

บทความต้นฉบับ

ผลของน้ำมันกานพลูต่อการตายเชื้อ *Ichthyophthirius multifiliis* ในหลอดทดลอง

ปัญญา โปติบุตร¹, ศิริพร โอโกโนกิ², วาสนา ไชยศรี³, สุรัช พิกุลแก้ว^{3,*}

¹นักศึกษาระดับปีที่ 6 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

²ภาควิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

³ภาควิชาคลินิกสัตว์บริโภค คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อประเมินฤทธิ์ความเป็นพิษของน้ำมันกานพลูต่อเชื้อ *Ichthyophthirius multifiliis* ระยะต่างๆ ในหลอดทดลอง โดยแยกเชื้อระยะ trophont ระยะ tomont และระยะ theront ออกเป็น 6 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 คือกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2 ได้รับฟอร์มาลินขนาด 50 พีพีเอ็ม กลุ่มที่ 3 ได้รับสาร propylene glycol กลุ่มที่ 4-6 ได้รับน้ำมันกานพลูขนาด 10, 30 และ 60 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ศึกษาอัตราการตายเฉลี่ยของเชื้อระยะ trophont ระยะ tomont และระยะ theront โดยกล้องจุลทรรศน์ชนิดลำแสงส่องผ่านในชั่วโมงที่ 1, 2, 4 และ 6 หลังจากได้รับสาร ผลการศึกษาพบว่า อัตราการตายเฉลี่ยของเชื้อระยะ trophont ในกลุ่มที่ 5 และ 6 สูงกว่ากลุ่มที่ 1-4 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ของการทดลอง ($P < 0.05$) และอัตราการตายเฉลี่ยของเชื้อระยะ tomont ในกลุ่มที่ 2 สูงกว่ากลุ่มอื่นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 ของการทดลอง ($P < 0.05$) ในระยะ theront พบอัตราการตายเฉลี่ยของเชื้อในกลุ่มที่ 4-6 สูงกว่ากลุ่มที่ 1-3 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ของการทดลอง ($P < 0.05$) ในขณะที่อัตราการตายเฉลี่ยของกลุ่มที่ 1-3 ในเชื้อทุกระยะไม่แตกต่างกันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ของการทดลอง สรุปได้ว่าน้ำมันกานพลูมีฤทธิ์ที่ดีที่สุดในการฆ่าเชื้อ *Ichthyophthirius multifiliis* ระยะ theront เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2556; 11(3): 215-223

คำสำคัญ : น้ำมันกานพลู, *Ichthyophthirius multifiliis*, ระยะ theront

ติดต่อสำหรับบทความได้ที่ : สุรัช พิกุลแก้ว ภาควิชาคลินิกสัตว์บริโภค คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต.แม่เหิยะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100 E-mail address: s.pikul@chiangmai.ac.th ได้รับบทความวันที่ 28 พฤศจิกายน 2555

บทนำ

เชื้อ *Ichthyophthirius multifiliis* (*I. multifiliis*) เป็นโปรโตซัวซึ่งก่อโรคจุดขาวในปลาน้ำจืด (freshwater white spot disease) โปรโตซัวเคลื่อนที่โดยใช้เส้นขนรอบตัวที่เรียกว่าซีเลีย (Dickerson, 2006) ก่อโรคกับปลาน้ำจืดทุกชนิด (Meyer, 1974) มักพบการระบาดในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหรือปลาเกิดความเครียด (Matthews, 2005) โดยวงจรชีวิตของเชื้อ *I. multifiliis*

ประกอบด้วย 3 ระยะ คือ ระยะก่อโรค มีตัวอ่อนที่เรียกว่า theront มีขนาดเล็กประมาณ 20 ถึง 50 ไมครอน (Clark et al., 1995) มีซีเลียรอบตัวทำให้เคลื่อนที่ไวว่ายน้ำอิสระเพื่อหาเจ้าบ้าน และเจาะเข้าสู่เยื่อของผิวหนังหรือเหงือก (Scholz, 1999) จากนั้นเชื้อจะเจริญเป็นเชื้อระยะกินอาหาร เรียกเชื้อระยะนี้ว่า trophont มีลักษณะเด่นคือสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า พบเป็นจุดขาวกระจายบริเวณที่มีการติดเชื้อ โดยมีขนาดตั้งแต่

0.5 ถึง 1 มิลลิเมตร (Gonzalez et al., 2007) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อระยะนี้คือ ลักษณะค่อนข้างกลม มีซีเลียรอบตัว เคลื่อนที่รอบตัวเองตลอดเวลา และพบแมคโครนิวเคลียสรูปเกือกม้า เมื่อเชื้อระยะ trophont เจริญเติบโตเต็มที่จะหลุดออกจากเจ้าบ้านกลายเป็นระยะแบ่งตัว เรียกเชื้อระยะ tomont มีการสร้างถุงซิสต์ที่มีสารเหนียวล้อมรอบเพื่อใช้ในการยึดเกาะกับวัตถุต่างๆ ภายในบ่อหรือภาชนะเลี้ยงปลา และพบว่าภายในเชื้อระยะนี้จะมีการแบ่งตัวได้ตัวอ่อนจำนวนมากภายในเรียกว่า tomite จากนั้น tomite จะออกมาจากถุงซิสต์และพัฒนาไปเป็นระยะ theront ซึ่งเป็นระยะที่ก่อโรคต่อไป (Lom and Dykova, 1992)

การป้องกันโรคจุดขาวมีความสำคัญมากกว่าการรักษา เนื่องจากปลาป่วยมักไม่ตอบสนองต่อการรักษา และมีอัตราการตายสูง สารเคมีที่ออกฤทธิ์ดีในการรักษา คือ มาลาโคทริกรินร่วมกับฟอร์มาลิน อย่างไรก็ตาม มาลาโคทริกรินเป็นสารเคมีที่ห้ามใช้ในปลาบริโภคเนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็ง (Noga, 1996) ทำให้ปัจจุบันมีการศึกษาถึงการรักษาทางเลือกอื่นๆ ที่มีความปลอดภัยมากกว่า โดยเฉพาะการใช้สมุนไพรเพื่อใช้ในการควบคุม และป้องกันโรคดังกล่าว น้ำมันกานพลูเป็นน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากต้นกานพลู (*Eugenia caryophyllata* Thumb.) โดยเฉพาะส่วนดอก ใบ และลำต้น น้ำมันกานพลูมีลักษณะสีเหลืองใส มีรายงานสรรพคุณ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ เช่น ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา และยับยั้งการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโปรโตซัวก่อโรค ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ทำให้เกิดการซาเฉพาะที่ และระงับอาการปวดฟัน เป็นต้น (เพียว, 2537) ส่วนในสัตว์น้ำพบว่าน้ำมันกานพลูมีฤทธิ์ทำให้ซึม และสลับ อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานการยับยั้งเชื้อ *I. multifiliis* ที่ก่อให้เกิดโรคจุดขาวในปลาน้ำจืด

การศึกษาค้นคว้านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงฤทธิ์ของน้ำมันกานพลูโดยทำในหลอดทดลองที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการตายของเชื้อจุดขาวทั้งสามระยะที่แยกจากปลาน้ำจืด คือ ระยะ trophont ระยะ tomont

และระยะ theront ทั้งนี้คณะผู้วิจัยหวังว่าจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการใช้น้ำมันสมุนไพรในการควบคุมเชื้อจุดขาวซึ่งก่อความรุนแรงสูงในปลาน้ำจืดต่อไป

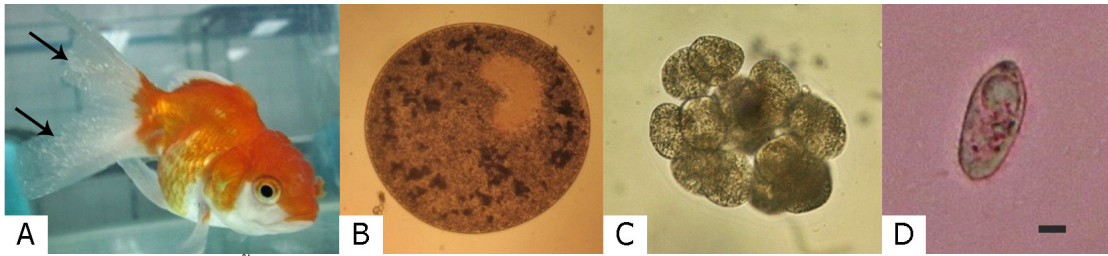
อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

น้ำมันกานพลูและการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันกานพลู

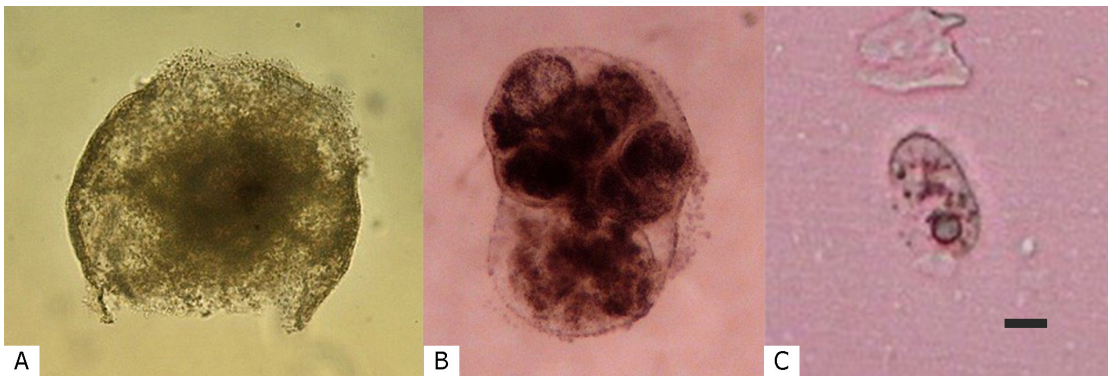
น้ำมันกานพลูจากบริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโตรเมตรี (GC-MS) (GC Agilent system 6890m/แมสสเปคโตรมิเตอร์ MS 5973 ใช้คอลัมน์ HP-5 MS (30.0 μm x 250 μm x i.d., 0.25 μm) และเปรียบเทียบกับแมสสเปคตรัมของสารมาตรฐานของสารยูจีนอลจากคณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จากนั้นเตรียม stock solution ของน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้นของยูจีนอลในขนาด 6,000 พีพีเอ็ม โดยทำละลายน้ำมันกานพลูด้วยสาร propylene glycol ในอัตราส่วนน้ำมันกานพลู 1 ส่วน สาร propylene glycol ต่อ 9 ส่วน เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการศึกษาขั้นต่อไป

การเก็บและแยกเชื้อ *I. multifiliis* ระยะต่างๆ

นำปลาทองที่แสดงอาการทางคลินิกของโรคจุดขาวโดยพบจุดขาวเล็กๆ ทั่วลำตัว (รูปที่ 1A) มาทำการสลับด้วยสารไตรเคนมีเทนซัลโฟเนต (Sigma-Aldrich, Germany) ที่ระดับความเข้มข้น 50 พีพีเอ็ม เก็บเมือกที่มีเชื้อ *I. multifiliis* ระยะ trophont (รูปที่ 1B) ภายใต้อ่างจุลทรรศน์ชนิดลำแสงส่องผ่าน ทำการล้างเชื้อจุดขาวในระยะ trophont ด้วยน้ำกรองสะอาดเพื่อกำจัดเมือก และสารอินทรีย์ออก นำเชื้อที่ได้ไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (FTC90I, VELP scientifica) ที่ 24-25 องศาเซลเซียส จากนั้นเชื้อระยะ trophont จะพัฒนาไปเป็นเชื้อระยะ tomont (รูปที่ 1C) และระยะ theront (รูปที่ 1D) โดยใช้เวลาประมาณ 5-7 ชั่วโมง และ 17-18 ชั่วโมง ตามลำดับ แยกเก็บเชื้อระยะต่างๆ เพื่อทำการทดสอบต่อไป ทั้งนี้การใช้สัตว์ทดลองได้รับการ



รูปที่ 1 แสดงปลาป่วยและเชื้อ *I. multifiliis* ระยะเวลาต่างๆ A: ปลาทองป่วยด้วยโรคจุดขาว, ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดลำแสงส่องผ่าน B: เชื้อระยะ trophont, C: เชื้อระยะ tomont, D: เชื้อระยะ theront (Bar=16µm)



รูปที่ 2 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดลำแสงส่องผ่านแสดงลักษณะเชื้อ *I. multifiliis* ที่ตาย A: ลักษณะของเชื้อ *I. multifiliis* ระยะ trophont ที่ตาย, B: ลักษณะของเชื้อ *I. multifiliis* ระยะ tomont ที่ตาย, C: ลักษณะของเชื้อ *I. multifiliis* ระยะ theront ที่ตาย (Bar=16µm)

อนุญาตตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การศึกษาการตายของเชื้อ *I. multifiliis* ระยะเวลาต่างๆ

เชื้อทั้ง 3 ระยะ จะได้รับสารต่างกันจำนวน 6 กลุ่ม การทดลอง กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมได้รับน้ำสะอาด กลุ่มที่ 2 ได้รับน้ำสะอาดผสมฟอร์มาลินขนาด 50 พีพีเอ็ม กลุ่มที่ 3 ได้รับน้ำสะอาดผสมสาร propylene glycol ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ส่วนกลุ่มที่ 4-6 ได้รับน้ำสะอาดผสมกับ stock solution ของน้ำมันกานพลูในขนาด 10 30 และ 60 พีพีเอ็ม ตามลำดับ โดยเชื้อระยะ trophont และระยะ tomont จะถูกเก็บแบบสุ่มกลุ่มละ 10 ตัว ทดสอบจำนวน 5 ซ้ำ ส่วนเชื้อระยะ theront จะมีการสุ่มกลุ่มละ 600 ตัว ทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ การนับจำนวนเชื้อ theront จะใช้สไลด์นับเซลล์ชนิด Sedgwick-Rafter Counting Cell Slide ได้กล้องจุลทรรศน์ชนิด

ลำแสงส่องผ่านที่กำลังขยาย 100 เท่า จากนั้นในชั่วโมงที่ 1, 2, 4 และ 6 ของการทดลองส่องตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดลำแสงส่องผ่านเพื่อศึกษาอัตราการตายของเชื้อ *I. multifiliis* ทุกระยะ โดยใช้การประเมินการตายของเชื้อดังตารางที่ 1

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีการสร้างแบบจำลองเชิงเส้นโดยนัยทั่วไป (Generalized linear model) โดยมี Model ดังนี้ Mortality = treatment + time + treatment × time + error เมื่อ treatment = กลุ่มน้ำสะอาด, กลุ่มน้ำสะอาดผสมฟอร์มาลิน, กลุ่มน้ำสะอาดผสม propylene glycol และกลุ่มน้ำมันกานพลูขนาด 10, 30 และ 60 พีพีเอ็ม, time = ชั่วโมงที่ 1, 2, 4 และ 6 ของการทดลอง, treatment × time = อิทธิพลร่วมระหว่าง treatment และ time, error มีคุณสมบัติ NID

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะของเชื้อ *I. multifiliis* ระยะต่างๆ ที่ตาย

ระยะของเชื้อ	ลักษณะของเชื้อ <i>I. multifiliis</i>
ระยะ trophont	(รูปที่ 2A)
มีชีวิต	ซีเลียและไซโทพลาซึมสามารถเคลื่อนที่ได้ รูปร่างเซลล์สมบูรณ์ และสามารถแบ่งตัวเป็นระยะอื่นได้
ตาย	ไม่พบการเคลื่อนที่ของซีเลียและไซโทพลาซึม (Ekanem et al., 2004) และหรือเกิดการย่อยสลายของเซลล์ (Yao et al., 2010)
ระยะ tomont	(รูปที่ 2B)
มีชีวิต	พบการเคลื่อนที่ของเซลล์ภายในถุงซีสต์ สามารถแบ่งตัวได้ และรูปร่างเซลล์สมบูรณ์
ตาย	ไม่พบการเคลื่อนที่ของเซลล์ภายในถุงซีสต์ และไม่สามารถแบ่งตัวได้ (Ling et al., 2011) และหรือเกิดการย่อยสลายของเซลล์ (Heinecke and Buchmann, 2009)
ระยะ theront	(รูปที่ 2C)
มีชีวิต	สามารถเคลื่อนที่ได้ และรูปร่างเซลล์สมบูรณ์ (Straus, 2009)
ตาย	ไม่มีการเคลื่อนที่ และหรือเกิดการย่อยสลายของเซลล์ (Straus, 2009)

ตารางที่ 2 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันกานพลูด้วยวิธี GC-MS

Name	IUPAC name	Rt (min)	Area (%)
Eugenol	4-Allyl-2-methoxyphenol	19.96	96.11
Caryophyllene	4,11,11-trimethyl-8-methylene-bicyclo[7.2.0]undec-4-ene	21.59	1.34
Naphthalene	bicyclo[4.4.0]deca-1,3,5,7,9-pentene	22.90	0.63

Rt = retention time

(0, σ^2) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างคู่ที่ทำการทดสอบ (Multiple comparison) โดยกำหนดโครงสร้างของความแปรปรวนร่วม (Covariance) เป็นแบบ compound symmetry ใช้วิธีการของ Bonferroni โดยกำหนดระดับนัยสำคัญ $\alpha=0.05$ ในทุกการวิเคราะห์ ข้อมูล การวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรมทางสถิติ R (R Development Core Team, 2012) โดยเขียนชุดคำสั่งจากแพ็คเกจ nlme (Pinheiro et al., 2012) และแพ็คเกจ contrast (Kuhn et al., 2012)

ผลการศึกษา

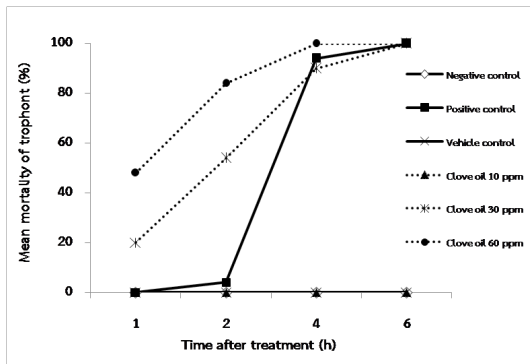
องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันกานพลู

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันกานพลู พบว่าน้ำมันกานพลูมีสารองค์ประกอบหลักคือ สารยูจีนอล ที่ retention time (Rt) เท่ากับ 19.96 นาที มีปริมาณ

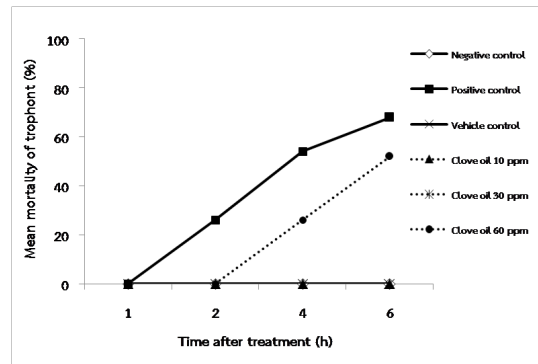
สูงสุดคิดเป็น % Area เท่ากับ 96.11 %w/w (ตารางที่ 2)

อัตราการตายเฉลี่ยของเชื้อ *I. multifiliis* ระยะต่างๆ ระยะ trophont (รูปที่ 3)

อัตราการตายเฉลี่ยของเชื้อระยะ trophont ในกลุ่มที่ได้รับน้ำมันกานพลูขนาด 60 พีพีเอ็ม ที่ชั่วโมงที่ 1 และ 2 ของการทดลองสูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ และตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 ของการทดลอง เชื้อระยะ trophont ในกลุ่มที่ได้รับน้ำมันกานพลูขนาด 30 พีพีเอ็ม และ 60 พีพีเอ็ม และกลุ่มที่ได้รับฟอร์มาลินมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยอัตราการตายเฉลี่ยของเชื้อระยะ trophont ในทุกกลุ่มยกเว้นกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 อัตราการตายเฉลี่ยของเชื้อระยะ trophont มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น และพบว่าอัตราการตาย



รูปที่ 3 แสดงอัตราการตายเฉลี่ยของเชื้อ *I. multifiliis* ระยะ trophont แต่ละกลุ่ม; กลุ่มน้ำสะอาด (negative control), กลุ่มฟอร์มาลิน (positive control) กลุ่ม propylene glycol (vehicle control) และกลุ่มน้ำมันกานพลูขนาด 10, 30 และ 60 พีพีเอ็ม ที่ชั่วโมงที่ 1, 2, 4 และ 6 ของการทดลอง (N=5; Mean±SD)



รูปที่ 4 แสดงอัตราการตายเฉลี่ยของเชื้อ *I. multifiliis* ระยะ tomont แต่ละกลุ่ม; กลุ่มน้ำสะอาด (negative control), กลุ่มฟอร์มาลิน (positive control) กลุ่ม propylene glycol (vehicle control) และกลุ่มน้ำมันกานพลูขนาด 10, 30 และ 60 พีพีเอ็ม ที่ชั่วโมงที่ 1, 2, 4 และ 6 ของการทดลอง (N=5; Mean±SD)

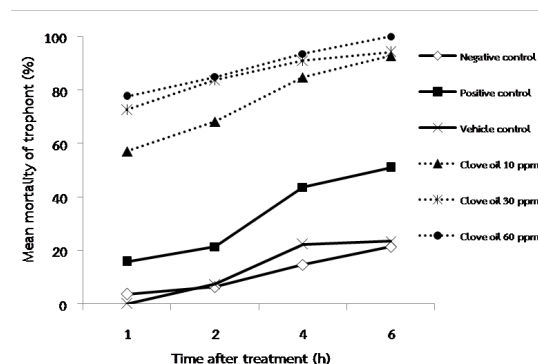
เฉลี่ยของเชื้อระยะ trophont ในกลุ่มที่ได้รับน้ำมันกานพลูขนาด 60 พีพีเอ็ม เท่ากับร้อยละ 100 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 ของการทดลอง ส่วนอัตราการตายเฉลี่ยของเชื้อระยะ trophont ในกลุ่มที่ได้รับฟอร์มาลิน และกลุ่มที่ได้รับน้ำมันกานพลูขนาด 30 พีพีเอ็ม เท่ากับร้อยละ 100 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ของการทดลอง

ระยะ tomont (รูปที่ 4)

อัตราการตายเฉลี่ยของเชื้อระยะ tomont ในกลุ่มที่ได้รับฟอร์มาลินสูงกว่ากลุ่มอื่นตลอดช่วงเวลาของการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ และมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น นอกจากนี้พบว่าอัตราการตายเฉลี่ยของเชื้อระยะ tomont ในกลุ่มที่ได้รับน้ำมันกานพลูขนาด 60 พีพีเอ็ม มีแนวโน้มสูงขึ้นหลังจากชั่วโมงที่ 2 ของการทดลองเป็นต้นไป โดยมีอัตราการตายเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำสะอาด กลุ่มที่ได้รับสาร propylene glycol และกลุ่มที่ได้รับน้ำมันกานพลูขนาด 10 พีพีเอ็ม และขนาด 30 พีพีเอ็ม อย่างมีนัยสำคัญตามลำดับ

ระยะ theront (รูปที่ 5)

อัตราการตายเฉลี่ยของเชื้อระยะ theront ของกลุ่มที่ได้รับน้ำสะอาด และกลุ่มที่ได้รับสาร propylene glycol ในชั่วโมงที่ 1, 2 และ 6 ของการทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนอัตราการตายเฉลี่ยของเชื้อ



รูปที่ 5 แสดงอัตราการตายเฉลี่ยของเชื้อ *I. multifiliis* ระยะ theront แต่ละกลุ่ม; กลุ่มน้ำสะอาด (negative control), กลุ่มฟอร์มาลิน (positive control) กลุ่ม propylene glycol (vehicle control) และกลุ่มน้ำมันกานพลูขนาด 10, 30 และ 60 พีพีเอ็ม ที่ชั่วโมงที่ 1, 2, 4 และ 6 ของการทดลอง (N=3; Mean±SD)

ระยะ theront ในกลุ่มที่ได้รับฟอร์มาลินพบสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำสะอาดและกลุ่มที่ได้รับสาร propylene glycol อย่างมีนัยสำคัญในทุกช่วงของการทดลอง ส่วนกลุ่มที่ได้รับน้ำมันกานพลู พบว่าในชั่วโมงที่ 1 และ 2 ของการทดลอง อัตราการตายเฉลี่ยสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามระดับความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่สูงขึ้น แต่ในชั่วโมงที่ 4 และ 6 ของการทดลอง กลุ่มน้ำมันกานพลูที่

ระดับความเข้มข้น 30 และ 60 พีพีเอ็ม พบอัตราการตายเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม อย่างมีนัยสำคัญ โดยพบอัตราการตายสูงกว่าร้อยละ 90 (91.0 % และ 93.5% ในช่วงวันที่ 4 และ 94.3% และ 100.0% ในช่วงวันที่ 6 ตามลำดับ)

บทวิจารณ์

การศึกษาค้นคว้าพบว่า น้ำมันกานพลูทำลายเชื้อ *I. multifiliis* ระยะ theront ได้ดีกว่าระยะอื่น เนื่องจากเชื้อระยะนี้มีกรวยน้ำเป็นอิสระ และไม่มีระบบป้องกันตัวเอง (Noga, 1996) ส่วนเชื้อระยะ trophont มีความไวต่อการถูกทำลายด้วยน้ำมันกานพลูปานกลางตามความเข้มข้น และระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่าน้ำมันกานพลูที่มียูจินอลขนาด 30 และ 60 พีพีเอ็ม สามารถทำลายเชื้อระยะ trophont ได้ดีกว่าฟอร์มาลิน ส่วนผลการทำลายเชื้อในระยะ tomont ของน้ำมันกานพลูพบว่าน้ำมันกานพลูมีความสามารถในการทำลายเชื้อในระยะ tomont ได้ต่ำ ถึงแม้ว่าน้ำมันกานพลูที่มียูจินอลขนาด 60 พีพีเอ็มสามารถทำลายเชื้อระยะ tomont ได้ดีกว่าน้ำมันกานพลูที่มียูจินอลขนาด 10 และ 30 พีพีเอ็ม แต่ก็ยังต่ำกว่าการใช้ฟอร์มาลินที่ขนาด 50 พีพีเอ็ม ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อระยะ tomont เป็นระยะที่มีการสร้างถุงชีสต์โดยรอบเพื่อปกป้องตัวจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ในระยะที่มีการแบ่งตัวของตัวอ่อน (Noga, 1996) และรวมถึงปัจจัยในการละลายของสารเคมีแต่ละชนิด เนื่องจากน้ำมันกานพลูมีความสามารถในการละลายน้ำได้น้อย แม้จะมีการใช้ตัวทำลายเพื่อช่วยเพิ่มการละลาย อย่างไรก็ตาม พบว่าเมื่อเติมน้ำมันกานพลูที่ผสมกับตัวทำลายลงไปใต้น้ำจะพบลักษณะตะกอนขาวขุ่นซึ่งเป็นลักษณะของคอลลอยด์ ที่มีอนุภาคเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 1×10^{-7} ถึง 1×10^{-4} เซนติเมตร ส่วนฟอร์มาลินมีความสามารถในการละลายน้ำได้โดยไม่ต้องอาศัยตัวทำลายซึ่งเมื่อเติมฟอร์มาลินลงไปใต้น้ำจะยังพบลักษณะเป็นสารละลายใสซึ่งเป็นลักษณะของสารละลาย ที่มีอนุภาคเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า 10^{-7} เซนติเมตร และในการศึกษาค้นคว้าพบว่า น้ำมัน

กานพลูทำลายเชื้อ *I. multifiliis* ในระยะ theront และระยะ trophont ได้ดีกว่าฟอร์มาลิน ยกเว้นแต่ระยะ tomont ที่ทำลายได้น้อยกว่าฟอร์มาลิน ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยเรื่องความสามารถในการละลายของสารเคมีดังกล่าว ในปัจจุบันมีการพัฒนาระบบนำส่งน้ำมันหอมระเหยสู่อวัยวะเป้าหมายด้วยนาโนเทคโนโลยี เช่น ระบบไมโครอิมัลชัน และระบบนาโนอิมัลชันซึ่งจะทำให้ให้น้ำมันหอมระเหยมีขนาดเล็กมากในระดับนาโนเมตร โดยจะช่วยให้เพิ่มความสามารถในการละลายของน้ำมัน และส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของน้ำมันหอมระเหยสูงขึ้น (Azeem et al., 2009)

ผลการศึกษาค้นคว้าคล้ายกับการศึกษาของ Buchmann และคณะ (2003) ที่พบว่าสารสกัดจากกระเทียมขนาด 62.5 พีพีเอ็ม สามารถทำลายเชื้อระยะ theront ในเวลา 15 ชั่วโมง ส่วนเชื้อระยะ tomont ต้องใช้ในขนาด 117 และ 570 พีพีเอ็ม นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้สมุนไพรหลายชนิดในการควบคุมเชื้อ *I. multifiliis* เช่น สารสกัดจากใบของต้น *Macleaya cordata* (Yao et al., 2010) สารสกัดจากใบของต้นหมามุ่ย (*Mucuna pruriens*) สารสกัดจากเมล็ดมะละกอ (*Carica papaya*) (Ekanem et al., 2004) และน้ำมันหอมระเหยจากข่า (ปัญญา และคณะ, 2555) เป็นต้น โดยสารแต่ละตัวให้ผลในการควบคุมเชื้อ *I. multifiliis* ในแต่ละระยะที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร และระยะเวลาการสัมผัสสาร

การทำลายเชื้อโปรโตซัวของน้ำมันกานพลูคาดว่ามาจากสารประกอบหลัก และสารออกฤทธิ์สำคัญคือ ยูจินอล ที่เป็นสารประกอบฟีนอลิก และมีรายงานฤทธิ์ต้านเชื้อโปรโตซัวหลายชนิด เช่น ต้านเชื้อ *Eimeria sp.* ที่ก่อโรค coccidiosis ในไก่ (Adnane et al., 2011) และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Trypanosoma cruzi* (Santoro et al., 2007) เป็นต้น ส่วนกลไกการทำลายเชื้อโปรโตซัวของยูจินอลยังไม่ทราบแน่ชัด คาดว่ามีผลขัดขวางการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ และส่งผลเสียต่อสภาพให้ซึมผ่านของเซลล์ (permeability) เซลล์เกิดการบวม และไม่สามารถเกิดการยึดครองเซลล์เจ้าบ้านได้ (Machado et

al., 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าสารยูจินอลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของเชื้อแบคทีเรีย (Hemaiswarya and Doble, 2009) และทำลายออร์แกเนลล์ในไซโตพลาซึมของเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* (Park et al., 2009) อีกด้วย ในการศึกษครั้งนี้เชื้อ *I. multifiliis* ทุกระยะถูกทำลายด้วยน้ำมันกานพลูอย่างไรก็ตามยังไม่สามารถระบุได้ว่าน้ำมันกานพลูมีการออกฤทธิ์ในการทำลายเชื้อ *I. multifiliis* อย่างไร

โดยทั่วไปการใช้น้ำมันกานพลูในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีวัตถุประสงค์เพื่อการจับบังคับปลา โดยการใช้ น้ำมันกานพลูที่มีสารยูจินอลขนาด 6-10 พีพีเอ็ม มีประโยชน์ในการซีมปลาได้นาน 4-6 ชั่วโมง เพื่อช่วยลดความเครียดและลดอัตราการตายในระหว่างการขนส่งปลา น้ำมันกานพลูมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและมีราคาถูกเมื่อเทียบกับยาสลับที่เป็นสารเคมี (Noga, 1996) การศึกษานี้พบว่า น้ำมันกานพลูที่มีสารยูจินอลขนาด 10 พีพีเอ็ม สามารถทำลายเชื้อ *I. multifiliis* ระยะ theront ซึ่งเป็นระยะแพร่ระบาดของโรคได้ดี อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการใช้น้ำมันกานพลูซีมปลาเพื่อใช้ในการขนส่งจะสามารถลดหรือยับยั้งการระบาดของโรคจุดขาวในฟาร์มได้ เนื่องจากยังมีปัจจัยหลายอย่างเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น คุณภาพน้ำ สิ่งแวดล้อมต่างๆ ชนิดและความหนาแน่นของปลา รวมทั้งมาตรการต่างๆ ในการป้องกัน และควบคุมโรคในฟาร์ม ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการระบาดของโรคจุดขาว

สรุป

จากผลการศึกษารูปได้ว่าน้ำมันกานพลูมีผลทำลายเชื้อ *I. multifiliis* โดยคาดว่าสารยูจินอลเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ผลที่ได้อาจแตกต่างกันขึ้นกับระยะของเชื้อและขนาดของน้ำมันกานพลู โดยที่ขนาดของน้ำมันกานพลูที่สูงขึ้นก็ให้ผลในการทำลายเชื้อที่สูงขึ้นด้วย ข้อมูลดังกล่าวนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับผลของน้ำมันสมุนไพรในการทำลายเชื้อก่อโรคสำคัญในปลาน้ำจืด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนเงินรายได้คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปี พ.ศ. 2554 และขอขอบคุณ อ.น.สพ.ดร.วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

- ปัญญาศ โปติบุตร ศิริพร โอโคโนกิ วาสนา ไชยศรี และ สุรัชย์ พิกุลแก้ว. ผลของน้ำมันฆ่าต่อกรดต้านเชื้อ *Ichthyophthirius multifiliis* ระยะติดโรคในปลาน้ำจืด. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มช. 2555; 2(1): น.1-5.
- พเยาว์ เหมือนวงศ์ญาติ. (2537). สมุนไพรก้าวใหม่. กรุงเทพฯ: เมติคัล มีเดีย.
- อรุณพร อิฐรัตน์. (2532). สมุนไพรไทย-เทศ เล่ม1. สงขลา: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Adnane, R., Sanaa, A., Latifa, B., Najat, C. & Fouzia C. (2011). In vitro destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. *Veterinary Parasitology*. 182: 121– 126.
- Azeem, A., Khan, Z. I., Aqil, M., Ahmad, F. J., Khar, R. K., & Talegaonkar, S. (2009). Microemulsions as a surrogate carrier for dermal drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 35(5): 525–547.
- Clark, T. G., Lin, T.-L., & Dickerson, H. W. (1995). Surface immobilization antigens of *Ichthyophthirius multifiliis*: Their role in protective immunity. *Annual Review of Fish Diseases*, 5, 113–131. doi:10.1016/0959-8030(95)00005-4
- Dickerson, H.W. (2006). *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora) In: Woo, P. T. K. (2006). *Fish Diseases and Disorders*, Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections (Second.). CABI.
- Ekanem, A. P., Obiekezie, A., Kloas, W., & Knopf, K. (2004). Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitology research*, 92(5), 361–366. doi:10.1007/s00436-003-1038-8

- Gonzalez, S. F., Buchmann, K., & Nielsen, M. E. (2007). *Ichthyophthirius multifiliis* infection induces massive up-regulation of serum amyloid A in carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary immunology and immunopathology*, 115(1-2), 172–178. doi:10.1016/j.vetimm.2006.09.007
- Heinecke, R. D., & Buchmann, K. (2009). Control of *Ichthyophthirius multifiliis* using a combination of water filtration and sodium percarbonate: Dose-response studies. *Aquaculture*, 288(1–2), 32–35. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.11.017
- Hemaiswarya, S., & Doble, M. (2009). Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 16(11), 997–1005. doi:10.1016/j.phymed.2009.04.006
- Kuhn M., contributions from Steve Weston, Wing J. & Forester J. (2011). contrast: A collection of contrast methods. R package version 0.17. Retrieved from <http://CRAN.R-project.org/package=contrast>
- Ling, F., Wang, J.-G., Wang, G.-X., & Gong, X.-N. (2011). Effect of potassium ferrate(VI) on survival and reproduction of *Ichthyophthirius multifiliis* tomonts. *Parasitology research*, 109(5), 1423–1428. doi:10.1007/s00436-011-2389-1
- Lom, J., & Dyková, I. (1992). Protozoan Parasites of Fishes, Volume 26. Elsevier Science.
- Machado, M., Dinis, A. M., Salgueiro, L., Custódio, J. B. A., Cavaleiro, C., & Sousa, M. C. (2011). Anti-Giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. *Experimental parasitology*, 127(4), 732–739. doi:10.1016/j.exppara.2011.01.011
- Matthews, R. A. (2005). *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and Ichthyophthiriosis in Freshwater Teleosts. *Advances in parasitology*, 59, 159–241. doi:10.1016/S0065-308X(05)59003-1
- Meyer, F. P. (1974). Parasites of freshwater fishes; II Protozoa 3 *Ichthyophthirius multifiliis* (Revised) (No. FDL - 2) (pp. 0–5). United States Geological Survey. Retrieved from <http://pubs.er.usgs.gov/publication/2001006>
- Noga, E. J. (1996). *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*. St. Louis: Mosby.
- Park, M. J., Gwak, K. S., Yang, I., Kim, K. W., Jeung, E. B., Chang, J. W., & Choi, I. G. (2009). Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia*, 80(5), 290–296. doi:10.1016/j.fitote.2009.03.007
- Picón-Camacho, S. M., Taylor, N. G. H., Bron, J. E., Guo, F. C., & Shinn, A. P. (2011). Effects of long duration, low dose bronopol exposure on the control of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora), parasitising rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Veterinary parasitology*, 186(3-4), 237–244. doi:10.1016/j.vetpar.2011.11.022
- Pinheiro, J., Bates, D., Debroy, S., Sarkar, D., & The R Core team. (2012). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models.
- R Development Core Team. (2012). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Santoro, G. F., Cardoso, M. G., Guimarães, L. G. L., Mendonça, L. Z., & Soares, M. J. (2007). *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Experimental parasitology*, 116(3), 283–290. doi:10.1016/j.exppara.2007.01.018
- Scholz, T. (1999). Parasites in cultured and feral fish. *Veterinary parasitology*, 84(3-4), 317–335.
- Straus, D. L., & Meinelt, T. (2009). Acute toxicity of peracetic acid (PAA) formulations to *Ichthyophthirius multifiliis* theronts. *Parasitology research*, 104(5), 1237–1241. doi:10.1007/s00436-009-1361-9
- Yao, J.-Y., Shen, J.-Y., Li, X.-L., Xu, Y., Hao, G.-J., Pan, X.-Y., Wang, G.-X., et al. (2010). Effect of sanguinarine from the leaves of *Macleaya cordata* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Parasitology research*, 107(5), 1035–1042. doi:10.1007/s00436-010-1966-z