในบริเวณหลอดอาหาร (esophagus) พบว่ากลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์ มีจำนวน mucus-secreting goblet cell มีการเพิ่มทั้งจำนวนและขนาด มีการหลั่งเมือกออกมาสะสมที่หลอดอาหาร ในขณะที่กลุ่มที่ได้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยน้ำ มีโครงสร้างไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่มีการหลั่งเมือกออกมาในหลอดอาหารมากกว่าทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มเมทัลดีไฮด์ (รูปที่ 4.3 C) ปกติบริเวณกระเพาะอาหารของหอยเชอรี่ถูกเคลือบด้วยสารต้านต่อกรด เพื่อป้องกันอันตรายจากน้ำย่อยของกระเพาะ พบว่าส่วนที่เคลือบด้วยสารต้านกรดในกลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์มีความหนาลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มที่ให้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยน้ำไม่พบตัวเคลือบสารต้านกรดในกระเพาะอาหาร (รูปที่ 4.3 D-F) ส่วนลำไส้หอยเชอรี่ประกอบด้วย basal cell, columnar cell และ mucus-secreting goblet cell โดยจำนวน mucus secreting goblet cell เพิ่มขึ้นเรื่อยจากลำไส้เล็กส่วนต้นไปยังลำไส้เล็กส่วนปลายและไส้ตรง ผลการทดลองพบว่ากลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์เกิด necrosis ที่ basal และ columnar cells ในขณะกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงด้วยน้ำมีการคัดหลั่งสารเมือกออกมาที่ช่องว่างของลำไส้ (รูปที่ 4.3 G-I). ในบริเวณไส้ตรงพบว่ามีจำนวน mucus secreting goblet cell ในกลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์น้อยกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดง ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงมีลักษณะคล้ายกับกลุ่มควบคุม เพียงแต่บางแห่งของเยื่อบุไม่พบ cilia (Fig. 4.2J-L)

ย้อม PAS-Alcian blue pH 2.5 ในลำไส้เทียบกับต่อมในทางเดินอาหาร (digestive gland) และริ้วเหงือกดังรูปที่ 4.3 พบว่า mucus secreting goblet cell ในกลุ่มควบคุม สร้างสารคัดหลั่งออกมา 2 ประเภทคือ กลุ่มที่เป็น polysaccharide ติดสีชมพูเข้ม ในขณะกลุ่มที่สร้างสารเป็น neutral mucin จะติดสีฟ้า ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงพบว่า mucus secreting goblet cell มีการสร้างเมือกกลุ่ม polysaccharide ออกบริเวณด้านบนของเซลล์และพบ vacuole บริเวณฐานเซลล์ (รูปที่ 4.4 B) ส่วนใน digestive gland ประกอบด้วย basal cell มีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมติดอยู่ที่ฐานเซลล์ภายในเซลล์มี dark granules แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ ส่วน digestive gland ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพบว่ามีการตายของเซลล์และเห็นเป็น inclusion body ภายในเซลล์(รูปที่ 4.4 C-D) ริ้วเหงือกเป็นอวัยวะที่มีการสัมผัสกับสารต่างๆ ในน้ำ ซึ่งส่วนของริ้วเหงือกประกอบด้วยเยื่อบุ ciliated columnar epithelial cells with mucus secreting goblet cell ที่มีแกนกลางเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน หลังจากสัมผัสสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงพบว่าเกิดการตายของ columnar cell เป็นโพรงช่องว่าง (รูปที่ 4. 4 E-F)

สรุปได้ว่าสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงสร้างความระคายเคืองให้กับทางเดินอาหารและริ้วเหงือกของหอยเชอรี่ โดยกระตุ้นให้มีการหลั่งเมือกออกมาป้องกันการระคายเคืองทั้งที่ริ้วเหงือกและทางเดินอาหาร



รูปที่ 4.3 แสดงระบบทางเดินอาหารของหอยเชอรี่ หลังทดสอบด้วยเมทัลดีไฮด์และสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงด้วยน้ำ เมื่อย้อมสี Hematoxylin และ Eosin. ทางเดินอาหารแบ่งเป็นแถวที่ 1: หลอดอาหาร แถวที่ 2: กระเพาะอาหาร แถวที่ 3: ลำไส้ และแถวที่ 4: ไส้ตรง. (A) หลอดอาหารของกลุ่มควบคุมบุด้วย simple columnar epithelium (Cc) with long cilia (Ci) และ basal nuclei, Ag: acidophilic granule. (B) หลอดอาหารของกลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์ (positive control) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดง (C) พบว่ามีการคัดหลั่งสารออกมาที่ช่องว่างของหลอดอาหาร (ลูกศร) บริเวณกระเพาะอาหารของกลุ่มควบคุม (D) พบว่ามีสารเคลือบผิวด้านบนสุดของเยื่อบุของกระเพาะอาหาร (ลูกศร) เช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์ (E) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดง (F) พบว่าไม่มีสารเคลือบทางด้านบน (หัวลูกศร) (G-I) แสดงเยื่อบุลำไส้ของกลุ่มควบคุม (G) กลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์ (H) และกลุ่มได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดง (I) พบว่าเกิด necrosis (ลูกศร)ในขณะที่กลุ่มได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงมีการหลั่งเมือกมากกว่ากลุ่มอื่น (หัวลูกศร) ส่วนไส้ตรงพบว่ามีเยื่อบุเป็น simple columnar epithelium with numerous mucus – secretory cell กลุ่มควบคุม (J) กลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์ (K) และกลุ่มได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดง (L) พบว่า columnar cell ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงไม่พบ cilia บางแห่ง (L, หัวลูกศร)



รูปที่ 4.4 แสดงส่วนทางเดินอาหารและริ้วเหงือกของหอยเชอรี่ หลังทดสอบด้วยเทมัลดีไฮด์และสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงด้วยน้ำเมื่อย้อมสี PAS-Alcian blue pH 2.5. (A) ลำไส้ของกลุ่มควบคุมบุด้วย simple columnar epithelium with cilia (Ci) และ mucus secreting cells ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดง (B) พบว่ามีการสูญหายของ cilia (ลูกศร). (C) Digestive gland tubule ประกอบด้วย digestive cells (Dc) และ basophilic cells (Bc). (D) Digestive gland tubule หลังได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงแล้วพบการตายของเซลล์ใน digestive cells (ลูกศร). (E) ริ้วเหงือกของหอยเชอรี่บุด้วย ciliated columnar cells (Cc) with cilia (Ci). Hemocytes (Hc) สามารถพบได้ใน hemolymph space. (F) ริ้วเหงือกของหอยที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงมีการขาดหายของ cilia และ intercellular spaces (*) ระหว่าง columnar cells (Cc).

4.4 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากพืชบางชนิดหรือเมทัลดีไฮด์ร่วมกับสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงต่อการตายของหอยเชอรี่

หลังจากทราบผลการทดลองจากตารางที่ 4.1 ตัวทำละลายที่ให้ผลฆ่าหอยเชอรี่ที่ดีที่สุดคือแอลกอฮอล์ นำมาศึกษาเปรียบเทียบผลสารสกัดจากกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ร่วมกับสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงต่อการตายของหอยเชอรี่ว่าสารสกัดจากกากชา (Camellia oleifera oil :OL) หรือเมทัลดีไฮด์ (metaldehyde :MDH) สามารถใช้เป็นตัวเสริมประสิทธิผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงหรือไม่ จากการทดสอบผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 2.5 และ 5 µg/ml ต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่ระยะตัวเต็มวัย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ที่ไม่ใส่สาร) กลุ่ม vehicle (น้ำผสม 95% แอลกอฮอล์) และกลุ่มที่ได้รับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ 5 µg/ml (ตารางที่ 4.2) พบว่าอัตราการตายของหอยเชอรี่เท่ากับ 30% (LC_{50} =7.59 µg/ml), 40% (LC_{50} =6.27 µg/ml) และ 100% (LC_{50} = 1.59 µg/ml) เมื่อใช้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา โดยเรียงตามลำดับความเข้มข้นของกากชา เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกากชากับกากชาอย่างเดียวพบว่า หอยเชอรี่ที่ได้รับกากชาเพียงอย่างเดียว ทำให้หอยเชอรี่มีอัตราการตายเท่ากับ 50% โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 5.29 µg/ml ซึ่งจะเห็นว่าการใช้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชามีผลต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่ดีกว่ากากชาอย่างเดียวถึง 3.32 เท่าเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์กับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา พบว่าสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 0.5 µg/ml (LC_{50} = 8.19 µg/ml) มีผลต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่น้อยกว่าสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมทัลดีไฮด์เป็น 2.5 และ 5 µg/ml ส่งผลต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสารสกัดเจตมูลเพลงแดงร่วมกับกากชา โดยมีอัตราการตายของหอยเชอรี่เท่ากับ 40% (LC_{50} =1.96 µg/ml) และ 100% (LC_{50} = 1.55 µg/ml) เมื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมเมทัลดีไฮด์กับเมทัลดีไฮด์อย่างเดียวพบว่าเมทัลดีไฮด์ ทำให้หอยมีอัตราการตายเท่ากับ 20% โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 9.67 µg/ml จึงสรุปได้ว่าสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงใช้ร่วมกับเมทัลดีไฮด์ดีกว่าใช้เมทัลดีไฮด์เพียงอย่างเดียวและดีกว่าใช้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาที่ความเข้มข้น 2.5 µg/mlถึง 3.2 เท่า แต่หากเพิ่มปริมาณกากชาเป็น 5 µg/ml ร่วมกับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดง จะได้ผลไม่แตกต่างจากการใช้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์ นอกจากนี้เมื่อนำไปเทียบกับตารางที่ 4.1 ที่ใช้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงเพียงอย่างเดียวพบว่าการใช้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา 5 µg/ml ทำให้อัตราการตายของหอยเพิ่มขึ้นจาก 75% เป็น 100% ซึ่งสรุปได้ว่ากากชาช่วยเสริมฤทธิ์ของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดง

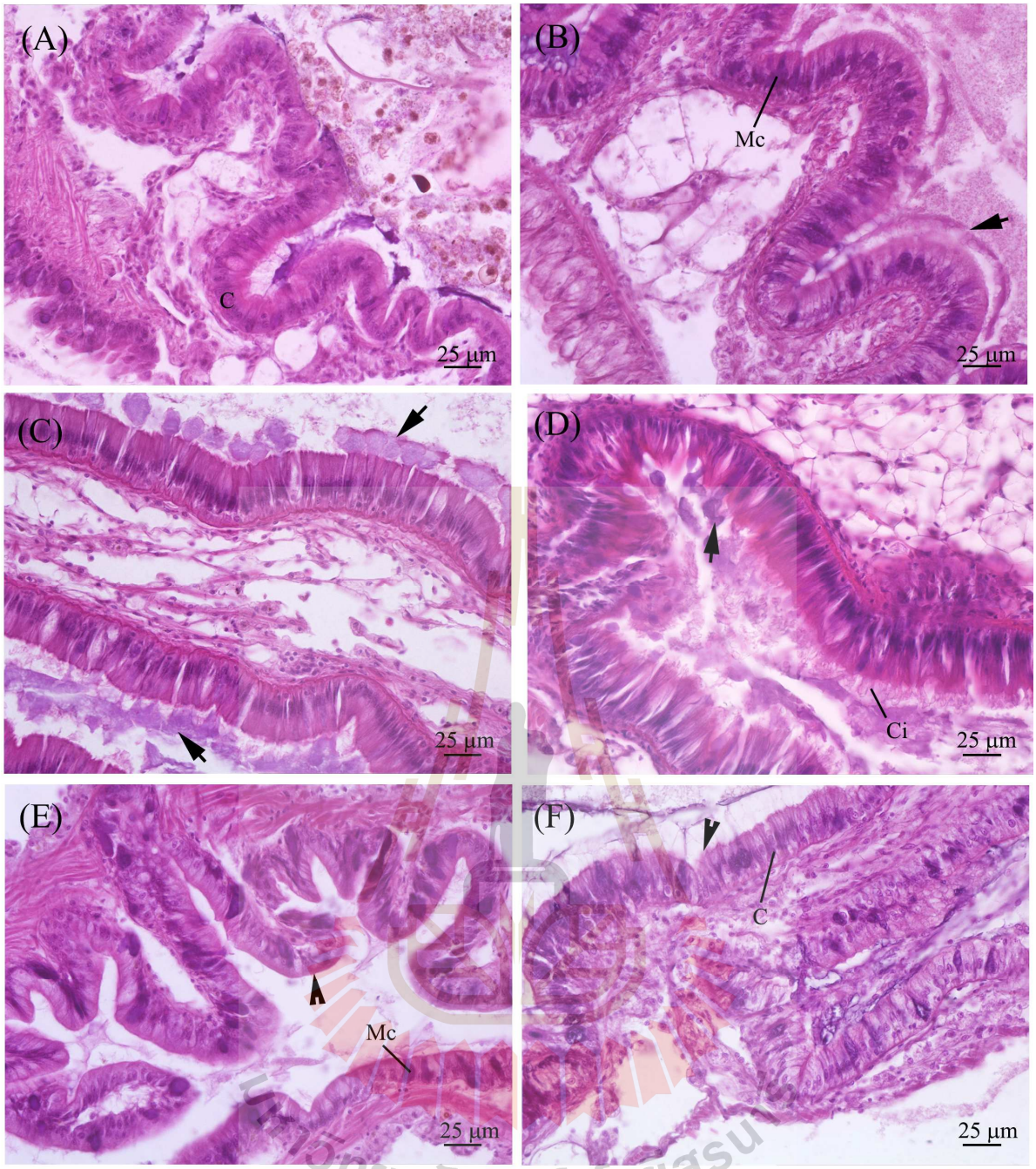
ตารางที่ 4.2 การทดสอบผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา และเมทัลดีไฮด์ ต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่ระยะตัวเต็มวัย ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ลำดับ		อัตราการตาย (%)	**ค่า** LC_{50} (µg/ml)
กลุ่มที่ 1	กลุ่มควบคุม (negative control)	-	-
กลุ่มที่ 2	น้ำประปาที่ผสมแอลกอฮอล์ 95% (กลุ่ม vehicle)	-	-
กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ได้รับ EtOH-cPI 500 µg/ml กับ OL 0.5 µg/ml	30	7.59
กลุ่มที่ 4	กลุ่มที่ได้รับ EtOH-cPI 500 µg/ml กับ OL 2.5 µg/ml	40	6.27
กลุ่มที่ 5	กลุ่มที่ได้รับ EtOH-cPI 500 µg/ml กับ OL 5 µg/ml	100	1.59
กลุ่มที่ 6	กลุ่มที่ได้รับ EtOH-cPI 500 µg/ml กับ MDH 0.5 µg/ml	25	8.19
กลุ่มที่ 7	กลุ่มที่ได้รับ EtOH-cPI 500 µg/ml กับ MDH 2.5 µg/ml	40	1.96
กลุ่มที่ 8	กลุ่มที่ได้รับ EtOH-cPI 500 µg/ml กับ MDH 5 µg/ml	100	1.55
กลุ่มที่ 9	กลุ่มที่ได้รับ OL 5 µg/ml	50	5.29
กลุ่มที่ 10	กลุ่มที่ได้รับ MDH 5 µg/ml	20	9.67

Camellia oleifera oil (OL) ในคอลัมน์เดียวกันที่มีอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.5 พยาธิสภาพเนื้อเยื่อที่เปลี่ยนแปลงของหอยเชอรี่ หลังทดสอบสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับพืชบางชนิดหรือเมทัลดีไฮด์

หลังจากการทดลองได้นำเนื้อเยื่อตัวอย่างหอยกลุ่มละ 3 ตัว มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อทางเดินอาหาร (หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้และต่อมของทางเดินอาหาร) ริ้วเหงือกและกล้ามเนื้อเท้า (รูปที่ 4.5- 4.10) หลังย้อมด้วย H & E พบว่าหลอดอาหารของหอยที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกากชา หรือกากชาเพียงอย่างเดียว มีการสร้างสารคัดหลั่งพวกเมือกออกจาก mucus secreting goblet cell เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับกากชาเพียงอย่างเดียว (รูปที่ 4.5 C) พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกากชาที่ความเข้มข้นต่ำสุด (0.5 µg/ml) มีโครงสร้างเยื่อบุไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์เพียงอย่างเดียว แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกากชาเป็น 5 µg/ml ร่วมกับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดง ทำให้ cilia บน columnar cell หายไปและมีการสะสมสารคัดหลั่งใน mucus secreting cells เป็นจำนวนมาก กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์ มีการเปลี่ยนแปลงเยื่อบุส่วนหลอดอาหารเช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับกากชา (รูปที่ 4.5 F)

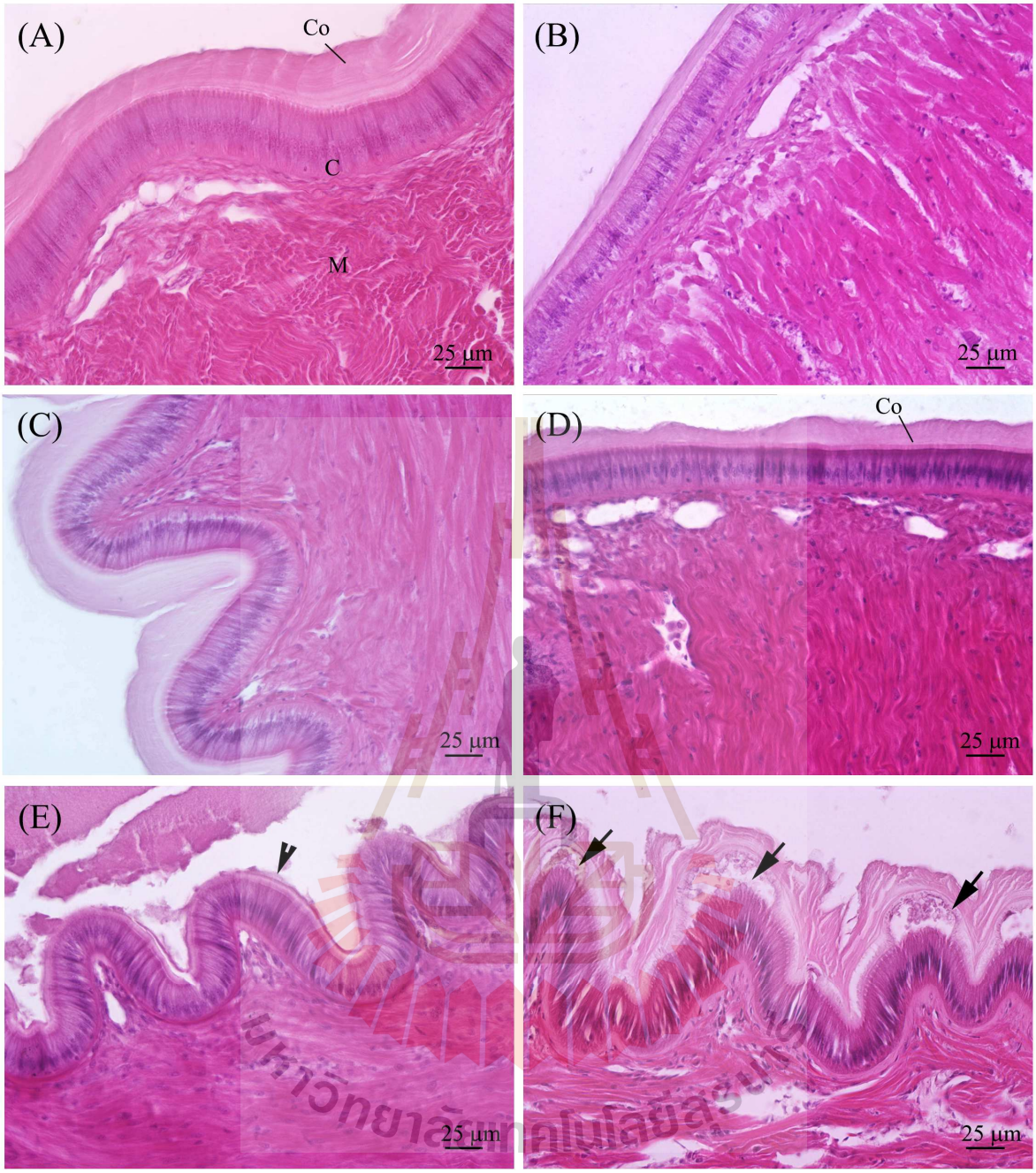


รูปที่ 4.5 แสดงหลอดอาหารของหอยเชอรี่ หลังทดสอบด้วยสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยแอลกอฮอล์ร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อย้อมสี Hematoxylin และ Eosin. (A) หลอดอาหารของกลุ่มควบคุมบุด้วย simple columnar epithelium (C) with long cilia (B) หลอดอาหารของกลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์ 5 µg/ml (positive control) และกลุ่มที่ได้รับกากชา 5 µg/ml (C) พบว่ามีการคัดหลั่งสารออกมาที่ช่องว่างของหลอดอาหาร (ลูกศร) (D) หลอดอาหารกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา 0. 5 µg/ml พบว่ามีเมือกออกมาในช่องว่างของหลอดอาหาร (ลูกศร) เช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับกากชาอย่างเดียว แต่ cilia บริเวณด้านบนของ columnar cell หายไป (E, หัวลูกศร) เมื่อเพิ่มปริมาณกากชาเท่ากับ 5 µg/ml หรือกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมเมทัลดีไฮด์

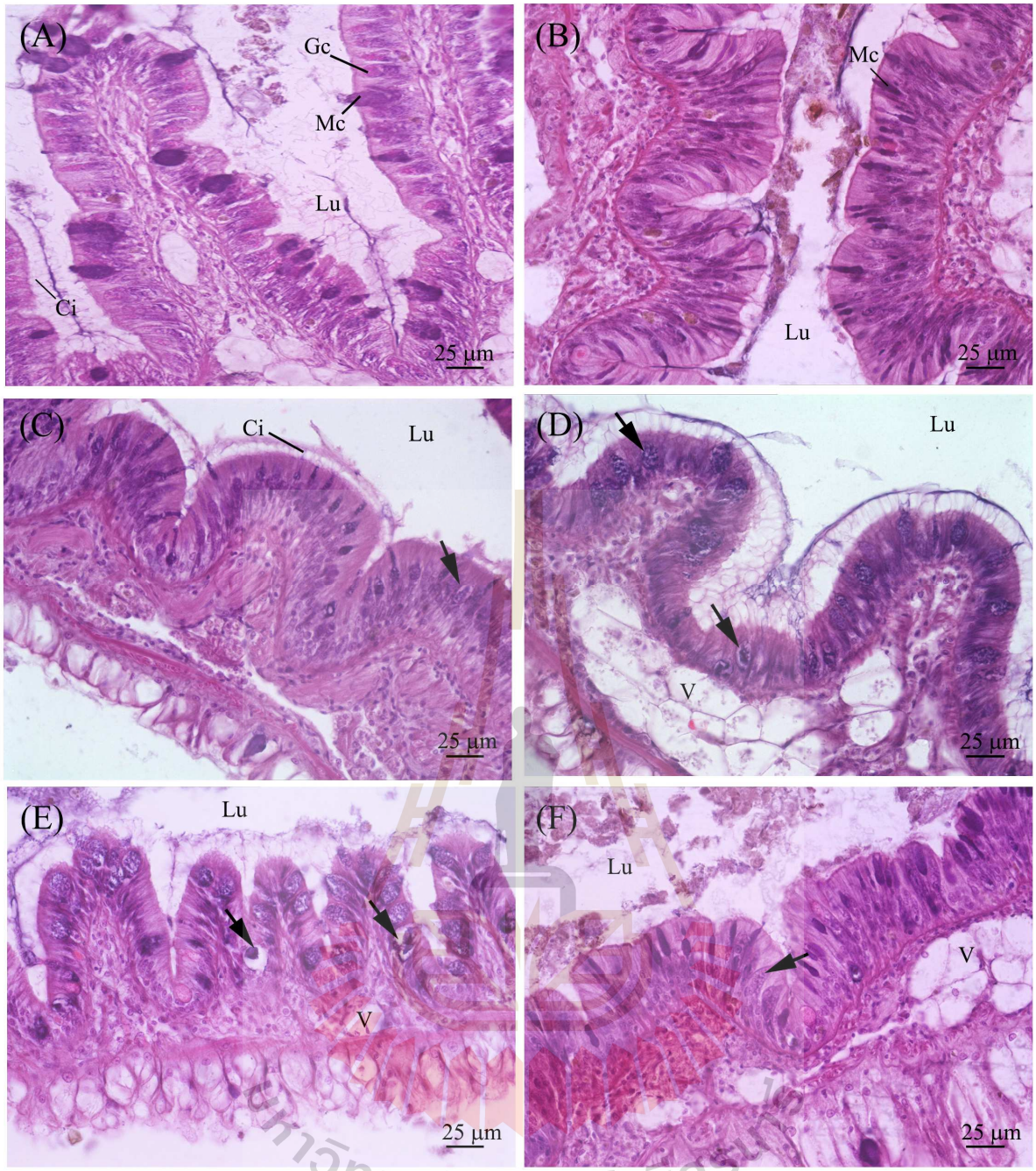
เมื่อเปรียบเทียบบริเวณกระเพาะอาหารของหอยกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ (รูปที่ 4.6) พบว่าเยื่อบุกระเพาะอาหารของหอยปกติบุด้วย simple columnar epithelium with coating substance ส่วนกลุ่มที่ได้รับกากชาหรือเมทัลดีไอด์เพียงอย่างเดียวพบเยื่อบุเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม แต่มีความหนาของ coating substance ต่างกัน โดยกลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์อย่างเดียวมี coating substance บางกว่ากลุ่มที่ได้รับกากชาอย่างเดียว ส่วนกลุ่มที่ได้รับเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาที่ความเข้มข้นต่ำสุด (0.5 µg/ml) มีโครงสร้างเยื่อบุไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่มี coating substance บางเหมือนกับกลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์อย่างเดียว สารเคลือบกระเพาะเกิดการแยกตัวออกจากเยื่อบุกระเพาะบางส่วนและหลุดออกจากเยื่อบุกระเพาะ เมื่อได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 5 µg/ml (รูปที่ 4.6 E-F)

เมื่อเปรียบเทียบบริเวณส่วน villi ของลำไส้เล็กของหอยกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ (รูปที่ 4.7) ปกติลำไส้เล็กบุด้วย simple columnar with cilia and mucous secreting goblet cells ซึ่งมี granular cell เป็นองค์ประกอบหลัก หลังจากลำไส้สัมผัสกับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่า granular cell ในเยื่อบุลำไส้ของหอยที่ได้รับเมทัลดีไฮด์หรือกากชาเพียงอย่างเดียว มีขนาดเล็กลีบลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่จำนวน mucous secreting goblet cell มีเพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดและเกิด granular cell เกิด vacuolization ในกลุ่มที่ได้รับกากชาเพียงอย่างเดียว ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาที่ความเข้มข้นต่ำสุด (0.5 µg/ml) พบว่ามีเยื่อบุเหมือนทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับกากชา แต่พบว่าเกิด vacuoles ขนาดใหญ่ใต้เยื่อบุผิวและยังพบว่า mucous secreting goblet cell มีสารคัดหลั่งสะสม ภายในเซลล์เป็นจำนวนมากและเกิด vacuolization ของ granule cells เช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับกากชาเพียงอย่างเดียว พบว่าเกิดการ vacuolization ใต้ต่อเยื่อบุผิวและภายในของ granular cell เป็นจำนวนมาก เมื่อได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาหรือ เมทัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 5 µg/ml (รูปที่ 4.7 E-F)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 4.6 แสดงกระเพาะอาหารของหอยเชอรี่ หลังทดสอบด้วยสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยแอลกอฮอล์ร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อย้อมสี Hematoxylin และ Eosin. (A) เยื่อบุกระเพาะอาหารของกลุ่มควบคุมบุด้วย simple columnar epithelium (C) with coating substance (Co) ; M : muscle. (B) กลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์อย่างเดียว 5 µg/ml (C) กลุ่มที่ได้รับกากชาอย่างเดียว 5 µg/ml (D) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาที่ความเข้มข้น 0.5 µg/ml (E) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา 5 µg/ml เกิดการแยกของสารเคลือบกระเพาะ (หัวลูกศร) และ (F) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์ 5 µg/ml เกิดการแยกเป็นบางส่วนของสารเคลือบกับกระเพาะ พบ inclusion body บริเวณแยก (ลูกศร)



รูปที่ 4.7 แสดงลำไส้เล็กของหอยเชอรี่ หลังทดสอบด้วยสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยแอลกอฮอล์ร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อย้อมสี Hematoxylin และ Eosin. (A) เยื่อบุลำไส้เล็กของกลุ่มควบคุมเยื่อบุประกอบด้วย granular cell (Gc) with cilia และ mucous secreting goblet cell (Mc) (B) กลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์อย่างเดียว 5 µg/ml (C) กลุ่มที่ได้รับกากชาอย่างเดียว 5 µg/ml เกิด vacuole (ลูกศร) ภายใน granular cell (D) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาที่ความเข้มข้น 0.5 µg/ml เกิด vacuole (ลูกศร)เช่นเดียวกัน แต่ granular cell บวมกว่ากลุ่มที่ได้รับกากชาอย่างเดียว (E) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา 5 µg/ml เกิด vacuole (V) ที่ใต้ต่อเยื่อบุและ granular cell เกิด degeneration (หัวลูกศร) และ (F) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์ 5 µg/ml เกิด vacuole (V) ขนาดใหญ่ใต้เยื่อบุเช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา

Lu : luminal space

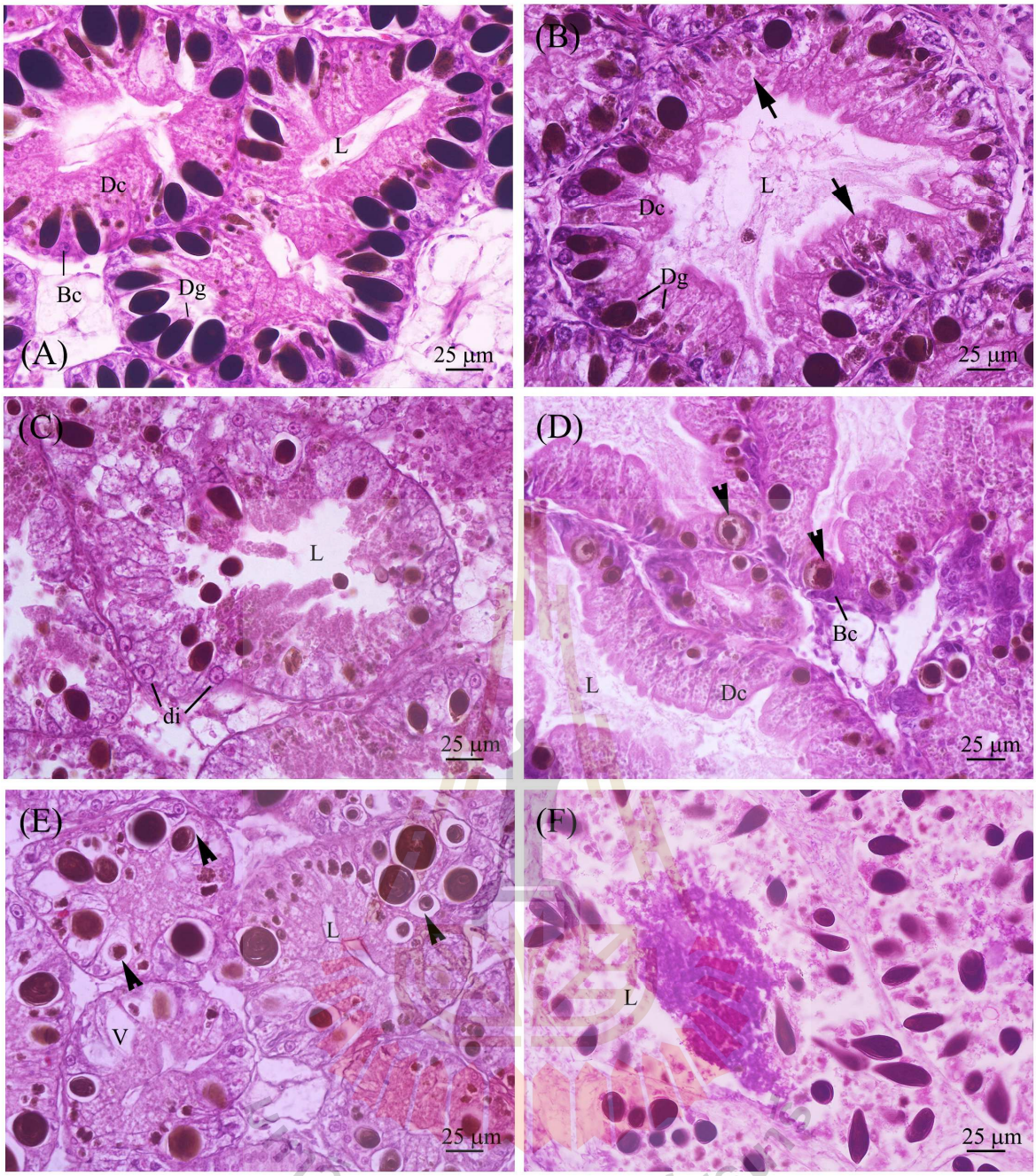
Digestive gland หรือ hepatopancreas เป็นอวัยวะที่สำคัญเทียบเท่าตับ ทำหน้าที่ในการทำลายสารพิษที่เข้าสู่ร่างกาย digestive gland แบ่งเป็น digestive tubules ซึ่งภายในประกอบด้วย digestive และ basophilic cells โดยพื้นที่ระหว่าง digestive tubules (intertubercular space) มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกาะกันอย่างหลวมๆ Digestive cell มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงแท่งภายในบรรจุ digestive granules ขนาดเล็กไปถึงขนาดใหญ่ ซึ่ง digestive granule ขนาดใหญ่มีลักษณะกลมรีคล้ายเมล็ดแตงโม ส่วน basophilic cell มีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมพีระมิดฐานติดกับ basal lamina ภายใน cytoplasm ติดสีฟ้าเข้ม จากการทดสอบสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ โดยเปรียบเทียบในพยาธิสภาพเนื้อเยื่อกับกลุ่มควบคุม และกากชา หรือเมทัลดีไฮด์ 5 µg/ml (รูปที่ 4.8) พบว่ามี dilation ของ digestive cell จนไปถึงเกิด vacuoles และภายในพบ inclusion bodies ลักษณะของ digestive granules สร้างออกมาผิดรูปแตกต่างจากกลุ่มควบคุมเมื่อใช้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา 0.5 และ 5 µg/ml และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์ 5 µg/ml พบว่าเกิดการสลายของ digestive cell และ basophilic cell และเกิด inclusion body ขนาดใหญ่ภายใน lumen ซึ่งเมื่อเทียบกับพยาธิสภาพของ digestive gland ของหอยเชอรี่ที่ได้รับกากชา หรือ เมทัลดีไฮด์เพียงอย่างเดียวพบว่ากลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์ digestive granules ส่วนใหญ่มีลักษณะเหมือนกับกลุ่มควบคุม แต่มี dilation หรือ inclusion ของ digestive cell บางแห่ง ส่วนกลุ่มที่ได้รับกากชาเพียงอย่างเดียวพบว่ามี dilation ของ digestive cell มากกว่ากลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์เพียงอย่างเดียว เกิด vacuoles บางแห่ง ซึ่งเมื่อใช้กากชาร่วมกับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงเกิดพยาธิสภาพรุนแรงกว่าใช้กากชาเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ากากชาช่วยเสริมฤทธิ์สารสกัดเจตมูลเพลิงแดง

ริ้วเหงือกเป็นอวัยวะทางระบบทางเดินหายใจที่สัมผัสกับน้ำเพื่อจับออกซิเจนในน้ำ โดยปกติริ้วเหงือกประกอบด้วย ciliated columnar cells และ mucous cell เรียงเป็นริ้วทั้งสองด้าน โดยมีแกนกลางเป็นท่อน้ำเหลืองและหลอดเลือด (hemolymphatic vessels) หลังจากการทดสอบผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ โดยเปรียบเทียบในพยาธิสภาพเนื้อเยื่อกับกลุ่มควบคุม และกากชา หรือเมทัลดีไฮด์ 5 µg/ml (รูปที่ 4.9) กลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์ 5 µg/ml เพียงอย่างเดียวพบว่า columnar cell บวมและเกิด vacuoles และภายใน cytoplasm ของ mucous cell เต็มไปด้วยสารคัดหลั่ง ทำให้เบียด columnar cell ทางด้านข้างๆ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับกากชา 5 µg/ml เพียงอย่างเดียวพบว่า columnar cell ผอมลีบและบางแห่งไม่พบ cilia พบ mucous cell เพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา 0.5 µg/ml พบว่ามีพยาธิสภาพคล้ายกับกลุ่มที่ได้รับกากชาเพียงอย่างเดียว เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกากชาเป็น 5 µg/ml ร่วมกับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงปรากฏว่าเกิด vacuoles จำนวนมากภายใน columnar cells และไม่พบ cilia มีตุ่มพองด้านบนของ columnar cell นอกจากนี้ยังพบว่า hematolymphatic vessel บวม ทำให้ hemocytes เคลื่อนที่เข้ามาใน columnar cell ได้ เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มเมทัลดีไฮด์กับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์ พบว่าพยาธิสภาพของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์รุนแรงกว่ากลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไอด์เพียงอย่างเดียว โดยพบว่า columnar cell ไม่มี cilia และเกิด vacuoles เป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามพยาธิสภาพของกลุ่มที่ได้รับกลุ่ม

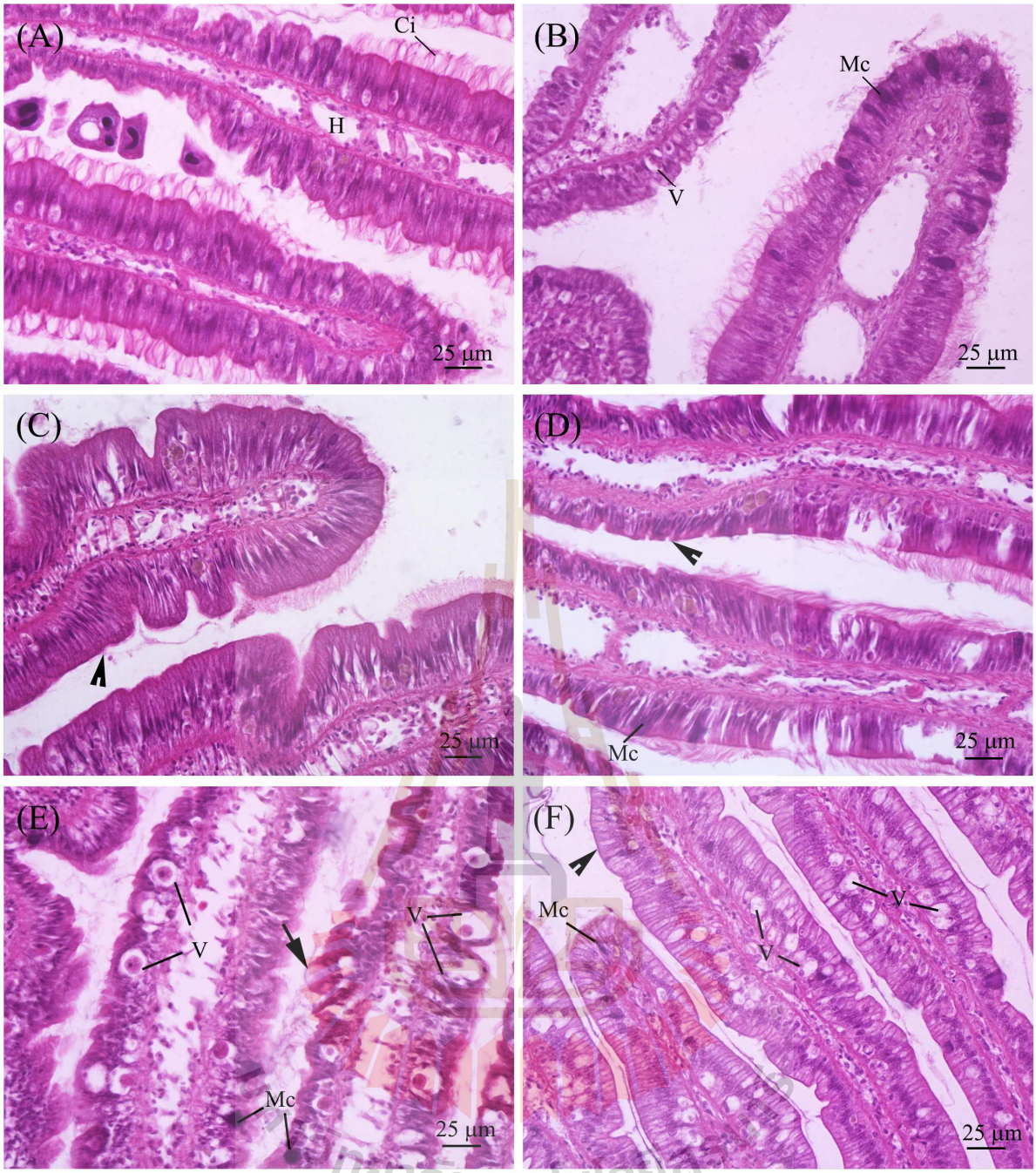
ที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาพบว่า พยาธิสภาพมีความรุนแรงกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์

โดยปกติกล้ามเนื้อเท้าของหอยเชอรี่ประกอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เซลล์รงควัตถุ (pigment cells) และเซลล์หลั่งเมือก (mucocyte cells) ซึ่งยึดติดกับผิว (epidermis) Epidermis ประกอบด้วย columnar cells with microvilli หลังจากการทดสอบผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ โดยเปรียบเทียบในพยาธิสภาพเนื้อเยื่อกับกลุ่มควบคุม และกากชา หรือเมทัลดีไฮด์ 5 µg/ml (รูปที่ 4.10) ผลปรากฏว่ากล้ามเนื้อเท้าของหอยที่ได้รับเมทัลดีไฮด์เกิด vacuoles กระจายตัวอยู่ในชั้นกล้ามเนื้อ แต่เส้นใยกล้ามเนื้อยังเป็น bundle และยังพบ epidermis ติดกับกล้ามเนื้ออยู่ ส่วนกลุ่มที่ได้รับกากชาเพียงอย่างเดียวพบว่ามี protein cells ขนาดใหญ่กระจายตัว แทรกอยู่ภายในชั้นกล้ามเนื้อ และพบว่าบริเวณผิวไม่มีส่วน epidermis (รูปที่ 4.10 C) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาที่ความเข้มข้นต่ำาสุด (0.5 µg/ml) กับกลุ่มที่มีความเข้มข้นสูงสุด (5 µg/ml) (รูปที่ 4.10 D และ E) พบว่ากลุ่มที่ได้รับกากชาที่ความเข้มข้นต่ำมีโครงสร้างของกล้ามเนื้อเท้าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่ความหนาแน่นของกล้ามเนื้อน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ในขณะกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาที่ความเข้มข้นสูง เกิดพยาธิสภาพเช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับกากชาเพียงอย่างเดียวนั้นคือมีการหลุดลอกของ epidermis และพบว่ามีการสะสมของ pigment cell รวมเป็นกลุ่มอยู่ในชั้นกล้ามเนื้อ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์ 5 µg/ml มีการสะสมของ pigment cell กระจายอยู่ปนกล้ามเนื้อเช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับกากชาเพียงอย่างเดียว

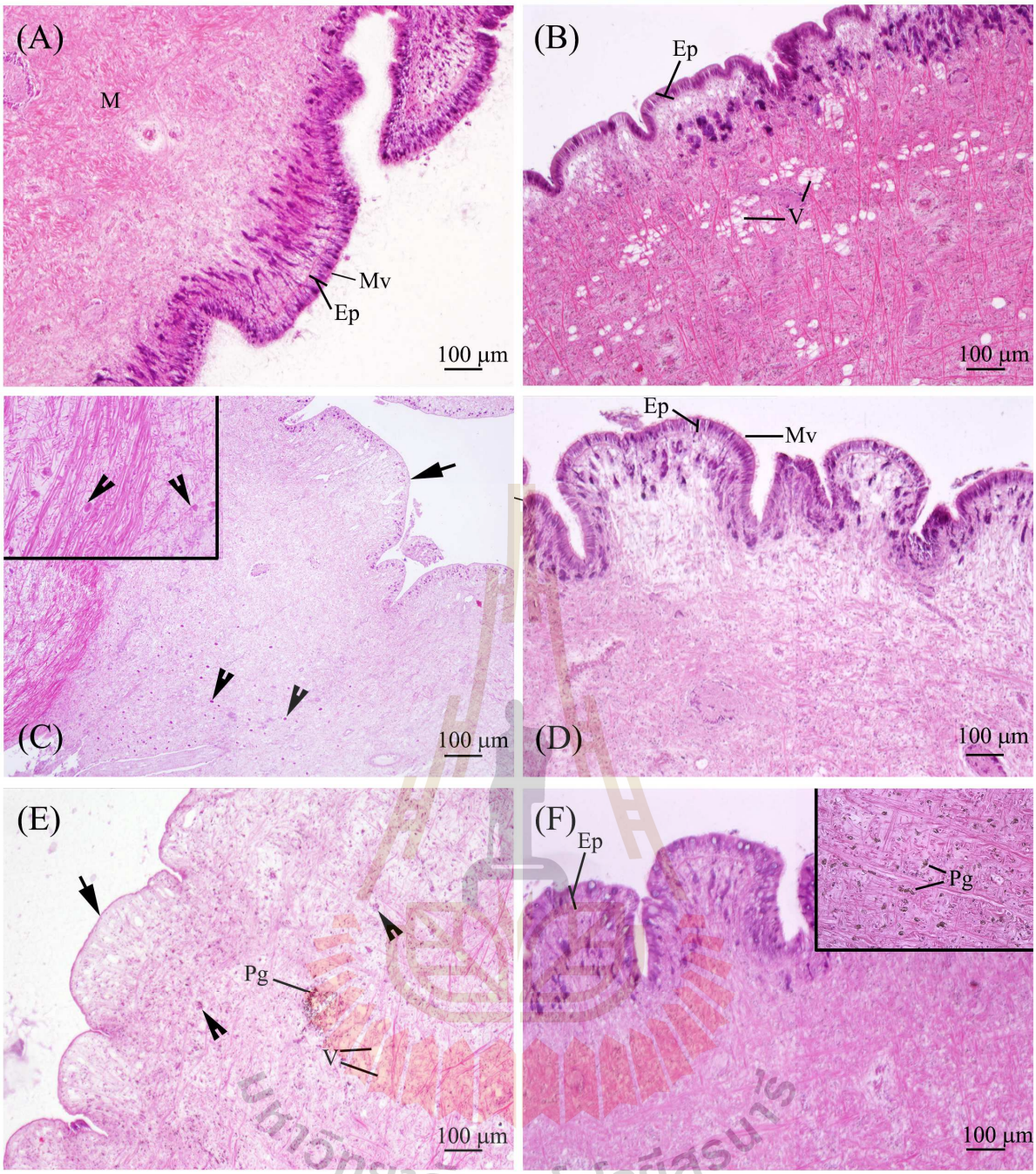
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 4.8 แสดงต่อมทางเดินอาหาร (digestive gland) ของหอยเชอรี่ หลังทดสอบด้วยสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยแอลกอฮอล์ร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อย้อมสี Hematoxylin และ Eosin. (A) กลุ่มควบคุม digestive gland ประกอบด้วย digestive cell (Dc) และ basophilic cell (Bc) เปิดเข้าสู่ lumen (L) ภายใน digestive cell มี digestive granules (Dg) สะสม (B) กลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์ 5 µg/ml พบว่าเกิด inclusion body สะสมภายใน columnar cell (ลูกศร) (C) กลุ่มที่ได้รับกากชา 5 µg/ml พบว่าเกิด columnar cells dilation (di) และมี digestive granules พบจำนวนน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (D–E) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา 0.5 , 2.5 และ 5 µg/ml พบว่า columnar cell เกิด vacuoles (V) จำนวนมากและ digestive granules ผิดรูป (หัวลูกศร) (F) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์ 5 µg/ml เซลล์ต่างๆ ภายใน digestive glands เกิดการสลายและมี Inclusion bodies ติดสีเข็มใน lumen



รูปที่ 4.9 แสดงริ้วเหงือกของหอยเชอรี่ หลังทดสอบด้วยสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยแอลกอฮอล์ร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อย้อมสี Hematoxylin และ Eosin. (A) กลุ่มควบคุมของริ้วเหงือกประกอบด้วย columnar cell (C) มี cilia (Ci) ยาวและ mucous cell (Mc) โดยแกนกลางของริ้วเหงือกเป็น hemolymphatic vessels (H) (B) กลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์ 5 µg/ml เกิด vacuole (V) ภายใน columnar cell (C) กลุ่มที่ได้กากชา 5 µg/ml พบว่า columnar cell ผอมลีบไม่มี cilia ในบางแห่ง (D-E) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา 0.5 และ 5 µg/ml พบว่า cilia หายไป (หัวลูกศร)และเกิด vacuoles (V) และตุ่มพอง (ลูกศร) ที่ columnar cell (F) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์ 5 µg/ml พบว่าพยาธิสภาพเหมือนกลุ่มที่ได้รับสรสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกากชา คือพบ vacuoles (V) และไม่มี cilia (ลูกศร) บน columnar cell



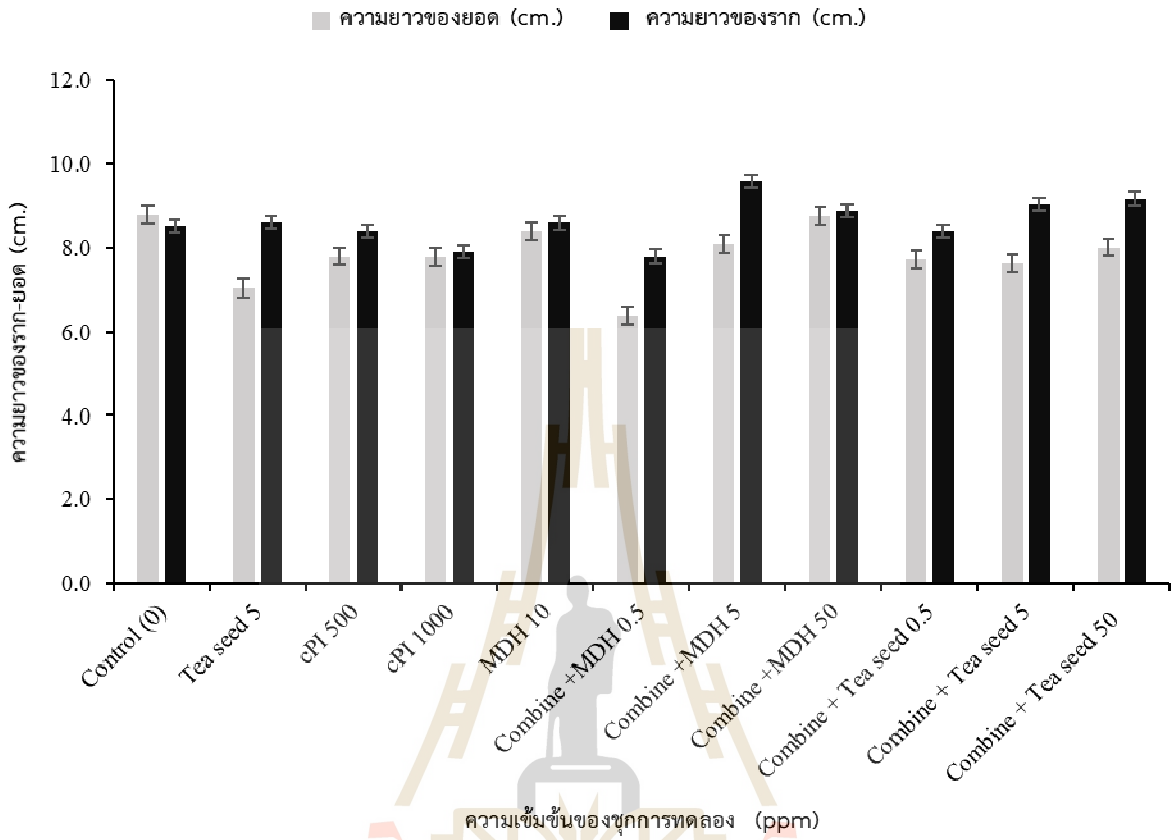
รูปที่ 4.10 แสดงกล้ามเนื้อเท้า (foot muscle : M) และผิว (epidermis : Ep) ของหอยเชอรี่ หลังทดสอบด้วยสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยแอลกอฮอล์ร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อย้อมสี Hematoxylin และ Eosin. (A) กลุ่มควบคุม epidermis ปกคลุมกล้ามเนื้อเท้ามี muscle fiber และ pigment cell (Pg) เป็นองค์ประกอบแทรกอยู่ในชั้นกล้ามเนื้อ ซึ่งด้านบนของ epidermis เป็น columnar cell with microvilli (Mv) (B) กลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์ 5 µg/ml พบ vacuoles (V) กระจายตัวอยู่ในชั้นกล้ามเนื้อ (C) กลุ่มที่ได้รับกากชา 5 µg/ml มีการสะสมของ protein cells (หัวลูกศร) มากกว่ากลุ่มควบคุม (D-E) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา 0.5 และ 5 µg/ml พบว่า epidermis หายไป (ลูกศร)เกิด vacuoles (V) และตุ่มพอง (ลูกศร) ที่ columnar cell (F) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์ 5 µg/ml พบว่ามีการสะสมของ pigment cell กระจายอยู่ปนกล้ามเนื้อเช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับกากชาเพียงอย่างเดียว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. ทดสอบสารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงกับเมล็ดข้าวในจานเพาะ

4.1 การหาความยาวราก และความยาวยอด

การใช้สารเคมีใดๆ ที่มีพิษกับสัตว์น้ำ ควรคิดถึงผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในภาคการเกษตร ซึ่งมีทั้งพืชและสัตว์ในระบบนิเวศน์นั้นๆ ทำให้ผู้วิจัยเล็งเห็นว่าควรวิเคราะห์ผลกระทบของสารที่จะนำไปใช้ในภาคการเกษตร โดยเฉพาะแปลงนาว่ามีผลต่อการเจริญของพืชหรือไม่ จึงทำการทดลองศึกษาผลของสารสกัดกับเมล็ดข้าวในจานเพาะ จากการทดลองหาความยาวของรากและความยาวของยอดข้าว ในการทดลองได้ผลแสดงในรูปที่ 4.11 และ 4.12 โดยกราฟแสดงค่าเฉลี่ยความยาวของรากและค่าเฉลี่ยความยาวของยอดหลังจากได้รับสารแต่ละชนิด โดยพบว่ากลุ่มควบคุมมีความยาวเฉลี่ยของราก 8.53 ± 1.57 cm. ขณะที่ค่าเฉลี่ยความยาวของยอด 8.80 ± 1.71 cm. ในกลุ่มที่ได้รับกากชาหรือสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงหรือเมทัลดีไฮด์เพียงอย่างเดียว พบว่าความยาวเฉลี่ยของยอดของทุกกลุ่มมีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุม โดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับกากชา มีค่าเฉลี่ยความยาวของยอดข้าวน้อยที่สุด (7.04±2.11 cm.) รองลงมาเป็นสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดง (7.79±1.94 cm.) และเมทัลดีไฮด์ (8.44±1.24 cm.) แต่อย่างไรก็ตามความยาวเฉลี่ยของยอดข้าวของกลุ่มที่ได้รับสารต่างๆ ในการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความยาวรากของทั้งสามกลุ่มกับกลุ่มควบคุมพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้น 500 ppm ส่งผลต่อการเจริญของรากดีกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้น 1,000 ppm ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกความเข้มข้นดังกล่าวนำมาทดสอบร่วมกับกากชา หรือเมทัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังที่กล่าวไปแล้วในหัวข้อ 4.1 ผลการทดลองพบว่าสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์ มีผลต่อค่าเฉลี่ยความยาวของยอด โดยพบว่าค่าเฉลี่ยความยาวของยอดยาวขึ้นเทียบเท่ากลุ่มควบคุมเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมทัลดีไฮด์เป็น 50 ppm และพบว่าเมื่อใช้สารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์ช่วยกระตุ้นความยาวของรากดีที่สุดเมื่อใช้เมทัลดีไฮด์ 5 ppm. เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความยาวรากและยอดของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา กับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์พบว่า กลุ่มที่ได้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา มีผลต่อค่าเฉลี่ยความยาวของยอดมากกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์ ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกากชาขึ้นจาก 0.5 เป็น 5 และ 50 ppm. ร่วมกับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดง ปรากฏว่าไม่ส่งผลต่อค่าเฉลี่ยความยาวยอด แต่ส่งผลต่อค่าเฉลี่ยความยาวราก โดยค่าเฉลี่ยความยาวรากยาวมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกากชา ในขณะกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์มีผลต่อความยาวของรากเช่นเดียวกับกากชา และเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์กับกลุ่มควบคุม พบว่าค่าเฉลี่ยความยาวของรากและความยาวของยอดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาการใช้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดง กากชา หรือเมทัลดีไฮด์เพียงอย่างเดียว พบว่ามีผลต่อความยาวของใบ แต่ไม่มีผลต่อความยาวราก และเมื่อใช้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา หรือเมทัลดีไฮด์ ส่งผลต่อค่าเฉลี่ยของความยาวยอดมากกว่าความยาวราก และให้ผลค่าเฉลี่ยความยาวของรากและยอดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการใช้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา หรือเมทัลดีไฮด์ไม่มีผลต่อความยาวของรากและความยาวของยอด ในช่วงการงอกออกจากเมล็ด



รูปที่ 4.11 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวของรากและความยาวยอด หลังจากแช่สารทดสอบการงอกและการเจริญของลำต้น (จำนวนตัวอย่างแต่ละกลุ่ม =10) (กากชา : tea seed 5 ppm; สารสกัดเจตมูลเพลิงแดง: cPI 500; cPI 1000 ppm;เมทัลดีไฮด์ : MDH 10 ppm; combine: สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์หรือกากชา ที่ความเข้มข้น 0.5, 5 และ 50 ppm)

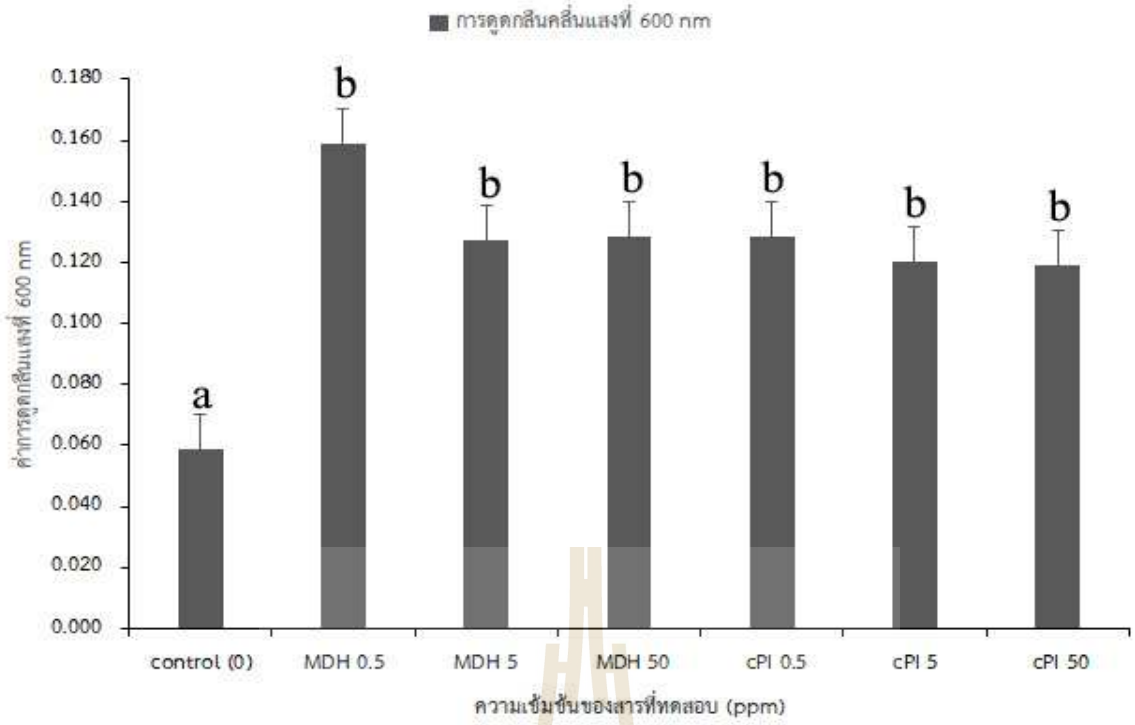
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ควบคุม	ยาฆ่าหอย 0.5 ppm	ยาฆ่าหอย 5 ppm	ยาฆ่าหอย 50 ppm	เจตมูล 0.5 ppm	เจตมูล 5 ppm	เจตมูล 50 ppm

รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะของต้นข้าวที่งอกหลังจากแช่สารที่ทดสอบการงอกและการเจริญของลำต้นเป็นเวลา 7 วัน พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดง มีความยาวของรากและลำต้นสูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์ (ยาฆ่าหอย) ที่ความเข้มข้นเดียวกัน

4. 2 การตรวจวัดเซลล์ที่ตาย

นอกจากดูผลของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงมีผลต่อความยาวของยอดและรากแล้ว การวัดการตายของเซลล์ที่รากเป็นอีกหนึ่งพารามิเตอร์ที่ใช้วัดผลของสารเคมีที่ใช้ทางการการเกษตรว่า การเจริญของรากจะทำยังคงดำเนินต่อไปเมื่องอกออกจากเมล็ด การหาปริมาณเซลล์ที่ตายด้วยการย้อมสี Evans blue ซึ่งเป็นสีย้อมที่ไม่สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ที่มีชีวิตอยู่และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ จึงใช้ย้อมดูปริมาณการตายของเซลล์ เมื่อย้อมสีเสร็จ ชะล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น แล้วชะสีย้อมออกด้วย N,N-dimethylformamide แล้วนำไปวัดสีด้วย spectrometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm แสดงผลในรูปที่ 4.13 ในการทดลองพบว่า ทั้งเมทัลดีไฮด์และสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงทุกความเข้มข้น มีผลต่อการตายของเซลล์รากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงได้มากกว่ากลุ่มควบคุมถึง 2 เท่า แต่อย่างไรก็ตาม ผลต่อการตายของเซลล์รากของทั้งสารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงและเมทัลดีไฮด์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองสรุปได้ว่าแม้เพิ่มปริมาณสารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงหรือเมทัลดีไฮด์ลงไปในดิน ก็ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์รากที่แตกต่างกัน ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับเมทัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 0.5 ppm ที่พบว่ามีการตายของเซลล์รากกว่ามากกว่าทุกกลุ่มในการทดลอง ซึ่งอาจจะเกิดจากความสมบูรณ์ภายในเมล็ดข้าวก็เป็นได้



รูปที่ 4.13 แสดงค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ของสีย้อม Evans blue ในการทดลอง (จำนวนตัวอย่างแต่ละกลุ่ม =10 ตัวอย่าง)

5 การทดสอบความเป็นพิษสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงกับสัตว์ทดลอง

นอกจากทดสอบผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงต่อหอยเชอรี่และพืชแล้ว สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยในพื้นที่การเกษตร เช่นหนูนาเป็นสัตว์อีกกลุ่มหนึ่งที่อาจได้รับผลกระทบจากการใช้สารเคมีหรือสารสกัดจากพืช ดังนั้นจึงต้องมีมีการตรวจสอบผลของเจตมูลเพลิงแดงในสัตว์ที่ไม่ใช่หอยเชอรี่ ในการทดลองครั้งนี้เลือกใช้หนูแฮมสเตอร์เนื่องจากติดเชื้อพยาธิจากหอยได้ดี จากการตรวจสอบผลการตายและพฤติกรรม หลัง 1, 6, 12 และ 24 h หลังการป้อนสารสกัดฯที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อศึกษาพิษในระยะเฉียบพลันภายใน 24 h หรือ 1 วัน พบว่าไม่มีอาการผิดปกติทางพฤติกรรมและไม่มีอาการแสดงออกทางคลินิก และยังมีชีวิตอยู่ทุกกลุ่ม ตาม OECD guideline (OECD/OCDE, 2001) เมื่อเปรียบน้ำหนักของร่างกายและน้ำหนักของอวัยวะภายในแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ 3,000 mg/kg มีน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดง (หัวใจ ปอด ตับ ไต และอวัยวะสืบพันธุ์) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกับน้ำหนักตัว ยกเว้นน้ำหนักตับกับไตของกลุ่มที่ได้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดง 3,000 mg/kg เท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 เมื่อคำนวณค่าน้ำหนักตับกับน้ำหนักตัว (liver index) พบว่าตับมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญและไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับสารสกัดฯ ซึ่งเป็นไปได้ว่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเกิดจากพยาธิสภาพที่ตับ แม้ว่าน้ำหนักของไตของกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 3,000 mg/kg สูงขึ้น 1.2 เท่าของน้ำหนักของกลุ่มควบคุมแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ศึกษาพิษในระยะกึ่งเรื้อรัง พบว่าหลังสัตว์ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าสัตว์ทุกกลุ่มที่ได้รับสารสกัดไม่เกิดความผิดปกติทางพฤติกรรมและไม่พบการตายของสัตว์ รายละเอียดแสดงในตารางที่ 4.3 เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มมีน้ำหนักตัวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่น้ำหนักอวัยวะภายในโดยเฉพาะ ตับ หัวใจและปอดของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 3,000 mg/kg สูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มอื่น ๆ ที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดง เมื่อคำนวณ liver index พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 400 และ 3,000 mg/kg มีค่า liver index สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นที่น่าสังเกตว่าน้ำหนักของหัวใจและปอดเพิ่มขึ้น ตามความเข้มข้นของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ได้รับ โดยน้ำหนักปอดและหัวใจของสัตว์ในกลุ่มที่รับสารสกัด 3,000 mg/kg มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แม้ว่าน้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์เพศหญิงจะสูงขึ้นแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เพื่อเป็นการสนับสนุนผลของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นว่าเกิดพยาธิสภาพภายในเนื้อเยื่อหรือไม่ จึงทำการตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลองพบว่าสัตว์ทดลองทุกกลุ่มไม่มีลักษณะผิดปกติทางกายภาพ แต่เมื่อตรวจสอบเนื้อเยื่อหลังย้อมสี H & E พบว่าภายในตับแบ่งออกเป็นพูเล็กๆ (lobule) โดยแต่ละ lobule มีเซลล์ตับ (hepatocyte) มีลักษณะเป็น polyhedral shape เรียงตัวเป็นแถวตามเส้นรัศมี โดยมีจุดศูนย์กลางเป็น central vein และขอบของ lobule เป็นที่อยู่ของ portal triad เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มที่ได้รับสารสกัดฯที่ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 4.14 พบว่ามี necrosis ของ hepatocyte ที่บริเวณ centrilobular area โดยมีลักษณะ hypertrophy และมี vacuole ภายใน cytoplasm ของ hepatocyte หลังจากได้รับสารสกัด 3,000 mg/kg ที่ 24 h นอกจากนี้ยังพบเม็ดเลือดแดงกระจายตัวอยู่ในเซลล์ตัว ส่วนกลุ่มอื่นที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดง พบว่ามีโครงสร้างไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม เมื่อตรวจสอบความเป็นพิษระยะกึ่งเฉียบพลัน ในวันที่ 7 พบว่าในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดฯ 3,000 mg/kg มีพยาธิสภาพที่ hepatocyte ลดลง โดยพบว่าไม่มีการตายของ hepatocyte แต่ยังพบเม็ดเลือดแดงกระจายอยู่ใน hepatocyte บางพื้นที่

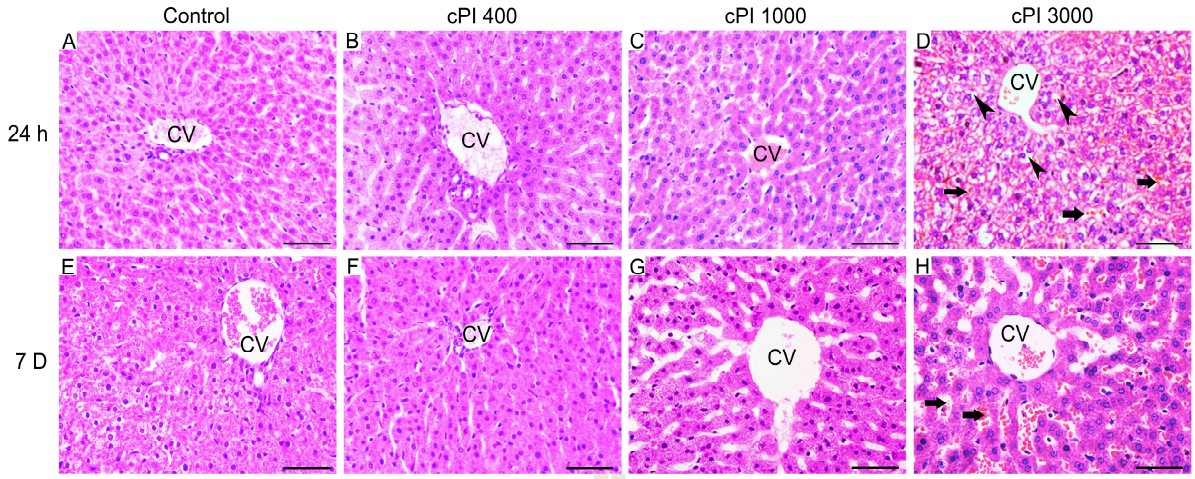
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 แสดงน้ำหนักตัวและน้ำหนักอวัยวะของหนูแฮมสเตอร์ หลังได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ณ 24 ชั่วโมงและ 7 วันข้อมูลแสดงในรูป means±SD

		Control		cPI treatment (mg/kg bw)							
				100		400		1000		3000	
		1D	7D	1D	7D	1D	7D	1D	7D	1D	7D
Body weight	Before	100.00±9.12	96.25±18.87	87.50±15.00	86.25±13.77	88.75±10.31	85.00±10.00	93.75±11.09	97.00±8.12	87.50±6.45	105.00±14.72
	After	96.25±18.87	100.00±7.07	86.25±13.77	97.50±2.89	85.00±10.00	88.75±16.52	97.00±8.12	97.50±5.00	105.00±14.72	111.25±10.31
Liver		2.79±0.15	3.39±0.15	3.39±0.42	3.45±0.37	3.27±0.62	3.26±0.71	3.26±0.25	3.43±0.26	5.44±0.85*#	5.25±1.35*#
Liver index		0.0035±0.0002	0.0039±0.0003	0.0042±0.0004	0.0044±0.0006	0.0041±0.0004	0.0051±0.0008*	0.0038±0.0002	0.0045±0.0002	0.0050±0.0006*#	0.0058±0.0006*#
Kidney		0.88±0.10	1.01±0.08	0.94±0.09	1.02±0.09	0.94±0.09	0.98±0.17	0.91±0.03	1.02±0.07	1.14±0.05*#	1.19±0.11
Heart		0.35±0.04	0.39±0.04	0.37±0.05	0.39±0.01	0.37±0.04	0.42±0.04	0.37±0.04	0.42±0.03	0.44±0.04	0.49±0.04*#
Lung		0.65±0.04	0.66±0.05	0.60±0.10	0.67±0.06	0.68±0.15	0.68±0.09	0.67±0.04	0.67±0.06	0.72±0.09	1.05±0.41*#
Spleen		0.15±0.02	0.16±0.02	0.18±0.03	0.15±0.01	0.17±0.05	0.19±0.06	0.16±0.02	0.19±0.01	0.21±0.04	0.20±0.06
Uterus and Ovary		0.38±0.01	0.24±0.02	0.42±0.13	0.29±0.03	0.55±0.08	0.27±0.10	0.21±0.02	0.13±0.01	0.28±0.02	0.39±0.07#
Testis		4.08±0.06	4.36±0.01	3.47±0.27	5.33±0.20	4.23±0.52	5.08±0.59	4.48±0.30	5.42±0.69	3.68±1.11	4.09±0.05

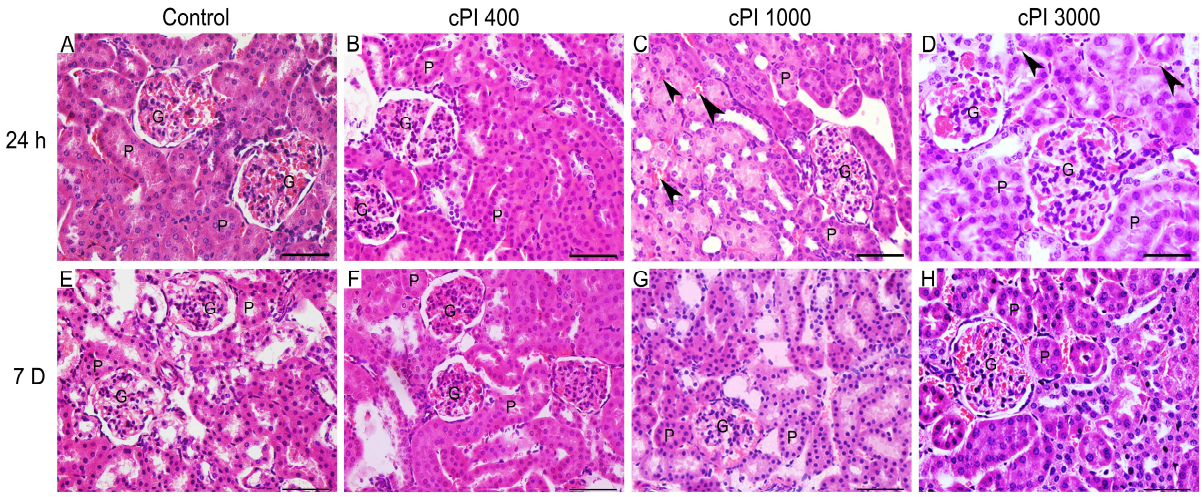
(N=6) ในคอลัมน์เดียวกันที่มี *, # แสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$ โดย * ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและ # ภายในกลุ่มที่ได้รับสาร)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 4.14 แสดงพยาธิสภาพของตับของสัตว์ทดลองหลังได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 24 ชั่วโมง (A-D) และ 7 วัน (E-H) โดยการย้อมด้วย H &E . (A และ E) กลุ่มควบคุม (B-D และF-H)) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้น 400, 1,000 และ 3,000 mg/kg เรียงตามลำดับ โดยพยาธิสภาพพบในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดฯใน 24 ชั่วโมงแรก ที่ความเข้มข้น 3,000 mg/kg เท่านั้น และพยาธิสภาพตับลดลงเมื่อได้รับสารสกัดติดต่อเป็นเวลา 7 วัน กำลังขยาย 400 เท่า (bar = 10 µm). CV=Central vein, หัวลูกศร =Cytoplasmic vacuole และลูกศร = Red blood cell

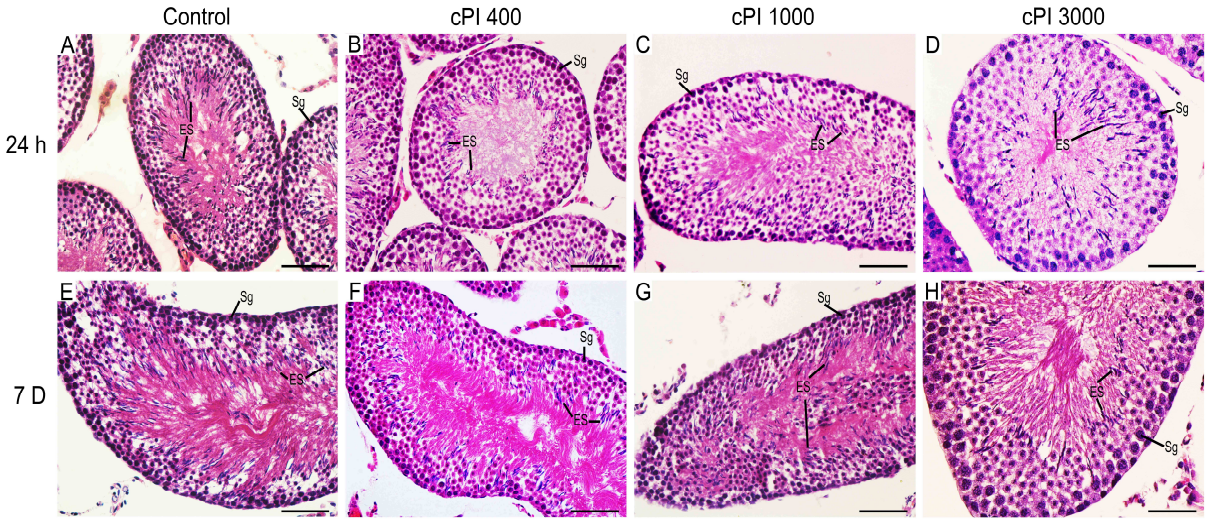
เมื่อตรวจสอบพยาธิสภาพภายในไตในระยะเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันพบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1,000 และ 3,000 mg/kg มีลักษณะเซลล์เยื่อบุบวมในท่อขดส่วนต้น (proximal convoluted tubule) จนทำให้ไม่เห็นช่องว่างภายในท่อ (luminal space) และพบเม็ดเลือดสะสมภายในช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุของไต (interstitial space) ในระยะเฉียบพลัน แต่ในระยะกึ่งเฉียบพลันพบว่าเกิดบาดเจ็บของไตลดลง เนื่องจากโครงสร้างภายในไตมีลักษณะคล้ายกับกลุ่มควบคุม คือ เซลล์เยื่อบุใน proximal convoluted tubule ไม่บวม แต่ยังพบเม็ดเลือดแดงกระจายตัวอยู่ใน interstitial space บางพื้นที่ของ renal cortex (รูปที่ 4.15) แม้ว่าน้ำหนักของหัวใจและปอดในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดง จะมีน้ำหนักสูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความผิดปกติทางพยาธิสภาพของกล้ามเนื้อหัวใจ



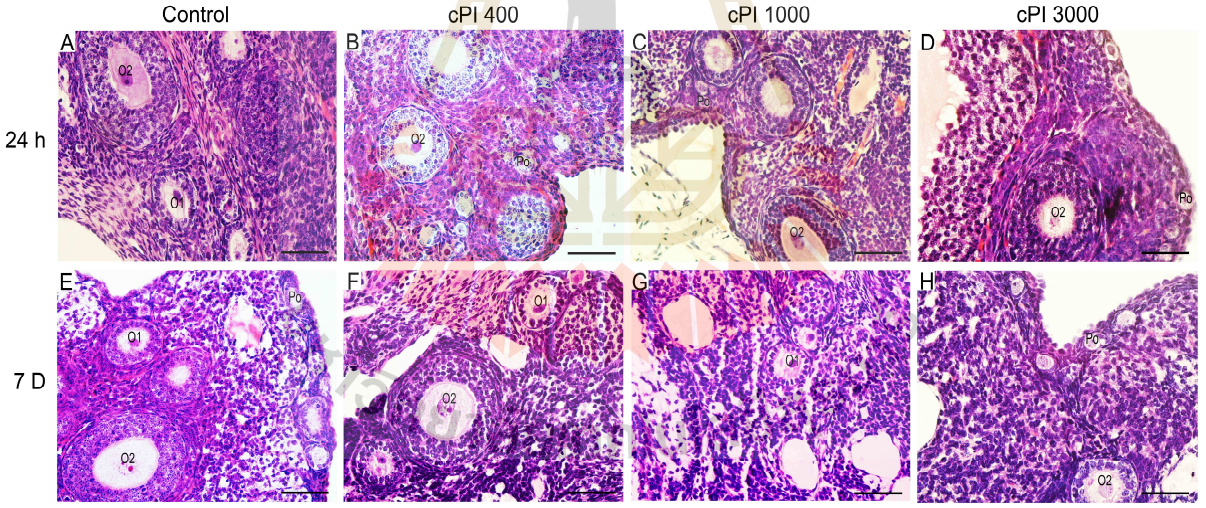
รูปที่ 4.15 แสดงพยาธิสภาพของไตของหนูแฮมสเตอร์หลังได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 24 ชั่วโมง (A-D) และ 7 วัน (E-H) โดยการย้อมด้วย H &E. (A และ E) กลุ่มควบคุม (B-D และ F-H) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้น 400, 1,000 และ 3,000 mg/kg ตามลำดับ โดยพยาธิสภาพพบในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดฯใน 24 ชั่วโมงแรก ที่ความเข้มข้น 1,000 และ 3,000 mg/kg และพยาธิสภาพของไตลดลงเมื่อได้รับสารสกัดติดต่อเป็นเวลา 7 วัน กำลังขยาย 400 เท่า (bar = 10 µm). G=Glomerulus, P=Proximal convoluted tubule, หัวลูกศร = Red blood cell

แม้ว่าน้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีรายงานก่อนหน้านี้ว่ามีผลต่อระบบสืบพันธุ์เพศผู้ จึงตรวจสอบพยาธิสภาพเพื่อเป็นการสนับสนุนความปลอดภัยทั้งในระยะเฉียบพลันและระยะกึ่งเฉียบพลัน โดยผลการทดลองพบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มที่โครงสร้างภายในท่อ seminiferous tubules ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม โดยภายในท่อประกอบด้วยสเปิร์มแต่ละระยะได้แก่ spermatogonium, pachytene spermatid, round spermatid,และ elongate spermatid ดังแสดงในรูปที่ 4.16 ส่วนในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ในรังไข่พบ oocyte ในระยะต่างๆ และเซลล์เยื่อบุมดลูกมีรูปร่างไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 4.16 และ 4.17

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 4.16 แสดงพยาธิสภาพของอวัยวะสืบพันธุ์เพศชายของสัตว์ทดลองหลังได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 24 ชั่วโมง (A-D) และ 7 วัน (E-H) โดยการย้อมด้วย H & E . (A และ E) กลุ่มควบคุม (B-D และ F-H) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้น 400, 1,000 และ 3,000 mg/kg ตามลำดับ โดยไม่พบพยาธิสภาพพบในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดฯใน 24 ชั่วโมงแรก และเมื่อได้รับสารสกัดติดต่อเป็นเวลา 7 วัน กำลังขยาย 400 เท่า (bar = 10 µm). Sg=Spermatogonium, ES=Elongate spermatid.



รูปที่ 4.17 แสดงพยาธิสภาพของอวัยวะสืบพันธุ์เพศหญิงของสัตว์ทดลองหลังได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 24 ชั่วโมง (A-D) และ 7 วัน (E-H) โดยการย้อมด้วย H & E . (A และ E) กลุ่มควบคุม (B-D และ F-H) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้น 400, 1,000 และ 3,000 mg/kg ตามลำดับ โดยไม่พบพยาธิสภาพพบในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดฯใน 24 ชั่วโมงแรก และเมื่อได้รับสารสกัดติดต่อเป็นเวลา 7 วัน กำลังขยาย 400 เท่า (bar = 10 µm). Po=Primordial ovum, O1=Primary ovum, O2=Secondary ovum

5.1 ตรวจวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ภายในเลือด

จากผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงกับหนูแฮมสเตอร์พบว่า น้ำหนักอวัยวะภายในของหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับสารสกัดมีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงตรวจสอบการทำงานของตับและไตในหนูแฮมสเตอร์ โดยแสดงผลในตารางที่ 4.4 การทำงานของตับใช้ค่าเอนไซม์ตับทั้ง 3 พารามิเตอร์คือ AST, ALT and AST/ALT ratio เทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงกับกลุ่มควบคุมพบว่า ในระยะเฉียบพลันค่า AST ในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 82.75±44.49 U/L ในขณะหนูแฮมสเตอร์ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงความเข้มข้น 100, 400, 1,000 และ 3,000 mg/kg มีค่า AST เท่ากับ 128.50±21.05, 75.50±14.57, 83.25±19.62 และ 83.25±19.62 U/L ตามลำดับ ส่วนค่า ALT ในกลุ่มควบคุม เท่ากับ 60.25±13.74 U/L ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงความเข้มข้น 100, 400, 1,000 และ 3,000 mg/kg มีค่า AST เท่ากับ 70.50±32.13, 62.75±23.21, 78.50±30.29, 59.75±12.63 และ 56.75±15.90 U/L ตามลำดับ ซึ่งค่าเอนไซม์ตับของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้น 100 mg/kg ที่มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มอื่นๆ ที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดง และเมื่อนำมาเปรียบเทียบหาค่าอัตราส่วนของ AST/ALT ในแต่ละกลุ่มพบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลลเพลิงแดงทุกกลุ่มมีค่า AST/ALT ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ถึงแม้ว่าในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลพเลิงแดงที่ความเข้มข้น 100 mg/kg จะมีค่าสูงกว่าทุกกลุ่ม แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการทำงานของไตดูจากพารามิเตอร์ทั้ง 3 พารามิเตอร์คือ BUN, creatinine (Cr) และ BUN/Cr ratio ซึ่งพบว่าค่า BUN ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งในระยะเฉียบพลันและระยะกึ่งเฉียบพลัน แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนค่า creatinine ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงมีทิศทางเหมือนกับค่า BUN คือค่า creatinine สูงกว่ากลุ่มควบคุมในระยะเฉียบพลัน ส่วนในระยะกึ่งเฉียบพลันกลับพบว่าค่า creatinine ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบพารามิเตอร์ทั้งหมดของไต พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นค่า creatinine ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้น 100 mg/kg มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงส่งผลต่อการทำงานของตับและไตให้ทำงานมากขึ้น ซึ่งไตได้มีการขับของเสียออกมาทางปัสสาวะทำให้ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่วัดการทำงานของไตสูงกว่าปกติ

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าผลตรวจทางห้องปฏิบัติการชีวเคมีของหนูแฮมสเตอร์ หลังได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ณ 24 ชั่วโมงและ 7 วัน แสดงในรูป means±SD

	Control		cPI treatment (mg/kg bw)							
			100		400		1000		3000	
	24 h	7 days	24 h	7 days	24 h	7 days	24 h	7 days	24 h	7 days
AST (U/L)	82.75±44.49	118.75±77.26	128.50±21.05	123.75±54.58	75.50±14.57	123.00±50.02	83.25±19.62	114.25±30.02	87.00±7.35	84.00±29.22
ALT (U/L)	60.25±13.74	67.00±21.86	70.50±32.13	73.50±53.57	62.75±23.21	78.50±30.29	50.25±12.28	59.75±12.63	69.00±24.91	56.75±15.90
AST/ALT	1.32±0.56	2.15±1.74	2.05±0.69	1.90±0.51	1.35±0.58	1.73±1.01	1.69±0.31	1.94±0.51	1.52±0.96	1.63±0.79
BUN (mg/dl)	0.53±0.26	0.53±0.00	0.85±0.76	0.53±0.46	0.53±0.75	0.89±0.56	0.44±0.56	2.22±2.52	0.84±0.81	4.45±6.31
Cr (mg/dl)	10.93±5.45	3.60±0.57	1.36±1.12*	2.93±2.44	8.00±6.29	2.93±4.41	3.47±3.23	4.53±2.31	3.47±2.36	2.40±2.77
BUN/Cr	0.08±0.08	0.15±0.02	0.72±0.45	0.28±0.20	0.04±0.06	0.23±0.10	0.12±0.07	0.68±0.81	0.32±0.36	4.26±8.24

(N= 6) ในคอลัมน์เดียวกันที่มี *, # แสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$ โดย * ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและ # ภายในกลุ่มที่ได้รับสาร).

*หมายเหตุ AST=Aspartate aminotransferase, ALT=Alanine aminotransferase, BUN=Blood urea nitrogen, Cr=Creatinine

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลองและบทสรุป

สรุปผลการวิจัย

การใช้ plumbagin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่ได้มาจากพืช 2 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Droseraceae ซึ่งพืชในวงศ์ Droseraceae จัดเป็นพืชกินแมลง (Carnivorous plant) เช่น ต้นหยาดน้ำค้าง และวงศ์ Plumbaginaceae เช่น เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) และเจตมูลเพลิงขาว (*P. zeylanica*) ยังคงเป็นที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยไม่ว่าจะเป็นการรักษาโรคที่เกี่ยวกับต้านการอักเสบ เชื้อแบคทีเรีย ต้านมะเร็ง ต้านเชื้อมาเลเรีย และต้านต่อพยาธิหนองตัวกลมและตัวแบน รวมทั้งใช้เป็นยาฆ่าหอย *Biomphalaria glabrata* ในระยะตัวเต็มวัย (Ribeiro et al., 2009) ซึ่งหอยชนิดนี้เป็นสัตว์พาหะของพยาธิใบไม้เลือด *S. mansoni* ทั้งหอย *B. glabrata* และหอยเชอรี่จัดเป็นหอยน้ำจืดชนิดฝาเดียว ซึ่งพบในแหล่งน้ำชนิดเดียวกัน แต่หอย *B. glabrata* มีขนาดเล็กกว่าหอยเชอรี่ ดังนั้นผู้วิจัยเล็งเห็นว่าหากประยุกต์นำสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงใช้เป็นฆ่าหอยเชอรี่หรือนำมาควบคุมการแพร่พันธุ์ของหอยเชอรี่ ซึ่งเป็นการนำพืชที่มีอยู่ในประเทศมาใช้ให้เกิดประโยชน์ ลดการใช้สารเคมีและยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของทรัพยากรที่มีอยู่ในเกิดประโยชน์สูงสุด ลดต้นทุนทางการเกษตรและเป็นการต่อยอดองค์ความรู้ที่มีอยู่นำมาใช้กับประเทศ และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมหรือเปลี่ยนแปลงระบบนิเวศน์

ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำศึกษาสารประกอบ plumbagin ที่มีอยู่ในพืชชนิดนี้ โดยใช้วิธีโดยวิธี HPLC พบว่ามีสารสำคัญคือ plumbagin อยู่ แต่มีปริมาณน้อยเพียง 9.20% ของปริมาณทั้งหมด เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้เป็นสารสกัดหยาบ ได้มีรายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการจำแนกส่วนประกอบที่พบภายในสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงนอกจากพบ plumbagin, 3-chloroplumbagin, 6-hydroxyplumbagin, plumbaginol แล้ว ยังพบ flavonoids, benzenoid, quinoid และ carbohydrates (Krishnaswamy and Purushothaman, 1980; Kini et al., 1997) ทำให้ผู้วิจัยทราบว่ารากเจตมูลเพลิงแดงทีทำมาทดลอง มี plumbagin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ naphthoquinones อยู่จริง ส่วนกากชาที่สกัดด้วยน้ำมีประมาณสารสกัดได้ 9.06% ของปริมาณทั้งหมด ซึ่งกากชาที่นำมาใช้อยู่ภายใต้แบรนด์ “ภัทรพัฒน์” ในศูนย์วิจัยและพัฒนาชาน้ำมันและพืชน้ำมันชา มูลนิธิชัยพัฒนา จังหวัดเชียงรายระบุว่ามีสารซาโปนินประมาณ 17%

หลังจากนั้น ผู้วิจัยจึงดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงเทียบกับยาฆ่าหอยที่ใช้ในท้องตลาดคือ เมทัลดีไฮด์ต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่ โดยหาค่า LC_{50} ซึ่งผู้วิจัยได้คัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับการสกัดสารจากรากเจตมูลเพลิงแดง โดยพบว่าผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ละลายในแอลกอฮอล์ออกฤทธิ์ได้ดีกว่าที่ละลายในน้ำ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ซึ่งมีรายงานเกี่ยวกับการใช้สารสกัดหยาบชนิดนี้สกัดด้วยแอลกอฮอล์ในการรักษาโรคทางเดินอาหาร เช่น อาการท้องร่วง อาการท้องอืด เนื่องจากขาดการหลั่งของเอนไซม์ pepsin และโรคริดสีดวงทวารหนัก (Krishnaswamy and Purushothaman, 1980) จากผลการทดลองหาความเข้มข้นของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงเทียบกับเมทัลดีไฮด์ พบว่าสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ทำให้หอยเชอรี่ตัวเต็มวัยตายชั่วโมงที่ 96 ถึง 75% คือ 500 µg/ml และค่า LC_{50} เท่ากับ 3.97 µg/ml จึงเลือกความเข้มข้นดังกล่าวมาศึกษาต่อในการทดลองตามตารางที่ 4.2 โดยศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากพืชบางชนิด ในการศึกษาครั้งนี้เลือกกากชาสกัดในน้ำเป็นตัวแทนพืชที่อาจจะทำ

หน้าที่เป็นตัวเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงเพราะจากรายงานที่ผ่านมาของชมพูนุท จรรยาเพศ และคณะ (2553) กากชาที่ความเข้มข้น 0.25 g/L สามารถทำให้หอยตายได้ 100% ภายหลังใส่สาร 48 h ผู้วิจัยเปรียบเทียบผลของกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ใช้ร่วมกับสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดง มีผลต่อการตายของหอยเชอรี่ พบว่าการใช้สารสกัดกากชาเพียงอย่างเดียวให้ผลดีกว่าเมทัลดีไฮด์ โดยทำให้หอยเชอรี่ตายถึง 50% ขณะเมทัลดีไฮด์ทำให้หอยตายเพียง 20% ณ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน เมื่อเปรียบผลของสารสกัดกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ร่วมกับสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงต่อการตายของหอยเชอรี่ที่ความเข้มข้นต่างกันพบว่า อัตราการตายของหอยเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ โดยสารสกัดกากชาร่วมกับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์ ทำให้ทราบว่าทั้งกากชาและเมทัลดีไฮด์สามารถใช้เป็นตัวเสริมฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงได้ เมื่อตรวจสอบพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในระบบทางเดินหายใจและระบบย่อยอาหารพบว่าทั้งกากชา เจตมูลเพลิงแดงและเมทัลดีไฮด์ ทำให้ระบบทางเดินอาหารระคายเคือง โดยหอยตอบสนองต่อสารที่ก่อให้เกิดความระคายเคืองโดยการหลั่งเมือกออกมาเพิ่มขึ้นทั้งตลอดทางเดินอาหาร ตั้งแต่หลอดอาหารจนถึงทวารหนักและใน digestive gland ซึ่งถือเป็นส่วนที่ทำหน้าที่กำจัดสารพิษภายในร่างกายของหอยเชอรี่ เกิดการตายเป็นจำนวนมากและทำให้เซลล์ใน digestive gland สร้าง digestive granule ผิดรูป ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการกำจัดสารพิษภายในร่างกายไม่สามารถดำเนินการต่อไปได้ เช่นเดียวกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ใช้สารสกัดจากพืชในกำจัดหอยเชอรี่ เช่น หางไหล หญ้าแห้วหมู เปลือกมังคุด กากชา และยี่โถที่ความเข้มข้น 0.002, 0.133, 0.002, 0.003 และ 0.003 g/L ตามลำดับ (Ruamthum et al., 2010; Dai et al., 2011; Aukkanimart et al., 2013)

แต่เมื่อพิจารณาว่าควรเลือกสารใดเป็นตัวเสริมฤทธิ์ ซึ่งเมทัลดีไฮด์นั้นออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทของหอยทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างเมือก การแข็งเกร็งของกล้ามเนื้อ เป็นอัมพาตและตายในที่สุด (Godan, 1983) ซึ่งมีรายงานว่าเมทัลดีไฮด์ไม่เป็นอันตรายต่อลูกปลานิล (อนุสรณ์ และศุภชัย, 2542) แต่เมทัลดีไฮด์ตกค้างในตะกอนดินหรือในแหล่งที่ต้องการกำจัดหอยเชอรี่ ทำให้สภาพดินเป็นกรดได้ นอกจากนี้เมทัลดีไอด์ยังมีผลกับไส้เดือนและสัตว์เลือดเย็นชนิดอื่นๆ เช่นกุ้ง ปู เป็นต้น ดังนั้นนี้เป็นข้อจำกัดการใช้เมทัลดีไฮด์ ส่วนกากชาเป็นของเหลือจากการสกัดน้ำมันจากเมล็ดชา ซึ่งพบว่าสามารถใช้ฆ่าหอยเชอรี่ในแปลงนาได้ เนื่องจากมีสาระสำคัญชื่อ triterpenoid saponin มีอยู่ประมาณ 10-13% ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ กากชาที่ใช้มี saponin ประมาณ 17%: ออกฤทธิ์กับกล้ามเนื้อ ทำให้เกิดอาการสั่น กระตุกอย่างแรงของกล้ามเนื้อจะอ่อนเพลียและเป็นอัมพาต และระบบทางเดินหายใจ จะทำให้เกิดอาการระคายเคืองต่อเยื่อบุจมูก ทำให้น้ำมูกไหล จามและมึนงง นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการแตกตัวของเม็ดเลือด และมีผลต่อสัตว์ชั้นสูงหรือสัตว์เลือดอุ่นค่อยข้างต่ำ ไม่สะสมในร่างกายคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วย ความเป็นพิษต่อปลาค่อนข้างต่ำ (ภายใน 7-14 วัน) และราคาถูกกว่าเมทัลดีไฮด์ จากข้อมูลข้างต้น ผู้วิจัยเสนอว่าควรเลือกใช้สารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาดีกว่า เนื่องจากไม่เป็นอันตรายต่อเกษตรกรและสิ่งแวดล้อม มีสารตกค้างในดินน้อยและมีผลกระทบกับสัตว์เลือดอุ่นค่อนข้างต่ำ ทำให้ปลอดภัยกว่าเมทัลดีไฮด์ ซึ่งสอดคล้องกับ ชมพูนุท จรรยาเพศและคณะ (2553)

เมื่อพิจารณาว่าใช้สารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาหรือเมทัลดีไฮด์ส่งผลต่อการเจริญของพืชและสัตว์ในเกษตรกรรมหรือไม่ ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบสารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงกับเมล็ดข้าวในจาน

เพาะ โดยใช้พารามิเตอร์ต่างๆ เช่น ผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตหรือไม่ โดยการหาความยาวราก และความยาวยอด การตรวจวัดเซลล์ที่ตาย พบว่ากากชา เจตมูลเพลิงแดงและเมทัลดีไฮด์ แต่ไม่มีผลต่อความยาวของรากและความยาวของยอด เมื่อนำมาผสมเป็นส่วนผสมระหว่างกากชากับเจตมูลเพลิงแดง และเมทัลดีไฮด์กับเจตมูลเพลิงแดงพบว่าเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์ ส่งผลต่อความยาวของยอด แต่ไม่มีผลต่อความยาวของราก โดยมีความยาวของยอดในกลุ่มเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับเมทัลดีไฮด์น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าเมทัลดีไฮด์ส่งผลต่อการเจริญของใบและยอดเล็กน้อย หลังจากตรวจวัดเซลล์ตายที่รากพบว่าทั้งเมทัลดีไฮด์และเจตมูลเพลิแดง มีผลต่อการตายของเซลล์ที่รากแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับผลกระทบของอนุภาคนาโนแม่เหล็กของโคบอลต์เฟอร์ไรต์ ($CoFe_2O_4$) ต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ (*Lycopersicon lycopersicum*) ความเข้มข้นของสารแขวนลอยอนุภาคนาโนของโคบอลต์เฟอร์ไรต์ที่ทดสอบได้แก่ 0, 62.5, 125, 250, 500 และ 1,000 mg/L พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในเรื่องของอัตราการงอกของเมล็ด ความยาวยอด และความยาวรากของต้นมะเขือเทศที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกที่มีสารแขวนลอยอนุภาคนาโนในความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 15 วัน เป็นที่น่าสนใจว่าการเปลี่ยนแปลงความยาวราก และความยาวยอดของมะเขือเทศในงานวิจัยของ Lopez-Moreno และคณะ (2016) นี้ ไม่เป็นไปตามความเข้มข้นของสารแขวนลอยที่เปลี่ยนไป เช่นเดียวกับในงานวิจัยที่นำเสนอในรายงานฉบับ

สำหรับการทดสอบพิษในพืชนั้น จะเป็นการทดสอบผลต่อการงอกของเมล็ด การเจริญเติบโต และการดูดซึมธาตุอาหารดังในรูปที่ 4.11-4.13 ถึงแม้จะไม่มีรายงานใดที่ให้ความชัดเจนเกี่ยวกับการเกิดพิษ Brunner และคณะ (2006) ได้สรุปเบื้องต้นเกี่ยวกับสาเหตุของความเป็นพิษของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงและกากชาต่อพืชได้แก่ ความเครียดที่เกิดแก่พืชหรือสิ่งเร้า และส่งผลให้เกิดความเครียดแก่พืชจากการใช้สารสกัด เช่น พื้นที่ผิว ขนาด หรือรูปร่างของของต้นพืช เป็นต้น เนื่องจากสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงและเมทัลดีไฮด์ที่ได้ทดสอบกับข้าวหอมมะลิพันธุ์ 105ก ในงานวิจัยนี้ไม่ส่งผลกระทบเชิงลบต่อข้าวในจานเพาะ จึงเป็นผลให้สามารถสรุปได้เบื้องต้นว่า ทั้งเจตมูลเพลิงแดงและเมทัลดีไฮด์ ไม่มีองค์ประกอบไปมีผลต่อการงอกและการเจริญของต้นข้าวในการทดลองนี้ แต่อาจจะมีผลต่อการตายของเซลล์รากเพราะรากสัมผัสเจตมูลเพลิงแดงหรือเมทัลดีไฮด์ตลอดเวลา ทำให้มีโอกาสเกิดการตายที่เซลล์รากได้มากกว่าปกติ และเนื่องจากมีการสนับสนุบให้ใช้กากชาในแปลงนาและส่วนกล้วยไม้ในภาคการเกษตร ในการกำจักหอยเชอรี่และสัตว์น้ำบางชนิดเช่น กุ้งขาวในบ่ออนุบาลปลา ซึ่งส่งผลเสียต่อการสูญพันธุ์ของสัตว์น้ำทั้งกุ้ง ปูและปลา นอกจากนี้กากชายังมีคราบน้ำมันตกค้างในดิน อาจส่งผลต่อไส้เดือน ทำให้ระบบนิเวศน์ในดินเสียไป นี้เป็นข้อจำกัดของกากชา

หลังจากการทดสอบพิษในพืชเสร็จ จึงนำหนูทดลองมาทดสอบพิษเจตมูลเพลิงแดงทั้งในระยะเฉียบพลันและในระยกึ่งเฉียบพลัน ผลการทดลองของผู้วิจัยเมื่อป้อนสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงให้กับหนูแฮมสเตอร์ที่ความเข้มข้น 100, 400, 1000 and 3000 mg/kg แล้วดูผลในระยะเฉียบพลันและระยะกึ่งเฉียบพลัน ไม่พบการตายของหนูทุกกลุ่มที่ได้รับสารทั้งในระยะเฉียบพลันและระยะกึ่งเฉียบพลัน ซึ่งตามมาตรฐานของ OECD 423 สัตว์ที่ได้รับการทดสอบพิษในระยะเฉียบพลันแล้วไม่มีการตายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง แสดงว่าสารที่ทดสอบนั้นมีพิษค่อนข้างต่ำ และจัดอยู่ในกลุ่มที่ 5 ซึ่งค่า LD_{50} อยู่ระหว่างในช่วง 2000-5000 mg/kg เมื่อ

ตรวจสอบพยาธิสภาพของอวัยวะภายใน พบว่าตับ ไต หัวใจ และปอด มีน้ำหนักมากกว่ากลุ่มควบคุม พยาธิกายวิภาคของตับและไต เกิดการตายเป็นบางแห่งในระยะเฉียบพลันและพยาธิสภาพลดลง ในระยะกึ่งเฉียบพลัน แม้ว่าข้อมูลของ pharmacokinetic กับการเมตาบอลิซึม การดูดซึม และการขับออกของ plumbagin ยังไม่ได้มีรายงาน แต่มีรายงานการทดสอบพิษวิทยาของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงในหนูเม้าส์ และหนูแรท โดยการให้ผ่านช่องท้องและป้อนทางปาก ซึ่งค่า LD_{50} เท่ากับ 239.88 mg/kg เมื่อให้ผ่านทางช่องท้องในหนูเม้าส์และ LD_{50} เท่ากับ 1148.15 mg/kg เมื่อป้อนผ่านทางช่องปากในหนูแรท อัตราการตายหนูเม้าส์เท่ากับ 20% (Solomon et al., 1993) นอกจากนี้ยังมีรายงานของการป้อน plumbagin ในสัตว์ทดลอง แล้วตรวจสอบดูระดับ plumbagin ในพลาสม่าพบว่าความเข้มข้นสูงสุดในพลาสม่าอยู่ที่ 1.3-1.5 ชั่วโมง แล้วขับออกทางปัสสาวะ 51% และทางอุจจาระ 49% (Padhye et al., 2010).

หน้าที่หลักของตับคือการกำจัดสารพิษให้เปลี่ยนสภาพให้อยู่ในรูปที่ไม่เป็นอันตรายต่อตับและอวัยวะอื่น ดังนั้นตับจึงเป็นอวัยวะเป้าหมายที่ได้รับพิษจากสารที่ทดสอบ ทำให้มีการปรับสภาพของเซลล์ตับ โดยมีการบวมขึ้นของเซลล์ตับและหลอดเลือดภายในตับซึ่งเป็นแบบ discontinuous capillary ทำให้เม็ดเลือดแดงสามารถไหลออกมาจากหลอดเลือดภายในตับมาสะสมในเซลล์ตับ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้น้ำหนักตับเพิ่มขึ้น และเมื่อตับกำจัดสารพิษไม่ได้ จะพบสารพิษดังกล่าวในกระแสเลือด ซึ่งไตเป็นอวัยวะช่วยกรองเลือดและกำจัดของเสียออกทางปัสสาวะ ดังนั้นหากไตกรองสารพิษนั้นไม่ได้ จะทำให้เกิดการอักเสบของไต ที่เรียกว่า acute glomerulonephritis ทำให้ผนังหลอดเลือดในไตอักเสบ ทำให้สามารถพบเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวกระจายตัวอยู่ในเนื้อไตได้ ซึ่งผลการทดลองของผู้วิจัยสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งทดสอบพิษ examethasone-loaded poly-epsilon-caprolactone (PCL)ในระยะเรื้อรัง ในกระต่ายพบว่าลักษณะของสารพิษส่วนผลต่ออวัยวะ โดยทำให้เกิดคั่งของหลอดเลือด เม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาวกระจายตัวอยู่นอกหลอดเลือด เกิดการตายและกลายเป็นพังผืดในอวัยวะที่ทดสอบ (Silva-Cunha et al., 2009) และการสะสมสารพิษในกระแสเลือดเหนี่ยวนำให้ไตได้รับบาดเจ็บได้ ซึ่งส่วนที่ทำหน้าที่กรองสารพิษและดูดกลับสารน้ำและสารอื่นที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย โดยเฉพาะท่อขดของไต หากเซลล์ท่อบุของไตบวมทำให้รูช่องว่างภายในไตเล็กลง ส่งผลต่อการกรองและแรงดันภายในท่อไต ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ไตเกิดพยาธิสภาพ ซึ่งมักพบตามมาได้ในกรณีที่มีการทำงานของตับผิดปกติ (Silva-Cunha et al., 2009; Tain et al., 2015) ส่วนระบบสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมียไม่มีความผิดปกติ ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยไม่ได้ศึกษาเกี่ยวกับวงจรการตกไข่และความสามารถของสเปิร์ม ดพราะว่ามีรายงานเกี่ยวกับรากของเจตมูลเพลิงแดง มีผลต่อการตกไข่และการมีชีวิตรอดของสเปิร์ม ปกติวงจรของการเป็นสัตว์ของหนูแฮมสเตอร์ใช้ระยะเวลาประมาณ 1-1.5 เดือน ซึ่งต้องเป็นการศึกษษความเป็นพิษแบบเรื้อรัง จึงจะเห็นผลเจตมูลเพลิงแดงมีฤทธิ์ต่อการเป็นสัตว์ และการตกไข่ และได้มีก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาการเป็นสัตว์การศึกษาเกี่ยวฤทธิ์ของเจตมูลเพลิงขาวต่อระบบสืบพันธุ์ของหนูขาวว่ามีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อน (Sandeep et al., 2011)

โดยทั่วไปทางวิทยาศาสตร์ดูการทำงานของตับจากค่าเอนไซม์ของตับ ซึ่งใช้อยู่ 2 ชนิดคือ AST และ ALT (Calil Brondani et al., 2017) ซึ่งผลการทดลองพิษวิทยาในระยะเฉียบพลันของผู้วิจัยพบว่าค่า AST และ ALT ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงกับกลุ่มควบคุม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งพบว่ากลุ่มที่ได้รับเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้น 1,000 และ 3,000 mg/kg มีค่า ALT และ AST ต่ำลงกว่า

กลุ่มควบคุม ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าหนูแรทที่ได้สารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงมีค่าเอนไซม์ตับลดลงจากค่าปกติ (Krishnaswany and Puruchothaman, 1980; Paiva et al., 2003) จากพยาธิสภาพของตับและไตในระยะกึ่งเฉียบพลันลดน้อยลง ค่าเอนไซม์ตับของกลุ่มที่ได้รับเจตมูลเพลิงแดงในระยะกึ่งเฉียบพลันมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนับสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่ามีการปรับสภาพการทำงานของตับและไตในการขับพิษออกจากร่างกาย ซึ่งข้อบ่งชี้การทำงานของไตดูได้จากค่า BUN และ creatinine ซึ่งทั้งสองค่านี้ในกลุ่มที่ได้รับเจตมูลเพลิงแดงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้น 100 mg/kg ในระยะเฉียบพลันเท่านั้นที่มีค่า creatinine ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเป็นไปได้ว่าเจตมูลเพลิงแดงถูกเปลี่ยนสภาพที่ตับและไม่มีผลต่อไต ทำให้ค่า creatinine ในพลาสม่าของหนูกลุ่มนี้ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ว่าสารดังกล่าวไม่มีผลต่อการทำงานของตับและไต เนื่องจากค่าการทำงานของไตยังอยู่ในเกณฑ์ปกติ จากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาพิษในระยะเฉียบพลันและในระยะกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดหยาบของใบ Dolichandra unguis-cati L. ด้วยแอลกอฮอล์ในหนูแรทพบว่าไม่มีพิษต่อเซลล์ตับและไต (Calil Brondani et al., 2017; Lima et al., 2017) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้เป็นการประเมินพิษของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงในระยะเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลัน และความปลอดภัยในการใช้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงในหนูแฮมสเตอร์ จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงมีผลต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่ในระยะตัวเต็มวัย และการใช้เมทัลดีไฮด์หรือกากชาร่วมกับเจตมูลเพลิงแดงเป็นการเสริมฤทธิ์ในการฆ่าหอยเชอรี่ ซึ่งเมทัลดีไฮด์มีข้อด้อยกว่ากากชา เนื่องจากมีการตกค้างของเมทัลดีไฮด์ในดิน ซึ่งส่งผลต่อการงอก และความยาวของยอดของต้นข้าว นอกจากนี้ความปลอดภัยในการใช้เจตมูลเพลิงแดงในสัตว์ทดลอง บ่งบอกว่ามีพิษค่อนข้างต่ำ แต่มีข้อควรระวังอาจจะเกิดการสะสมพิษได้ในตับและไต

โดยสรุป งานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบและเปรียบเทียบคุณสมบัติของสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงและผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมการใช้กากชาหรือเมทัลดีไฮด์ต่ออัตราการของหอยเชอรี่ พบว่าสารสกัดหยาบเจตมูลเพลิงแดงมีสาร plumbagin และใช้เป็นยาฆ่าหอยได้ โดยเมื่อใช้สารกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาให้ผลต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผู้วิจัยเสนอว่าควรใช้กากชาดีกว่าเมทัลดีไฮด์ เพราะว่าเมทัลดีไฮด์มีผลกับสัตว์น้ำจืด เช่นปลาน้ำจืด และทำให้พื้นดินปนเปื้อนสารเคมีอีกด้วย ผู้วิจัยเสนอว่าควรใช้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชาที่ความเข้มข้น 5 ppm ในการฆ่าหอยเชอรี่ เนื่องจากจะไม่มีผลกระทบกับความยาวของยอดและความยาวของรากของต้นข้าว ใช้สารเคมีน้อยจึงเหมาะเป็นตัวเลือกที่ดี สำหรับแนะนำในการฆ่าหอยเชอรี่ในแปลงนาเพื่อเตรียมการเพาะปลูก อย่างไรก็ตามการเลือกใช้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา ควรจะมีศึกษาต่อไปอีกในระยะยาวเกี่ยวกับผลกระทบต่อมนุษย์และสัตว์ที่อยู่ในดิน ต่อระบบนิเวศน์และสิ่งแวดล้อมในนาข้าว เพื่อให้เกิดความปลอดภัยทั้งมนุษย์และสิ่งแวดล้อม

ข้อเสนอแนะในการประยุกต์ใช้

1. สารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดง มีฤทธิ์ต้านหอยเชอรี่ระยะตัวเต็มวัย ดังนั้นควรนำสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงประยุกต์ใช้กับหอยชนิดอื่นๆ ที่เป็นศัตรูพืช เช่นในนาหรือสวนกล้วยไม้
2. ในการพัฒนาสารสกัดเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ สามารถเพิ่ม ประสิทธิภาพได้โดยทำสารสกัดให้บริสุทธิ์ขึ้นในอีกระดับหนึ่ง โดยประสิทธิภาพของฤทธิ์การต้านหอยยังคงอยู่

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. นำมาซึ่งองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการใช้สารสกัดหยาบจากรากเจตมูลเพลิงแดงเป็นยาฆ่าหอยเชอรี่ และการใช้สารสกัดเจตมูลเพลิงแดงร่วมกับกากชา ใช้เป็นยาฆ่าเชอรี่ได้ดีกว่าใช้สารสกัดเจตมูลเพลิงเพียงชนิดเดียว ในเรื่องปริมาณของสารสกัดหยาบเพื่อใช้กำจัดหอยเชอรี่ในแปลงนา โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญของต้นข้าว สามารถนำข้อมูลนี้เป็นในเชิงการเกษตรต่อไป และเป็นการนำพืชในประเทศมาใช้ทางภาคการเกษตร เพื่อลดปัญหาการใช้สารเคมีตกค้างในดิน
2. การเผยแพร่
    - นำผลการวิจัยไปเผยแพร่ในงานประชุมนานาชาติ 6th International Graduate Research Conference 2017 (6^{th} iGRC 2017) วันที่ 10 กุมภาพันธ์ 2560 ณ ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติ โรงแรมดิเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่
    - งานประชุมวิชาการและนิทรรศการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี “ทรัพยากรไทย ศักยภาพมากล้นมีให้เห็น” วันที่ 28-4 ธันวาคม 2560 ณ ศูนย์เครือข่ายการเรียนรู้เพื่อภูมิภาค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

ชมพูนุท จรรยาเพศ. 2540. การป้องกันและการกำจัดโดยวิธีผสมผสาน. กลุ่มงานสัตววิทยาเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ.

ชมพูนุท จรรยาเพศ, ปราสาททอง พรหมเกิด, สมเกียรติ กล้าแข็ง, ดาราพร รินทะรักษ์ และ ปิยาณี หนูกาฬ. 2549. ทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิของสารสกัดจากพืชในการกำจัดหอยเชอรี่ Pomacea sp. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย กลุ่มงานสัตววิทยาเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ. หน้า 16-32.

ชมพูนุท จรรยาเพศ, ปราสาททอง พรหมเกิด, สมเกียรติ กล้าแข็ง, ปิยาณี หนูกาฬ และ ดาราพร รินทะรักษ์. 2552. เปรียบเทียบประสิทธิของสารสกัดประคำดีควาย ลำโพง และมะขามกับหอยเชอรี่.การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 สาขาวิชา การจักการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม หน้า 203-213.

ชมพูนุท จรรยาเพศ, ทักษิณ อาชวาคม และทรงทัพ แก้วตา. 2532. ทดสอบอัตราการกินต้นข้าวของหอยเชอรี่. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย. กลุ่มงานสัตววิทยาเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ หน้า 115-125.

ชมพูนุท จรรยาเพศ, ทักษิณ อาชวาคม, ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ, ปิยาณี หนูกาฬ และทรงทัพ แก้วตา. 2538. ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากพืชที่มีต่อหอยเชอรี่. รายงานผลการวิจัยประจำปี กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ. หน้า 18.

ชมพูนุท จรรยาเพศ, ศิริพร ซึงสนธิพรและ ทักษิณ อาชวาคม. 2539. ทดสอบสารสกัดจากพืชในการป้องกันกำจัดหอยเชอรี่และผลกระทบต่อสัตว์น้ำ. รายงานผลการวิจัย กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพ. หน้า 264-265.

ชัยพัฒน์ จิระธรรม. 2539. ทำอย่างไรจึงจะใช้สารสกัดสะเดาให้ได้ผลดี. วารสารกีฏและสัตววิทยา 18 (1): 55-60.

นนทวิทย์ อารีย์ชน. 2540. การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของ bayluscide ต่อสัตว์น้ำบางชนิดและการสลายตัวในสภาพการทดลอง.เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่องหอยเชอรี่. โรงแรมโซฟิเทล ราชาออคิด ขอนแก่น. หน้า 41-47.

ปราสาททอง พรพรหม และชมพูนุช จรรยาเพศ. 2546. ประสิทธิภาพของสารสกัดมะคำดีควายกับการเสริมฤทธิ์ต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่และผลกระทบต่อสัตว์น้ำ. การประชุมวิทยาการครั้งที่ 41 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร หน้า 686-692.

ปราสาททอง พรพรหม, ชมพูนุช จรรยาเพศ, ปิณาณี หนูกาฬและ ธีระเดช เจริญรักษ์. 2545. ผลของสารสกัดมะคำดีควายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อหอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata* Lamarck) การประชุมสัมนา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ทางวิชาการแมลงและสัตว์ศัตรูพืช ครั้งที่ 13 กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ หน้า 75-90.

ปานเทพ รัตนากร. 2535. คู่มือการใช้สัตว์ทดลอง. ภาควิชาสัตว์ศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. หน้า 114.

สุนันท์ นครชัย. 2537. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์กลไกการฆ่าเชื้อมาลาเรียของ plumbagin. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล,กรุงเทพฯ : หน้า 1-27.

วิระยา สีหบุตร. 2535. ผลบางประการของคอปเปอร์ซัลเฟตในการกำจัดหอยน้ำ. วารสารกีฏและสัตววิทยา. 14(2): 122-123.

อัญชลีกร โสมเกษตรริน. 2542. ประสิทธิภาพของสารสกัดสะเดาที่มีต่อหอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata* Lamarck). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.หน้า 1-76.

อนุสรณ์ ธาดากิติสาร และศุภชัย บางแวก. 2542. เดทมีล เหยื่อสำเร็จรูปสำหรับกำจัดหอยเชอรี่ในนาข้าว. เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่องหอยเชอรี่. โรงแรมโซฟิเทล ราชา ออคิด ขอนแก่น. หน้า 51-54.

Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.

Anuthakoengkun, A., and Itharat, A., 2014. Inhibitory effect on nitric oxide production and free radical scavenging activity of Thai medicinal plants in osteoarthritic knee treatment. J Med Assoc Thai. 97 (8), S116-S124.

Atjanasuppat K, Wongkham W, Meepowpan P, Kittakoop P, Sobhon P, Bartlett A, and Whitfield PJ. 2009. In vitro screening for anthelmintic and antitumor activity of ethnomedicinal plants from Thailand. J Ethnopharmacol. 23: 475-482.

Aukkanimart R, Boonmars T, Pinlaor S, Tesana S, Aunpromma S, Booyarat C, Sriraj P, Laummaunwai P, Punjaruk W. 2013. Histopathological changes in tissues of Bithynia siamensis goniomphalos incubated in crude extracts of camellia seed and mangosteen pericarp. Korean J Parasitol. 51:537-44.

Booth J, Boyland E, and Sims P. 1961. An enzyme from rat liver catalyzing conjugation with glutathione. Biochem. J. 79: 516-524.

Brunner, TJ., Wick, P., Manser, P, Spohn, P., Grass, R. N., Limbach, L. K., Bruinink, A., and Stark, WJ. 2006. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica,

and the effect of particle solubility. Environmental science & technology. 40(14): 4374-4381.

Calil Brondani, J., Reginato, F.Z., da Silva Brum, E., de Souza Vencato, M., Lima Lhamas, C., Viana, C., et al. 2017. Evaluation of acute and subacute toxicity of hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* L. leaves in rats. J Ethnopharmacol. 202, 147-153.

Duke SO, Cantrell CL, Meepagala KM, Wedge DE, Tabanca N, and Schrader KK. 2010. Natural toxins for use in pest management. Toxins. 2: 1943–1962.

El-Beshbishi SN, El Bardicy S, Tadros M, Ayoub M, Taman A. 2015. Spotlight on the in vitro effect of artemisinin-naphthoquinone phosphate on *Schistosoma mansoni* and its snail host *Biomphalaria alexandrina*. Acta Trop.141:37-45.

Fetterer RH and Fleming MW. 1991. Effects of plumbagin on development of the parasitic nematodes *Haemonchus contortus* and *Ascaris suum*. Comp Biochem Physiol C. 100: 539-542.

Freitas de Lima, F., Traesel, G.K., Menegati, S.E., Santos, A.C., Souza, R.I., de Oliveira, V.S., et al., 2017. Acute and subacute oral toxicity assessment of the oil extracted from Attalea phalerata Mart ex Spreng. pulp fruit in rats. Food Res Int. 91, 11-17.

Hassan, S. T., Berchová-Bímová, K., and Petráš, J., 2016. Plumbagin, a plant-derived compound, exhibits antifungal combinatory effect with amphotericin B against *Candida albicans* Clinical Isolates and anti-hepatitis C virus activity. Phytother Res. 9, 1487-1492.

Hostettman K, Kiazu H, and Tominmori T. 1982. Mollusicidal properties of various saponin. Planta Med. 44, 34-35.

Joshi, RC. 2005. Managing invasive alien mollusk species in rice. IRRN. 30: 5-13.

Joshi RC, San Martín R, Saez-Navarreteb C, Alarconb J, Sainzb J, Antolina MM, Martina AR, and Sebastian LS. 2008. Efficacy of quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins against golden

apple snail (*Pomacea canaliculata*) in the Philippines under laboratory conditions. Crop Prot. 27: 553–557.

Kaewbumrung, S., and Panichayupakaranant, P., 2014. Antibacterial activity of plumbagin derivative-rich *Plumbago indica* root extracts and chemical stability. Nat Prod Res. 28 (11), 835-837.

Kini, D.P., Pandey, S., Shenoy, B.D., Singh, U.V., Udupa, N., Umadevi, P., et al., 1997. Antitumor and antifertility activities of plumbagin controlled release formulations. Indian J Exp Biol. 35 (4), 374-379.

Krishnaswamy, M., and Purushothaman, K.K., 1980. Plumbagin: A study of its anticancer, antibacterial & antifungal properties. Indian J Exp Biol. 18 (8), 876-877.

Ghesquiere S. Apple snails. Anatomy. 2000a. Source: http://www.dds.nl/~snc/anatomy.htm

Godan D. 1983. Pest slugs and snail. Biology and control. Springer-Veriag. New York. pp. 354.

Hanning WG, and Leedom WS. 1978. Schistosome dermatitis from *Pomacea paludosa* (Say) (Prosobranchia : Pilidae). The Nautilus. 92 (3), 105-106.

Kaewjam RS. 1987. The apple snails of Thailand: aspects of comparative anatomy. Malacol. Rev. 20: 69-89.

Kaewbumrung S, Panichayupakaranant P. 2014._Antibacterial activity of plumbagin derivative-rich *Plumbago indica* root extracts and chemical stability. Nat Prod Res. 28:835-837.

Keawjam SR, Poonswad P, Upatham SE , and Banpavichit S. 1993. Natural parasitic infection of the golden apple snail, *Pomacea canaliculata*. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 24 (1): 170-177.

Keawjam R, and Upatham ES. 1990. Shell morphology, reproductive anatomy and genetic patterns of three species of apple snails of the genus Pomacea in Thailand. J. Med. Appl. Malacol. 2: 45-57.

Kini, D.P., Pandey, S., Shenoy, B.D., Singh, U.V., Udupa, N., Umadevi, P., et al., 1997. Antitumor and antifertility activities of plumbagin controlled release formulations. Indian J Exp Biol. 35 (4), 374-379.

Kondo S, Sattaponpan C, Phongpaichit S, Srijan A, Itharat A.2010. Antibacterial activity of Thai medicinal plants Pikutbenjakul. J Med Assoc Thai. 93 Suppl 7:S131-134.

Liu WH, Chiu YW, Huang DJ, Liu MY, Lee CC, and Liu LL. 2006. Impose in the golden apple snail *Pomacea canaliculata* in Taiwan. Sci Total Environ. 371: 138–143.

Lopez-Moreno, M. L., et al2016. Effect of cobalt ferrite (CoFe2O4) nanoparticles on the growth and development of *Lycopersicon lycopersicum* (tomato plants). Science of the total environment 550: 45-52

Lorsuwannarat, N., Saowakon, N., Ramasoota, P., Wanichanon, C., and Sobhon, P., 2013. The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. Exp Parasitol. 133 (1), 18-27.

Lorsuwannarat, N., Piedrafita, D., Chantree, P., Sansri, V., Songkoomkron, S., Bantuchai, S., et al., 2014. The *in vitro* anthelmintic effects of plumbagin on newly excysted and 4-weeks-old juvenile parasites of *Fasciola gigantica*. Exp Parasitol. 136, 5-13.

Mackness MI, Walker CH, Rowlands DG, and Price NR. 1983. Esterase activity in homogenates of three strains of the rust red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst). Comp. Biochem. Physiol. 74(1): 65-68.

Makchuchit S, Rattarom R, Itharat A. 2017.The anti-allergic and anti-inflammatory effects of Benjakul extract (a Thai traditional medicine), its constituent plants and its some pure constituents using in vitro experiments. Biomed Pharmacother. 89:1018-1026. doi: 10.1016/j.biopha.2017.02.066.

Mathew N, Paily KP, Abidha, Vanamail P, Kalyanasundaram M, and Balaraman K. 2002. Macrofilaricidal activity of the plant *Plumbago indica/rosea* in vitro. Drug Dev Res. 56: 33-39.

Matsamura F. 1976. Toxicology of Insecticide. 2nd ed., Plenum Press, New York. pp. 503.

Nayak, P., Sharma, M., Behera, S.N., Thirunavoukkarasu, M., and Chand, P.K., 2015. High-performance liquid chromatographic quantification of *Plumbago zeylentica* L.:Inter-

clonal variation in biomass growth and plumbagin production. Appl Biochem Biotechnol. 175, 1745-1770. http://dx.doi.org/10.1007/s12010-014-1392-2.

Naylor R. 1996. Invasions in agriculture: assessing the cost of the golden apple snail in Asia. Ambio. 25: 443–448.

OECD/OCDE, (2001), OECD Guideline for testing of chemical; acute oral toxicity-acute toxic class method. 423.

Paiva, S. R., Figueiredo, M. R., Tânia Verônica Aragão, T. V., and Kaplan M. A. C. 2003. Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from *Plumbago* species. Mem Inst Oswaldo Cruz. 98 (7), 959-961.

Padhye, S., Dandawate, P., Yusufi, M., Ahmad, A., and Sarkar, F.H., 2010. Perspectives on medicinal properties of plumbagin and its analogs. Med Res Rev. 32 (6), 1131-1158.

Rattarom, R., Sakpakdeejaroen, I., Hansakul, P., Itharat, A., 2014. Cytotoxic activity against small cell lung cancer cell line and chromatographic fingerprinting of six isolated compounds from the ethanolic extract of Benjakul. J Med Assoc Thai. 8, S70-S75.

Ribeiro KA, de Carvalho CM, Molina MT, Lima EP, López-Montero E, Reys JR, de Oliveira MB, Pinto AV, Santana AE, and Goulart MO. 2009. Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. Acta Trop. 111: 44–50.

Roy, A.C., and Dutt, S., 1928. Plumbagin (2-methyl,5-hydroxy,1:4 naphthoquinone) from *Plumbago zeylanica*. J Indian Chem Soc. 5, 419-424.

Ruamthum W, Visetson S, Milne JR, and Bullangpoti V. 2010. Toxicity of botanical insecticides on golden apple snail (Pomacea canaliculata). Commun Agric Appl Biol Sci. 75(2): 191-7.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Ruangnoo S, Itharat A, Sakpakdeejaroen I, Rattarom R, Tappayutpijam P, Pawa KK. 2012. In vitro cytotoxic activity of Benjakul herbal preparation and its active compounds against human lung, cervical and liver cancer cells.J Med Assoc Thai. 95 Suppl 1:S127-S134.

Sandur, S. K. , Ichikawa, H. , and Sethi, G. , 2006. Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) suppresses NF-**K**B activation and NF-**K**B-regulated gene products through modulation of p65 and I**K**B**α** kinase activation, Leading to potentiation of apoptosis induced by cytokine and chemotherapy. J Biol Chem. 281 (25), 17023-17033. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M601595200.

Saowakon, N., Lorsuwannarat, N., Changklungmoa, N., Wanichanon, C., and Sobhon, P., 2013. *Paramphistomum cervi*: The *in vitro* effect of plumbagin on motility, survival and tegument structure. Exp Parasitol. 133 (2), 179-186

Solomon F.E., Sharada A.C., and Devi P.U. 1993. Toxic effects of crude root extract of *Plumbago rosea (Rakta chitraka)* on mice and rats. J Ethnopharmacol. 38: 79-84.

Silva-Cunha, A. , Fialho, S. L. , Naud, M. C. ,and Behar-Cohen, F. , 2009. Poly-**ε**-caprolactone intravitreous devices: An *in vivo* study. J Physiol Pharmacol. 50, 2312-2318.

Singh, U. V. , and Udupa, N. , 1997. Reduced toxicity and enhanced antitumor efficacy of betacyclodextrin plumbagin inclusion complex in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. Indian J Physiol Pharmacol, 41 (2), 171-175.

Solomon, F. E. , Sharada, A. C. , and Devi, P. U. , 1993. Toxic effects of crude root extract of *Plumbago rosea* (Rakta chitraka) on mice and rats. J Ethnopharmacol. 38 (1), 79-84.

Srinivasan L, Mathew N, and Muthuswamy K. 2009. In vitro antifilarial activity of glutathione S-transferase inhibitors. Parasitol Res. 105: 1179-182.

Sugie, S., Okamoto, K., Wahidur Rahman, K.M., Tanaka, T., Kawai, K., Yamahara, J., and Mori, H., 1998. Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. Cancer Lett. 127, 177-183

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Sumsakul W, Mahavorasirikul W, Na-Bangchang K. 2015. Inhibitory Activities of Thai Medicinal Plants with Promising Activities Against Malaria and Cholangiocarcinoma on Human Cytochrome P450. Phytother Res. 29:1926-1933.

Tain, Y.L., Hsu, C.N., Chan, J.Y.H., and Huang, L.T., 2015. Renal transcriptome analysis of programmed hypertension induced by maternal nutritional insults. Int J Mol Sci. 16 (8), 17826-17837.

Thiengsusuk A, Chaijaroenkul W, Na-Bangchang K. 2013. Antimalarial activities of medicinal plants and herbal formulations used in Thai traditional medicine Parasitol Res.112:1475-81.

Visetson S. 1991. Insecticide resistance mechanisms in the red rust flour beetle (Tribolium castaneum Herbst) Ph.D. Thesis. The University of Sydney. Australia, 256 p.

Wang YC, Huang TL.2005. Screening of anti-Helicobacter pylori herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. FEMS Immunol Med Microbiol. Feb 43:295-300.

Wu JY, Meng PJ, Liu MY, Chiu YW, and Liu LL. 2010. A high incidence of imposex in pomacea apple snails in Taiwan: a decade after triphenyltin was banned. Zool Stud. 49: 85–93.

Zar HJ. 1999. Biostatistical Analysis. 4th ed. Prentice Hall International. Inc. USA. 663 p.

www.applesnail.net

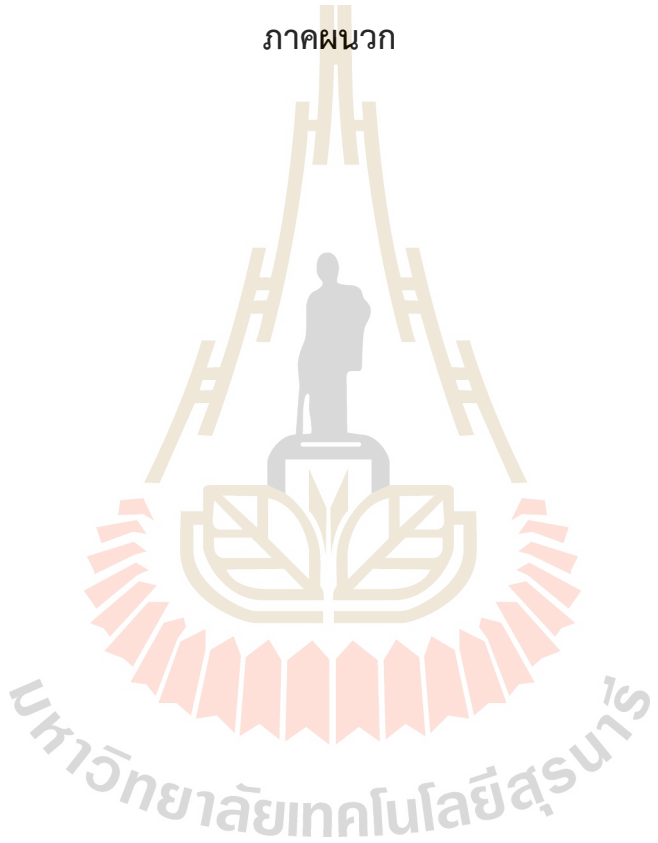
www.banmuang.co.th

www.chaipat.or.th/intranet/project/detail.php?project_id=630

www.ข้อมูลสมุนไพร.com

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก



หน่วยงาน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารี

หัวเรื่อง สารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงกับความสามารถในการฆ่าหอยเชอรี่ ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

ผู้วิจัย ผศ. ดร.นภวรรณ เสาวคนธ์1* และนายพิเชษฐ์ มะลิกุล2

1* สาขาวิชาปรีคลินิก สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา อีเมล์ naruwan@sut.ac.th

2 โปรแกรมชีวเวชศาสตร์ สาขาวิชาปรีคลินิก สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

บทคัดย่อ

หอยเชอรี่เป็นศัตรูตัวสำคัญทางด้านการเกษตร เนื่องจากมันทำลายทั้งพืชตอก พืชใบรวมถึงข้าวในนา ยาฆ่าแมลงและยาฆ่าหอยถูกนำมาใช้ในแปลงเกษตรเพื่อควบคุมการแพร่กระจายของหอยเชอรี่ แต่สารเคมีดังกล่าวที่ใช้ในภาคการเกษตรส่งผลกระทบต่อมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นพืชจากธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกอีกทางเพื่อลดการใช้สารเคมีและลดผลกระทบในด้านต่าง ๆ

เจตมูลเพลิงแดง เป็นพืชไม้พุ่มที่มีสรรพคุณเป็นยา โดยใช้รากเป็นส่วนประกอบของตำรายาหลายชนิด ซึ่งภายในรากของเจตมูลเพลิงแดงมีสารสำคัญที่เรียกว่าพลัมบาจิน ซึ่งมีคุณสมบัติด้านการอักเสบ ด้านการเกิดมะเร็ง ฆ่าพยาธิในระบบทางเดินอาหารและสามารถกำจัดหอย Biomphalaria glabrata ซึ่งเป็นพาหนะของพยาธิใบไม้เลือด แหล่งพบพยาธิชนิดนี้พบในแปลงนาข้าว ดังนั้น การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินอัตราการกิน อัตราการตายและพยาธิสภาพของหอยเชอรี่ระยะโตเต็มวัยหลังได้รับสารสกัดน้ำจากรากเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้น 100 , 250 และ 500 มล/ล. เรียงตามลำดับ โดยใช้ยาฆ่าหอยในท้องตลาดเป็นตัวเปรียบเทียบ ทำการประเมินอัตราการตายและการกินทุกวันเป็นเวลา 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างหอยจากระบบทางเดินอาหารตั้งแต่ เหงือก หลอดอาหาร กระเพาะอาหารและลำไส้แล้วย้อมด้วยเทคนิคทางพยาธิวิทยาเนื้อเยื่อ จากผลการทดลอง แม้ว่าหอยที่ได้รับสารสกัดน้ำจากรากเจตมูลเพลิงแดงตาย 40% ที่เวลา 96 ชั่วโมง ในขณะที่ยาฆ่าหอยตายหมด 100% ตั้งแต่ที่ชั่วโมงที่ 48 แต่พบว่าหอยมีการขับเมือกออกมาในปริมาณมาก มีลักษณะเหนียวข้น ไม่กินอาหาร ไม่เคลื่อนที่และมีพยาธิสภาพของเหงือกและเยื่อบุทางเดินอาหารของหอย จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าสารสกัดน้ำจากรากเจตมูลเพลิงแดงสามารถใช้เป็นสารฆ่าหอยเชอรี่ในระยะตัวเต็มวัยได้ ซึ่งอาจจะพัฒนาเป็นสารร่วมกับพืชชนิดอื่นในการกำจัดหอยเชอรี่ในภาคการเกษตรในอนาคต

บทนำ

"หอยเชอรี่เป็นศัตรูพืชตัวสำคัญทางการเกษตร ทั้งในแปลงนาข้าว สวนกล้วยไม้และแปลงเกษตรอื่นๆ"

วิธีการจัดการ
- ยาฆ่าหอย
- ยาฆ่าแมลง

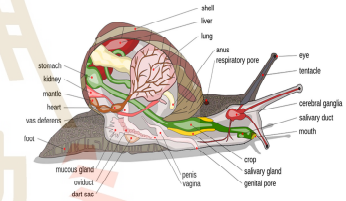
ผลกระทบ
ต่อมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม

ผลกระทบ
- สูญเสียทางด้านเศรษฐกิจ
- สูญเสียสมดุลของระบบนิเวศน์ สัตว์และสิ่งแวดล้อม
- เสี่ยงต่อการติดเชื้อพยาธิ

วัตถุประสงค์

เนื่องจากสาร naphthoquinones สกัดจากต้นเจตมูลเพลิงแดง มีความสามารถในการกำจัดหอยน้ำจืด *Biomphalaria glabrata* ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการวิจัยครั้งนี้ เพื่อประเมินความสามารถของสารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงเป็นยาฆ่าหอย โดยประเมินจากการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบแสงผ่าน

อุปกรณ์และวิธีการ

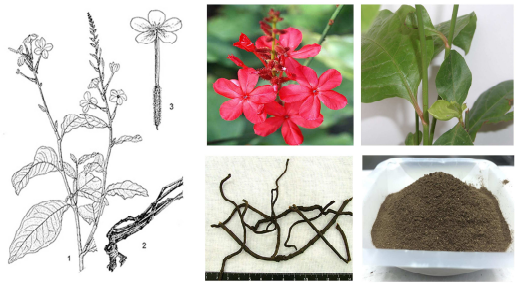


Negative control (distilled water) | Positive control (MDH 10 mg/L) | *P. indica* 100 mg/L | *P.indica* 250 mg/L | *P.indica* 500 mg/L

นำหอยที่ผ่านการทดสอบสารละลายต่างๆ ตรวจสอบพยาธิวิทยาทางเนื้อเยื่อ ที่ชั่วโมงที่ 24 ,48,72 และ 96 โดยการย้อมสี Hematoxylin and Eosin และ Alcian blue -PAS

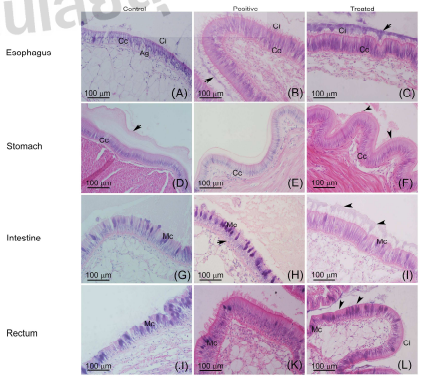
อุปกรณ์และวิธีการ

รากต้นเจตมูขเพลิงแดงเก็บจากจังหวัดเชียงใหม่ นำมาตากแห้งแล้วบด แช่ในน้ำบริสุทธิ์เป็นเวลา 7 วัน นำมากรองด้วยกระดาษกรอง หลังจากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer นำมาเตรียมสารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้น 500 mg/L ใช้ยาฆ่าหอย (methaldehyde) ที่ความเข้มข้น 10 mg/L เป็นกลุ่มควบคุม



รูปที่ 1 แสดงลักษณะของต้นเจตมูลเพลิงแดง *Plumbago indica* (*P. rosea*) ในการจำแนกมีลักษณะเด่นคือ (1) มีใบกลมมน ก้านใบมีเส้นใบสีแดง,(2) กลีบดอกปลายมนมี 5 แฉก ก้านดอกมีดิ่งหนามออกดอกเป็นช่อ (3) รากมีลักษณะเป็นข้อปล้อง

ผลการทดลอง



รูปที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงพยาธิกายวิภาคของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่ ที่ผ่านการแช่ในสารละลายชนิดต่างๆ แถวแรก : กลุ่มควบคุม , แถวสอง : กลุ่ม positive control และแถวสาม : กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้น 500 mg/L [(Cc) : columnar cell with long cilia (Cl), Ag: acidophilic granule ,

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

หน่วยงาน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารี

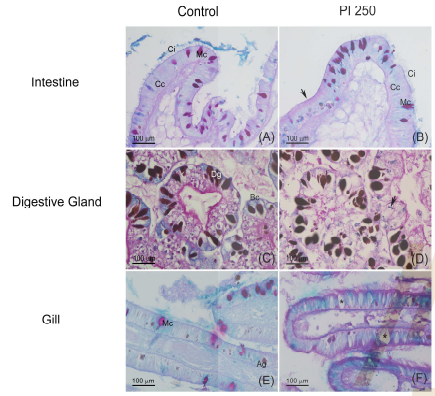
หัวเรื่อง สารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงกับความสามารถในการฆ่าหอยเชอรี่ ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

ผู้วิจัย ผศ. ดร.นภวรรณ เสาวคนธ์1* และนายพิเชษฐ์ มะลิกุล2

1* สาขาวิชาปรีคลินิก สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา อีเมล์ naruwan@sut.ac.th

2 โปรแกรมชีววิทยาสตร์ สาขาวิชาปรีคลินิก สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

ผลการทดลอง

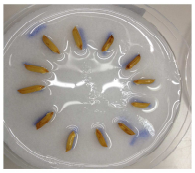


รูปที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงพยาธิกายวิภาคของทางเดินอาหารของหอยเชอรี่ ที่ผ่านการแช่ในสารละลายชนิดต่างๆ โดยย้อมด้วย Alcian blue-PAS กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่ความเข้มข้น 500 mg/L เทียบกับกลุ่มควบคุม [(Cc) : columnar cell with long cilia (Ci), Ag: acidophilic granule , Mc; mucous secretory cell, Ag: Agranular granule; asterisk : cell death

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยอัตราการกินและน้ำหนักตัวหอย หลังจากครบ 96 ชั่วโมง

กลุ่ม	ควบคุม	ยาฆ่าหอย	เจตมูล 100	เจตมูล 250	เจตมูล 500
น้ำหนักอาหาร	1.23±0.71	0.28±0.33*,#	1.30±0.83	1.30±0.83	1.30±0.83
น้ำหนักหอย	24.43 ± 11.92	17.92± 8.73*,#	21.24± 9.13	21.86± 9.94	20.23± 8.86

การทดลองที่ 2



สารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงมีผลต่อการงอกและการเจริญของข้าวหรือไม่

Negative control (distilled water)

Positive control (MDH 0.5, 5, 50 ppm)

P.indica 250 mg/L

ตรวจสอบการงอกของเม็ดข้าวหลังจากแช่ข้าวแล้ว 7 วัน (ความยาวของรากและความยาวของต้น)

ผลการทดลอง

หลังจากครบ 7 วัน นำต้นอ่างต้นข้าวที่งอกมา วัดความยาวของรากและความยาวของลำต้นในแต่ละจานเพาะ จำนวน 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยของรากต่อลำต้น พบว่าว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงส่งผลต่อการเจริญของรากและการเจริญของลำต้น ได้ดีกว่ากลุ่มที่ได้รับยาฆ่าหอย ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน

ควบคุม	ยาฆ่าหอย 0.5 ppm	ยาฆ่าหอย 5 ppm	ยาฆ่าหอย 50 ppm	เจตมูล 0.5 ppm	เจตมูล 5 ppm	เจตมูล 50 ppm

รูปที่ 3 แสดงลักษณะของต้นข้าวที่งอกหลังจากแช่สารที่ทดสอบการงอกและการเจริญของลำต้นเป็นเวลา 7 วัน พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดง มีความยาวของรากและลำต้นสูงกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยาฆ่าหอย ที่ความเข้มข้นเดียวกัน.

สรุปผลการทดลอง

ผลของสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงมีผลระคายเคืองต่อหอย โดยหอยมีการปล่อยเมือกเหนียวมาปกคลุมตัว และปิดฝา นอกจากนี้ยังมีผลต่อระบบต่อระบบย่อยอาหาร พบว่าอัตราการกินอาหารของหอยเชอรี่กลุ่มที่ได้รับยาฆ่าหอยมีอัตราการกินอาหารลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงและกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตรวจสอบเพยาธิกายวิภาคของทางเดินอาหารของหอย พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของทางหลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้และทวารหนัก นอกจากนี้ยังมีผลต่อเหงือกและต่อมในระบบย่อยอาหารอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับเจตมูลเพลิงแดงต่อพืชโดยเฉพาะข้าว หลังจากการทดลองสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงต่อการงอกของรากและการเจริญของลำต้นข้าวพบว่า ข้าวที่ได้ผ่านการแช่สารละลายเจตมูลเพลิงแดงมีการงอกและการเจริญของลำต้นของต้นข้าวได้ดีกว่าต้นข้าวที่แช่ในยาฆ่าหอยทุกความเข้มข้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงสามารถใช้ได้ในแปลงนาข้าวสาธิตและมีประสิทธิภาพเป็นยาฆ่าหอยเชอรี่ได้ ในอนาคตสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับพืชชนิดอื่นในการกำจัดหอยเช่น กากชา เป็นต้น

การสนับสนุน

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ(วช.)และได้รับการสนับสนุนภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

Toxicity Effect of Ethanolic Root Extract from Plumbago indica on Golden Syrian Hamsters

Yanwarut Camchuen[1*] and Naruwan Saowakon[2**]

Abstract

Plumbago indica, is a member in Plumbaginaceae family which has used as Ayuravadic Asian traditional medicine. The *P. indica* extracts from many parts have been shown anti-helminthic, anti-inflammation, and anti-cancer activities. Normally, hamster is an animal model used for studying trematode infection. Presently, nobody reports the effect of *P. indica* extract in hamster. Therefore, the aim of this study was to investigate the acute and subacute toxicity effects of P. indica ethanolic root extract (PEE) on the both sex of Golden Syrian hamsters. The hamsters were daily oral administration with PEE at 100, 400, 1000 and 3000 mg/kg bw for 24 h and 7 d. After treatment, the hamsters were sacrificed, and their visceral organs (heart, lung, liver, spleen, kidney, ovary, uterus, seminiferous tubule, and epididymis) were collected and evaluated histopathology by H&E technique. The hamsters treated PEE groups showed no signs and symptoms after oral administration. Results of histopathology showed all groups of PEE treatment at 24 h were no toxic ,except PEE at concentration 3000 mg/kg bw that found severe glomeruli swelling and angieactasis in kidney, and there stilled had found this form after 7-day treatment. Hepatocytes were dead in the same concentration. However, slight glomeruli swelling were exhibited in group treated with PEE at concentration 1000 mg/kg bw after 7-day treatment. On the other side, hepatocytes were better improvement than 24 h treatment. The half-life of plumbagin is 1028 min/100 mg/kg bw, subsequence it will be spend time at least 21 days for elimination. Since kidney and liver are the most important organs in the metabolic chemical in urine and in stool, the results obtained suggest that the liver and kidney may play an important role in detoxicities of PEE extracts on hamster. Further investigations are recommended in the liver and kidney function tests. This finding may be developing in safety in vivo study in trematode infection.

Keywords : Plumbago indica, toxicity effect, ethanolic extract, hamster, histopathology

*Ph.D. Student, email: m5410248@g.sut.ac.th, **Advisor, email: naruwan@sut.ac.th

[1]Program in Biomedical Science, School of Preclinic, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima,Thailand
[2]School of Anatomy, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Molluscicidal Activity of Aqueous Extract of *Plumago indica* Against *Pomacea canaliculata*

Pichet Malikun[1*] and Naruwan Saowakon[2**]

Abstract

Pomacea canaliculata (golden apple snail: GAS), is the important pest in the agricultural wetland. Pesticides and molluscicides had been for controlling of GAS and also involved the ecosystem changes. Presently, the discovery plant researches for molluscicides have been studies. Plumbagin is the naphthoquinone analogs that is found in the P. indica (PI) root that against Biomphalaria glabrata, intermediated host of blood fluke. Therefore, the aim of this study was to evaluate feeding rate, mortality and histopathological changes after treated with aqueous extract of PI root at the concentration 100, 250 and 500 mg/L, respectively. Methaldehyde is used as the positive control at 10 mg/L. Snail mortality and feeding rate of GAS were daily observed for 96 h. After scarification, gill, esophagus, stomach and intestine were collected and evaluated by H&E and PAS-Alcian blue techniques. Results showed that the positive control snail were completely motility and dead at 48 h after incubation. In contrast, the snails treated with PI group at the concentration 500 mg/L were dead 40% of the total at 96 h. The epithelial lining in digestive tract exhibited the excessive expression of mucus-secreting goblet cells and dominantly absence cilia in some part of esophagus after treated with 100 mg/L. Additionally, the stomach of treated PI 500 mg/L showed decreasing the coating components on apical surface. The gill exhibited loss of cilia and degeneration of columnar epithelial cells. The basophilic cells in the digestive gland were absent. So that, they compensated by activating mucus-secreting goblet cells and more produced secretion mucus.This finding suggested that aqueous extract of P. incida is able to irritate the epithelial lining of digestive tract and might be use for further study in other freshwater snail.

Keywords : golden apple snail, Pomacea canaliculata, Plumbago indica, digestive system

*M.S. Student, e-mail: merry_xman@hotmail.co.th, **Advisor, e-mail: naruwan@sut.ac.th

[1]School of Biomedical Science, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand
[2]School of Anatomy, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นฦวรรณ เสาวคนธ์ สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต (กายภาพบำบัด) จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2540 ระดับวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์) จากมหาวิทยาลัยขอนแก่นเมื่อปี พ.ศ. 2545 และระดับดุษฎีบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์) จากมหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปี พ.ศ. 2550 มีความเชี่ยวชาญทางด้านโครงสร้างชีวโมเลกุลและกายวิภาคศาสตร์ สถานที่ทำงานปัจจุบัน สาขากายวิภาคศาสตร์ สานักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในด้านงานวิชาการและการวิจัยของ ผศ.ดร.นฦวรรณ ทำงานเกี่ยวกับการศึกษาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในสัตว์และในคน นอกจากนี้ผู้วิจัยมีความสนใจด้านวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับทางด้านเกษตรกรรม ซึ่งเล็งเห็นปัญหาทางการเกษตรตัวที่สำคัญคือหอยเชอรี่ จึงมีความสนใจที่จะกำจัดหอยเชอรี่โดยการใช้พืชที่มีอยู่ในประเทศไทย ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าและลดการใช้ยาฆ่าหอยเชอรี่ ซึ่งมีผลกระทบกับสิ่งแวดล้อมทั้งคน สัตว์และพืช ส่วนหนึ่งจากการวิจัยครั้งนี้ได้นำเสนอทูลเกล้าต่อสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ เมื่อปี 2560 ในงานทรัพยากรไทย ศักยภาพมากล้นมีให้เห็น จ.สระบุรี และได้นำเสนอในรูปแบบโปรสเตอร์ในงาน The 6th International Graduate Research conference 2017 จ. เชียงใหม่ ปัจจุบันกำลังเขียนส่งเพื่อตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี