บทที่ 2

การทดลอง

การทดลองที่ 1 : การทดสอบฤทธิ์ของเปลือกผลมังคุดและขมิ้นชันต่อเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดอาการท้องร่วงในลูกสุกร

โดยการหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) โดยวิธี agar dilution test (Lorian, 1996) และ salt aggregation test (SAT) ดัดแปลงจากวิธีของ Türi และคณะ (1997)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาถึงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลมังคุดและขมิ้นชันอย่างละ 5 สารสกัดต่อแบคทีเรียก่อโรคท้องร่วงในลูกสุกรโดยวิธี agar dilution

2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลมังคุดและขมิ้นชันอย่างละ 5 สารสกัดต่อ hydrophobicity ของแบคทีเรียก่อโรคท้องร่วงในลูกสุกรโดยวิธี salt aggregation test

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเตรียมสมุนไพร

วิธีการเตรียมตามคำแนะนำของ ยุทธนา (2543ก) ดังนี้

ก. การเตรียมขมิ้นชันอบแห้ง มีขั้นตอนดังนี้

1. เก็บรวบรวมเหง้าขมิ้นชันสดที่แก่จัดโดยมีอายุประมาณ 9-10 เดือน โดยสังเกตจากใบและลำต้นแห้งเป็นสีเหลือง

2. ทำความสะอาดเหง้าขมิ้นชัน โดยใช้น้ำล้างดินที่ติดอยู่ออกให้หมด ตัดแต่งส่วนที่ช้ำหรือเน่าทิ้ง ผึ่งลมให้แห้ง

3. หั่นเป็นชิ้นบางๆหนาไม่เกิน 2 มิลลิเมตร

4. นำเข้าอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเกลี่ยให้ชิ้นขมิ้นชันกระจายทั่วในภาชนะ ไม่ควรให้ชิ้นขมิ้นชันซ้อนกันเกิน 2-3 ชิ้น จะทำให้แห้งเร็วและไม่เน่าเสียง่าย

5. ระหว่างอบแห้งทุกๆ 12 ชั่วโมง ให้ทำการกลับชิ้นขมิ้นชันด้านล่างขึ้นข้างบนและด้านบนลงด้านล่างเพื่อให้แห้งเร็วและสม่ำเสมอ

6. นำมาบดหยาบด้วยตะแกรงขนาด 0.75 มิลลิเมตร และบดละเอียดด้วยตะแกรงเบอร์ 0.12 มิลลิเมตร

7. เก็บขมิ้นชันบดแห้งในถุงพลาสติก ผูกให้แน่นไม่ให้อากาศเข้า

ข. การเตรียมเปลือกผลมังคุดอบแห้ง ดังนี้

1. เก็บรวบรวมเปลือกผลมังคุดจากผลมังคุดที่แก่ โดยเปลือกจะมีสีแดงหรือแดงม่วง

2. เด็ดขั้วผลออกและทำความสะอาด โดยไม่ให้มีเนื้อมังคุดติดเปลือกด้านใน

3. หั่นเปลือกผลมังคุดเป็นชิ้นบางๆ หนาไม่เกิน 5 มิลลิเมตร

4. นำเข้าอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเกลี่ยให้ชิ้นเปลือกผลมังคุดกระจายทั่วในภาชนะ ไม่ควรให้ชิ้นเปลือกผลมังคุดซ้อนกันเกิน 2-3 ชิ้น จะทำให้แห้งเร็วและไม่เน่าเสียง่าย

5. ระหว่างอบแห้งทุกๆ 12 ชั่วโมง ให้ทำการกลับชิ้นเปลือกผลมังคุดด้านล่างขึ้นข้างบนและด้านบนลงด้านล่างเพื่อให้แห้งเร็วและสม่ำเสมอ

6. นำมาบดหยาบด้วยตะแกรงขนาด 0.75 มิลลิเมตร และบดละเอียดด้วยตะแกรงเบอร์ 0.12 มิลลิเมตร

7. เก็บเปลือกผลมังคุดบดแห้งในถุงพลาสติก ผูกให้แน่นไม่ให้อากาศเข้า

2. การทดสอบหาค่า MIC โดยวิธี Agar dilution test

2.1 แบคทีเรีย แบคทีเรียที่เป็นเชื้อสาเหตุในการก่อโรคท้องร่วงในลูกสุกร แยกได้จากลูกสุกรที่อยู่ในระยะก่อนหย่านมและหลังหย่านม ประกอบด้วย *E. coli* จำนวน 11 ไอโซเลท, *Salmonella* sp. 5 ไอโซเลท และ *Enterobacter cloaceae* 3 ไอโซเลท สำหรับแบคทีเรียชุดควบคุมที่ใช้ในการทดลองนี้คือ *Shigella sonnei* ที่แยกได้จากคนไข้ เชื้อ *Salmonella* B (Sal B) ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันสุขภาพสัตว์ กรมปศุสัตว์ กรุงเทพฯ นอกจากนี้มีเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทำการเก็บเชื้อ โดย streak ลงบน agar plate แล้วนำไป incubate ที่ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง เก็บเชื้อเป็น stock culture ใน nutrient agar slant ในตู้เย็นและทำการ subculture เดือนละ 1 ครั้ง

2.2 สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดหรือขมิ้นชัน สารสกัดหยาบจากเปลือกผลมังคุดและขมิ้นชันอย่างละ 5 สารสกัด ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. อรุณพร อิฐรัตน์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้จากการนำเปลือกผลมังคุดหรือเหง้าขมิ้นชันตากแห้งบดละเอียด 500 กรัม แช่ในตัวทำละลายเป็นลำดับจากขั้วต่ำไปขั้วสูงเรียงตามลำดับ ดังนี้ petroleum ether, chloroform, ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ และ ethanol : น้ำ (1:1) โดยหมักในตัวทำละลายแต่ละชนิดเป็นเวลา 2 วัน กรองน้ำสกัดที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ส่วนกากของสมุนไพรนำไป

แช่ในตัวทำละลายต่อไปเป็นลำดับ สมุนไพรส่วนที่ได้หลังจากการแช่ใน ethanol : น้ำ (1:1) นำมาต้มกับน้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง กรองส่วนน้ำสกัดไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer ทำให้ได้สารสกัดหยาบอย่างละ 5 สารสกัด ดังนี้

1. สารสกัดเปลือกผลมังคุดหรือขมิ้นชันจากการสกัดด้วย petroleum ether (เปลือกผลมังคุดหรือขมิ้นชัน-Pet. Ether)

2. สารสกัดเปลือกผลมังคุดหรือขมิ้นชันจากการสกัดด้วย chloroform (เปลือกผลมังคุดหรือขมิ้นชัน $CHCl_3$)

3. สารสกัดเปลือกผลมังคุดหรือขมิ้นชันจากการสกัดด้วย ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ (เปลือกผลมังคุดหรือขมิ้นชัน EtOH 95%)

4. สารสกัดเปลือกผลมังคุดหรือขมิ้นชันจากการสกัดด้วย ethanol: น้ำ (1:1) หรือ ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ (เปลือกผลมังคุดหรือขมิ้นชัน - EtOH 50%)

5. สารสกัดเปลือกผลมังคุดและขมิ้นชันจากการสกัดด้วยน้ำ (เปลือกผลมังคุดหรือขมิ้นชัน-น้ำ)

นำสารสกัดที่ได้มาเตรียมเป็น stock solution ให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยสารสกัดข้อ 1 ถึง 4 ละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) และสารสกัดข้อ 5 ละลายในน้ำ

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 Mueller Hinton agar (MHA) (Difco)

3.2 Nutrient agar (NA) (Difco)

3.3 Xylose lysine desoxycholate medium (XLD) (Difco)

3.4 Eosin methylene blue (EMB) (Difco)

4. สารเคมี

4.1 Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merek)

4.2 Sodium chloride สำหรับเตรียม normal saline solution (NSS)

4.3 Ammonium sulfate

4.4 Sodium hydroxide

4.5 Potassium dihydrogen phosphate (Fulka)

4.6 Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์

5. อุปกรณ์อื่นๆ

5.1 Loop

5.2 Needle

5.3 Blank Disk ขาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Schleicher & Schuell)

5.4 Forceps

5.5 จานใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร

5.6 Vernier caliper

5.7 Cotton swab

5.8 Magnetic bar

5.9 Test tubes ขนาดต่าง ๆ

5.10 Glass pipette 1 มิลลิลิตร, 5 มิลลิลิตร, 10 มิลลิลิตร, 20 มิลลิลิตร

5.11 Vortex mixer

5.12 Water bath

5.13 Multipoint inoculator

5.14 Automatic pipette 1-10 μl 10-100 μl 100-1,000 μl

5.15 Micopipette tip

5.16 0.5 & 5 McFarland standard

5.17 Flask 125 มิลลิลิตร, 250 มิลลิลิตร, 500 มิลลิลิตร, 1,000 มิลลิลิตร

5.18 Balance

5.19 pH meter

5.20 Standard pH 4 & 7

5.21 Microtiter plate U shape

5.22 หลอด Epppendorf

5.23 Black paper sheet

5.24 Light microscope และ stereozoom

5.25 Beaker 50 มิลลิลิตร, 100 มิลลิลิตร, 500 มิลลิลิตร, 1,000 มิลลิลิตร

5.26 Laminar flow class 2

5.27 Incubator 35 องศาเซลเซียส

5.28 Autoclave

5.29 Hot air oven

Central Library
Prince of Songkla University

6. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดหรือขมิ้นชัน

6.1 เจือจางสารสกัด โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย แบบ serial 2-fold dilution ให้ได้ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5 และ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

6.2 เติมสารสกัดแต่ละความเข้มข้นลงไปใน melted MHA โดยใช้อัตราส่วน 1:25 โดยใส่สารสกัด 0.6 มิลลิลิตร ลงใน melted media 14.4 มิลลิลิตร แล้วทำการเท plate ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเท่ากับ 4, 2, 1, 0.5, 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ตาราง 1) ส่วนชุดควบคุม ใช้ DMSO และ น้ำกลั่น ผสมใน melted agar แทนสารสกัด สำหรับสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดหรือขมิ้นชันที่สกัดด้วยน้ำทำการผสมสารสกัดใน melted media ในอัตราส่วน 1:10 เตรียมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ อยู่ในช่วง 10-1.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ตาราง 2)

ตาราง 1 การเตรียมอาหารผสมสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดหรือขมิ้นชันที่สกัดด้วย petroleum ether, chloroform, ethanol 95% และ ethanol 50% ที่ละลายด้วย DMSO สำหรับการทดสอบ agar dilution

	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3	หลอดที่ 4	หลอดที่ 5
สารสกัด (มิลลิลิตร) 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	0.6	1.5	1.5	1.5	1.5
DMSO (มิลลิลิตร)	-	1.5	1.5	1.5	1.5
Conc^n (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	100	50	25	12.5	6.25
ปริมาตรสารสกัดที่ใช้ (มิลลิลิตร)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
ปริมาตร Melted MHA (มิลลิลิตร)	14.4	14.4	14.4	14.4	14.4
Final conc^n ในแต่ละ plate(มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	4	2	1	0.5	0.25

ดูดทิ้ง 1.5 มิลลิลิตร

ตาราง 2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดหรือขมิ้นชันที่สกัดด้วยน้ำ
สำหรับการทดสอบ agar dilution

	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3	หลอดที่ 4
สารสกัด (มิลลิลิตร) 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	1.5	3.5	3.5	3.5
น้ำ (มิลลิลิตร)	-	3.5	3.5	3.5
Conc^{n} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	100	50	25	12.5
ปริมาตรสารสกัดที่ใช้ (มิลลิลิตร)	1.5	1.5	1.5	1.5
Melted MHA (มิลลิลิตร)	13.5	13.5	13.5	13.5
Final conc^{n} ในแต่ละ plate (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	10	5	2.5	1.25

ดูดทิ้ง 3.5 มิลลิลิตร

7. การเตรียม inoculumn

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบน NA slant บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง แล้วเขี่ยเชื้อที่ได้ใส่ใน NSS ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland standard

8. การทดสอบ

8.1 เขียนแผนภาพของหลุมของ multipoint inoculator กับเชื้อให้ตรงกัน โดยเชื้อหมายเลข 1-19 หยอดเชื้อลงในหลุม 1-19 ส่วน *E. coli* ATCC 25922 , *S. sonnei, S. aureus* ATCC 25923 ให้เขียนแผนภาพไว้ตรงบริเวณขอบที่เหลืออยู่ของ plate ที่ยังไม่ได้มีการ inoculate เชื้อ

8.2 ดูดเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วลงไปในแต่ละหลุมของ multipoint inoculator ให้ถูกต้องตามที่เขียนไว้

8.3 ใช้ sterile multipoint inoculator inoculate เชื้อจากหลุมลงไปยัง plate ที่มีสารสกัดแต่ละชนิด แต่ละความเข้มข้น (1 จุด มีเชื้อประมาณ 10^{4} CFU) และใช้ automatic pipette ขนาด 1-10 µl ดูดเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 , *S. sonnei, S. aureus* ATCC 25923 ปริมาตร 2 µl แล้วหยดลงบน plate ในแต่ละสารสกัด และแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 2 ครั้ง

8.4 นำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมงแล้วทำการอ่านผล

9. การอ่านผล

ถ้ามีเชื้อขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อลักษณะเป็นจุดขนาดใหญ่ เช่นเดียวกับชุดควบคุม อ่านผลเป็น ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโต ถ้าไม่มีเชื้อขึ้น หรือมีเชื้อขึ้นเป็นโคโลนีเล็กๆ $\leq$ 2 โคโลนี อ่านผลเป็น ยับยั้งการ

เจริญเติบโต สำหรับค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้

10. การทดสอบ Salt Aggregation Test (SAT) ดัดแปลงจากวิธีของ Türi และคณะ (1997)

Salt Aggregation Test (SAT) เป็นวิธีทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ในการเกาะติดกับ receptor ที่ผนังเซลล์ของ host โดยอาศัย adhesin ที่อยู่ที่ fimbriae ของจุลินทรีย์ และ receptor ของ host เกาะกันด้วย hydrophobic force หลักการของ SAT คือ การใช้เกลือ ammonium sulfate ในการตกตะกอนโปรตีนที่อยู่บริเวณพื้นผิวของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งหนึ่งในจำนวนโปรตีนนั้นก็คือ adhesin และ antigen ของเชื้อที่เกาะอยู่บนผิวของเซลล์ จุลินทรีย์ที่ผนังเซลล์มี hydrophobicity สูงจะเกาะกลุ่มกันเองได้หรือถูกชักนำให้เกิดการเกาะกลุ่มได้ด้วย ammonium sulfate ความเข้มข้นต่ำ ส่วนสายพันธุ์ที่มี hydrophobicity ต่ำ จะถูกชักนำให้เกิดการเกาะกลุ่มได้ด้วย ammonium sulfate ความเข้มข้นสูง หรือไม่มีการเกาะกลุ่มกันเลย (Türi *et al.*, 1997)

10.1 การทดสอบหาค่า SAT titer ของเชื้อ *E. coli*, *Salmonella* sp.และ *E. cloacae*

10.1.1 วิธีการทดสอบ

1. เตรียม ammonium sulfate solution ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 3.0 M โดยใช้ 0.04 M phosphate buffer pH 6.8 เป็นตัวทำละลาย

2. นำเชื้อ *E. coli* จำนวน 11 ไอโซเลท และ *Salmonella* sp. จำนวน 5 ไอโซเลท ที่แยกได้จากมูลลูกสุกรที่มีอาการท้องร่วง และ *E. coli* ATCC 25922 มาเพาะเลี้ยงใน NA slant บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อมาปรับให้ได้ความขุ่น 5 McFarland (มีเชื้อประมาณ 1.5 x 10^9 CFU/มิลลิลิตร)

3. ใช้ automatic pipette ดูด ammonium sulfate solution แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร (50 μl) ใส่ในหลุมของ microtiter plate โดยใช้ 0.04 M phosphate buffer pH 6.8 เป็นชุดควบคุม

4. เติม bacterial suspension จากข้อ 2 ปริมาณ 0.05 มิลลิลิตร (50 μl) ลงไปใน แต่หลุมของ ammonium sulfate solution ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ซึ่งจะทำ ให้ความเข้มข้นของ ammonium sulfate solution ลดลงครึ่งหนึ่ง โดยเหลือความเข้มข้น 0.05, 0.25, 0.5, 0.75, 1.5 M ตามลำดับ

5. เขย่า microtiter plate เบาๆ เป็นเวลาประมาณ 5 นาที

6. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จึงอ่านผลการเกิด aggregation ด้วย กล้องจุลทรรศน์ว่ามีการเกาะกลุ่มกันหรือไม่ โดยใช้กำลังขยาย 40 เท่า อ่านผลออกมาเป็น positive หรือ negative แล้วแปลผลออกมาเป็น SAT titer

หมายเหตุ หลุมที่อ่านผลไม่ชัดเจน จะนำมาใส่ใน slide หลุม แล้วจะดูผลด้วยกล้องจุลทรรศน์

10.1.2 การแปลผล

SAT positive คือ เห็นการเกาะกลุ่มชัดเจน

SAT negative คือ ไม่มีการเกาะกลุ่ม หรือมีการเกาะกลุ่มกันน้อยมาก

SAT titer คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของ ammonium sulfate solution ที่ทำให้เชื้อเกาะกลุ่มชัดเจน สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อตาม SAT titer ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

1. Highly aggregative หรือ hydrophobic strains หมายถึง เชื้อที่เกิด autoaggregation คือ เกิด aggregation ในหลุมชุดควบคุมที่มีแต่ 0.02 M phosphate buffer pH 6.8 และ/หรือเป็นพวกที่มี SAT titer 0.05 และ 0.25

2. Low aggregative strain หมายถึง เชื้อที่มีค่าของ SAT titer อยู่ในช่วงระหว่าง 0.5-1.5

3. Nonaggregative strain หมายถึง เชื้อที่ไม่เกิด aggregation ที่ ammonium sulfate solution ความเข้มข้น 1.5 M

10.2 การทดสอบผลของสารเปลือกผลมังคุดและขมิ้นชันต่อค่า SAT titer

10.2.1 เตรียม ammonium sulfate solution ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 3.0 M โดยใช้ 0.04 M phosphate buffer pH 6.8 เป็นตัวทำละลาย

10.2.2 นำเชื้อ *E. coli, Salmonella* sp. และ *E. cloacae* ชุดเดียวกับที่ใช้ในการทดลองในเรื่องการหาค่า MIC โดยวิธี agar dilution มาเพาะเลี้ยงใน NA plate บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อมาปรับให้ได้ความขุ่น 5 McFarland Standard ด้วย 0.04 M phosphate buffer pH 6.8 (มีเชื้อ 1.5 x 10^9 CFU/มิลลิลิตร) โดยปรับเชื้อปริมาณ 5.5 มิลลิลิตร

10.2.3 เตรียม sterile eppendrof ของแต่ละเชื้อ โดยใน 1 เชื้อ เตรียมทั้งหมด 7 หลอด หลอดที่ 6 ใช้เป็นชุดควบคุมของหลอดที่ 1-4 ที่ใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายเขียนว่า DMSO และหลอดที่ 7 ใช้เป็นชุดควบคุมของหลอดที่ 5 ที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย เขียนว่า น้ำ

10.2.4 เขียนแผนภาพของ Microtiter plate ให้ column ที่ 1-5 ใส่ ammonium sulfate solution เรียงตามลำดับความเข้มข้นคือ 3.0, 1.5, 1.0, 0.5, 0.1 M และ columnที่ 6 เป็นชุดควบคุม โดยเติม 0.04 M phosphate buffer pH และให้ Row A-G เป็นแถวที่ใช้เติมเชื้อที่มีสารสกัดแต่ละ fraction โดยเรียงตามลำดับคือ แถว A เชื้อที่ผสมเปลือกผลมังคุดและขมิ้นชันสกัดด้วย ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ แถว B เชื้อที่ผสมเปลือกผลมังคุดและขมิ้นชันสกัดด้วย ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ แถว C เชื้อที่ผสมเปลือกผลมังคุดและขมิ้นชันสกัดด้วย petroleum ether แถว D เชื้อที่ผสมเปลือกผลมังคุด

และขมิ้นชันสกัดด้วย chloroform แถว E เชื้อที่ผสมเปลือกผลมังคุดและขมิ้นชันสกัดด้วยน้ำ แถว F DMSO แถว G น้ำกลั่น

10.2.5 ใช้ automatic pipette ดูดเชื้อแบ่งลงใน sterile eppendorf หลอดละ 720 µl ทั้งหมด 7 หลอด

10.2.6 เติมสารสกัดเปลือกผลมังคุดและขมิ้นชันแต่ละส่วนสกัดจำนวน 30 µl ลงใน suspension ของเชื้อให้ถูกต้องตามที่เขียนไว้ก่อนหน้านี้ แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Vortex แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที (ใช้ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC หรือที่ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

10.2.7 ใช้ automatic pipette ดูด ammonium sulfate solution แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร (50 µl) ใส่ใน microtiter plate แบบ U shape โดยใช้ 0.04 M phosphate buffer pH 6.8 เป็นชุดควบคุม โดยดูดสารใส่ตามแผนภาพที่เขียนไว้ในขั้นที่ 4

10.2.8 ใช้ automatic pipette ดูดเชื้อที่ผสมสารสกัดไว้แล้ว โดยดูดมา 0.05 มิลลิลิตร (50 µl) ใส่ลงไปในแต่ละหลุมของ ammonium sulfate solution ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นของ ammonium sulfate solution ลดลงครึ่งหนึ่ง โดยเหลือความเข้มข้น 0.05, 0.25, 0.5, 0.75, 1.5 M ซึ่งใส่ตามแผนภาพที่ได้เขียนไว้ในขั้นที่ 4 โดยทำ 2 ซ้ำ โดยทำในบริเวณ column ที่ 7-12 ที่ยังเหลือว่างอยู่ ของ microtiter plate

10.2.9 เขย่า microtiter plate เบาๆ เป็นเวลาประมาณ 5 นาที

10.2.10 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ครบ 30 นาที จึงอ่านผลการทดลองด้วยการตรวจดูการ aggregation ด้วยกล้องจุลทรรศน์ว่ามีการเกาะกลุ่มกันหรือไม่ โดยใช้กำลังขยาย 40 เท่า อ่านผลออกมาเป็น positive หรือ negative แล้วแปลผลออกมาเป็น SAT titer

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ค่า MIC ของสารสกัดโดยวิธี agar dilution

การทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดโดยวิธี agar dilution ผลการทดสอบแสดงไว้ในตาราง 3 พบว่าขมิ้นชันที่สกัดด้วย petroleum ether, chloroform และ ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมได้คือ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งเชื้อกลุ่ม *E. coli* , *Salmonella* sp., *E. cloacae* ที่แยกได้จากมูลลูกสุกรที่มีอาการท้องร่วง และ *Shigella sonnei* สายพันธุ์ที่แยกได้จากคน มีเพียงสารสกัดจาก ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ที่ยับยั้ง *E. coli* จากมูลลูกสุกร *E. coli* ATCC 25922 และ *Shigella sonnei* โดยมีค่า MIC เท่ากัน คือ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แต่สารสกัดทั้ง 4 สาร สามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ได้ โดยขมิ้นชันที่สกัดด้วย petroleum ether, chloroform และ ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่า MIC น้อยกว่า 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ขมิ้นชันที่สกัดด้วย

ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่า MIC เท่ากับ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับขมิ้นชันที่สกัดด้วยน้ำไม่สามารถยับยั้งเชื้อในทุกกลุ่มที่ทดสอบ คือ มีค่า MIC มากกว่า 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตาราง 3 ค่า MIC ของสารสกัดจากขมิ้นชันที่สกัดด้วย petroleum ether, chloroform, ethanol 95%, ethanol 50% และ น้ำ ต่อแบคทีเรียก่อโรคท้องร่วงในลูกสุกรและเชื้อควบคุม

ชนิดเชื้อ (จำนวนไอโซเลท)	MIC (mg/ml) ของขมิ้นชัน				
	Petroleum ether	Chloroform	95% Ethanol	50% Ethanol	H_2O
***E. coli* (11)**	>4	>4	4	>4	>10 mg/ml
***Salmonella* sp. (5)**			>4		
***E. cloacae* (3)**					
***E. coli* ATCC 25922**			4		
Shigella sonnei					
***S. aureus* ATCC 25923**	<0.25	<0.25	<0.25	2	

การทดสอบกับสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดได้ผลในทำนองเดียวกันกับสารสกัดจากขมิ้นชัน เปลือกผลมังคุดที่สกัดด้วย petroleum ether, chloroform, ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ และ ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมได้คือ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดด้วยน้ำความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งเชื้อกลุ่ม *E. coli* , *Salmonella* sp., *E. cloacae* และ *Shigella sonnei* ที่ใช้ทดสอบได้เลย แต่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ได้โดยเปลือกผลมังคุดที่สกัดด้วย chloroform , ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ , ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่า MIC ต่อ *S. aureus* ATCC 25923 น้อยกว่า 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารที่สกัดด้วย petroleum ether มีค่า MIC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารที่สกัดด้วยน้ำมีค่า MIC เท่ากับ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ตาราง 4)

ตาราง 4 ค่า MIC ของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่สกัดด้วย petroleum ether, chloroform, ethanol 95%, ethanol 50% และ น้ำ ต่อแบคทีเรียก่อโรคท้องร่วงในลูกสุกรและเชื้อควบคุม

ชนิดเชื้อ (จำนวนไอโซเลท)	MIC (mg/ml) ของเปลือกผลมังคุด				
	Petroleum ether	Chloroform	95% Ethanol	50% Ethanol	H_2O
E. coli **(11)**	>4				>10 mg/ml
Salmonella **sp. (5)**					
E. cloacae **(3)**					
E. coli **ATCC 25922**					
Shigella sonnei					
S. aureus **ATCC 25923**	0.5	<0.25	<0.25	<0.25	2.5 mg/ml

2. ค่า SAT titer และ SAT aggregative group ของเชื้อแบคทีเรีย

ผลการทดสอบหาค่า SAT titer และ SAT aggregative group ของเชื้อแบคทีเรีย แสดงในตาราง 5 และภาพประกอบ 7 (ช่องชุดควบคุมด้วยน้ำกลั่น C_{H2O}) การทดสอบหาค่า SAT titer ของเชื้อแต่ละไอโซเลทเมื่อทดสอบกับสารละลาย ammonium sulfate ใน buffer พบว่าเชื้อ *E. coli* จำนวน 10 ไอโซเลทที่นำมาทดสอบ มีค่า SAT titer มากกว่า 1.5, เท่ากับ 1.5 และ 0 M (เกิด aggregation ในหลุมควบคุมที่มีเฉพาะ 0.02 M phosphate buffer pH 6.8) แปลผลได้ว่าอยู่ในกลุ่ม nonaggregative, low aggregative และ autoaggregative จำนวน 7, 2 และ 1 ไอโซเลทตามลำดับ สำหรับเชื้อ *Salmonella* sp. 5 ไอโซเลท มีค่า SAT titer เป็น 1.5 M จำนวน 2 ไอโซเลท ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม low aggregative และมีค่า SAT titer 0.25 M 1 ไอโซเลท และ 0.05 M 2 ไอโซเลท จัดเป็น highly aggregative จำนวน 1 และ 2 ไอโซเลทตามลำดับ ส่วนเชื้อ *E. cloacae* ทั้ง 3 ไอโซเลท มีค่า SAT titer เท่ากับ 0.25 และ 0.05 M จัดอยู่ในกลุ่ม highly aggregative ทั้ง 3 ไอโซเลท สำหรับเชื้อในชุดควบคุม เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. sonnei* มีค่า SAT titer เท่ากับ 0.25 M จัดอยู่ในกลุ่ม highly aggregative เชื้อ *Salmonella* B มีค่า SAT titer เท่ากับ 1.5 M จัดอยู่ในกลุ่ม low aggregative และ *S. aureus* ATCC 25923 มีค่า SAT titer เท่ากับ 0 M จัดอยู่ในกลุ่ม autoaggregative

3. ผลของสารสกัดจากขมิ้นชันต่อค่า SAT titer และค่า SAT aggregative group ของเชื้อแบคทีเรีย

จากการทดสอบผลของสารสกัดจากขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อค่า SAT titer และค่า SAT aggregative group ของเชื้อแบคทีเรีย ดังแสดงในตาราง 5 (ช่อง H_2O) พบว่า

เชื้อ *E. coli* ทั้ง 10 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยน้ำและใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย มีค่า SAT titer มากกว่า 1.5 M ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม nonaggregative เชื้อ *Salmonella* sp. มีค่า SAT titer มากกว่า 1.5, 1.5, 0.25 และ 0.05 M แปลผลได้ว่าจัดอยู่ในกลุ่ม nonaggregative, low aggregative และ highly aggregative จำนวน 1, 2 และ 2 ไอโซเลท ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *E. cloacae* มีค่า SAT titer เท่ากับ 0.05 M 2 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่ม highly aggregative และ อีก 1 ไอโซเลท มีค่า SAT titer มากกว่า 1.5 M แปลผลได้ว่าอยู่ในกลุ่ม nonaggregative

จากผลการทดสอบดังกล่าวข้างต้นเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่า SAT aggregative group ของชุดควบคุมในน้ำกลั่น (ตาราง 5 และ 6) พบว่า เชื้อ *E. coli* มีค่า SAT aggregative group ของเชื้อไอโซเลท 3207/1 และ 231/1 เปลี่ยนแปลงจาก low aggregative ไปเป็น nonaggregative และไอโซเลท 240/1 เปลี่ยนแปลงจาก autoaggregative ไปเป็น nonaggregative ซึ่งเป็นการลด hydrophobicity ของเชื้อ โดยมี *E. coli* อีก 7 ไอโซเลท มีค่า SAT aggregative group เป็นแบบ nonaggregative คงเดิม สำหรับเชื้อ *Salmonella* sp. พบว่ามีจำนวน 3 ไอโซเลท คือ Sal 8, Sal 35 และ Sal 51 ที่มีค่า SAT aggregative group คงเดิม อีก 2 ไอโซเลท คือ เชื้อ Sal 5 และ 32 เปลี่ยนแปลงจาก low aggregative ไปเป็น nonaggregative และ autoaggregative ไปเป็น low aggregative ตามลำดับ ซึ่งเป็นการลด hydrophobicity ของเชื้อ ส่วนเชื้อ *E. cloacae* 2 ไอโซเลทมีค่า SAT aggregative group คงเดิม และอีก 1 ไอโซเลท เปลี่ยนแปลงจาก highly aggregative ไปเป็น nonaggregative สำหรับเชื้อในชุดควบคุมทั้งหมด พบว่า มีค่า SAT aggregative group เปลี่ยนแปลงไป โดยเปลี่ยนแปลงไปในทางลด hydrophobicity ของเชื้อ

ในการทดสอบผลของสารสกัดจากขมิ้นชันด้วย petroleum ether, chloroform, ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ และ ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใช้ DMSO เป็นตัวละลายสารสกัด ได้ทำการทดสอบหาค่า SAT titer ของแบคทีเรียใน DMSO ด้วยเพื่อเป็นชุดควบคุม DMSO สำหรับเปรียบเทียบผลกับสารสกัดทั้ง 4 ชนิด ผลการทดสอบดังตาราง 5 (ในช่อง C_{DMSO}) พบว่า เชื้อ *E. coli* ทั้ง 10 ไอโซเลท มีค่า SAT titer มากกว่า 1.5 M แปลผลได้ว่าอยู่ในกลุ่ม nonaggregative และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับชุดควบคุมด้วยน้ำกลั่น (C_{H2O}) พบว่า เชื้อ *E. coli* 3207/1 และ 231/1 มีค่า SAT aggregative group เปลี่ยนแปลงจาก low aggregative ไปเป็น nonaggregative และเชื้อ 240/1 เปลี่ยนแปลงจาก autoaggregative ไปเป็น nonaggregative ซึ่งเป็นการลด hydrophobicity ของเชื้อ โดยมี *E. coli* อีก 7 ไอโซเลทมีค่า SAT aggregative group คงเดิม สำหรับเชื้อ *Salmonella* sp. พบว่า มีจำนวน 3 ไอโซเลทที่มีค่า SAT aggregative group คงเดิม และ เชื้อ Sal 5 และ Sal 32 เปลี่ยนแปลงจาก low aggregative ไปเป็น nonaggregative และจาก highly aggregative ไปเป็น nonaggregative ตามลำดับ ซึ่งเป็นการลด hydrophobicity ของเชื้อ สำหรับเชื้อ *E. cloacae* 2 ไอโซเลทที่มีค่า SAT aggregative group คงเดิม และพบว่า เชื้อ *E. cloacae* 3 มีค่า SAT aggregative group เปลี่ยน

แปลงจาก highly aggregative ไปเป็น nonaggregative ซึ่งเป็นการลด hydrophobicity ของเชื้อ สำหรับเชื้อในชุดควบคุมทั้งหมด พบว่า DMSO ทำให้ค่า SAT aggregative group เปลี่ยนแปลงไป โดยเปลี่ยนแปลงไปในทางลด hydrophobicity ของเชื้อ ดังแสดงในตาราง 7

การทดสอบผลของสารสกัดจากขมิ้นชันที่สกัดด้วย petroleum ether, chloroform, ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ และ ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใช้ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อค่า SAT titer ของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า สารสกัดจากขมิ้นชันทั้ง 4 ชนิดข้างต้นมีแนวโน้มทำให้ค่า SAT aggregative group เปลี่ยนแปลงไปในทางเพิ่ม hydrophobicity ของเชื้อที่ทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมใน DMSO (C_{DMSO}) โดยพบว่าสารสกัดจากขมิ้นชันที่สกัดด้วย ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ และ ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ มีผลมากที่สุด โดยเฉพาะทำให้เชื้อ *E. coli* ทั้ง 10 ไอโซเลท มีค่า hydrophobicity เพิ่มขึ้นทุกตัว และยังทำให้ *Salmonella* sp. 3 ไอโซเลท จาก 5 ไอโซเลท มีค่า hydrophobicity เพิ่มขึ้น รองลงมาคือ สารสกัดจากขมิ้นชันที่สกัดด้วย petroleum ether และ chloroform ตามลำดับ สำหรับผลของสารสกัดจากขมิ้นชันทั้ง 4 ชนิดต่อเชื้อชุดควบคุมพบว่าสารสกัดจากขมิ้นชันทั้ง 4 ชนิดมีแนวโน้มทำให้ hydrophobicity ของเชื้อเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตาราง 8

ตาราง 5 ค่า SAT titer และ SAT aggregative group ของเชื้อที่แยกได้จากมูลลูกสุกรท้องร่วง เชื้อควบคุมและผลของสารสกัดจากขมิ้นชันต่อค่า SAT titer และ SAT aggregative group

ชนิดเชื้อ	ขมิ้นชัน														ชนิดเชื้อ
	SAT titer							SAT aggregative group							
	C_{DMSO}	Pet*	Chlo*	95%e*	50%e*	C_{H2O}	H_2O**	C_{DMSO}	Pet	Chlo	95%e	50%e	C_{H2O}	H_2O	
E. coli															***E. coli***
3198/2	>1.5	>1.5	>1.5	0.25	0.25	>1.5	>1.5	N	N	N	H	H	N	N	3198/2
3205/3				0.05											3205/3
3206/3		0.25							H						3206/3
3207/1		0.75				1.5			L				L		3207/1
231/1		>1.5		0.25					N						231/1
240/1		0				0			H/A				H/A		240/1
1088/1				0.05		>1.5							N		1088/1
1088/2		>1.5							N						1088/2
1089/1				0.25											1089/1
3733/1			1.5	0.05						L					3733/1
***Salmonella* sp.**															***Salmonella* sp.**
Sal 5	>1.5	0.75	>1.5	0.05	0.5	1.5	>1.5	N	L	N	H	L	L	N	Sal 5
Sal 8	1.5	0			0.25		1.5	L	H/A			H		L	Sal 8
Sal 32	>1.5	0.5	1.5			0.25		N	L	L			H		Sal 32
Sal 35	0.05	0.05	0.05		0.05	0.05	0.25	H	H	H				H	Sal 35
Sal 51			0.5				0.05			L					Sal 51
E. cloacae															***E. cloacae***
ECC 1	0.05	0.05	0.5	0.05	0.05	0.05	0.05	H	H	L	H	H	H	H	ECC 1
ECC 2			>1.5							N					ECC 2
ECC 3	>1.5	0.25			0.25	0.25	>1.5	N						N	ECC 3
Control															**Control**
E. coli ATCC 25922	>1.5	0.5	1.5	0.05	0.25	0.25	>1.5	N	L	L	H	H	H	N	*E. coli* ATCC 25922
Salmonella B		0.05	>1.5			1.5			H	N			L		*Salmonella* B
S. sonnei		>1.5	>1.5			0.25			N	N			H		*S. sonnei*
S. aureus ATCC 25923		0.05	0.25			0			H	H			H/A		*S. aureus* ATCC 25923

หมายเหตุ : H/A คือ Autoaggregative (เกิดการเกาะกลุ่มในหลุมควบคุม, SAT titer = 0 M) H คือ Highly aggregative (มี SAT titer 0.05 และ 0.25 M)

N คือ Nonaggregative (ไม่เกิดการเกาะกลุ่มที่ ammonium sulfate 1.5 M, SAT titer >1.5 M)

L คือ Low aggregative (มี SAT titer 0.5-1.5 M) * ความเข้มข้นที่ทดสอบ 4 mg/ml ** ความเข้มข้นที่ทดสอบเท่ากับค่า MIC

		C_{H2O}	H_2O	C_{DMSO}	Pet	Chlo	EtOH 95%	EtOH 50%
	Aggregative in Pp buffer	E @			EE S			
High aggregative	0.05 M	CC SS	SCC	SS CC	SSCC #@	S	EEEEEE SSSSS CCC A#&@	SSS CC
High aggregative	0.25 M	AC & S	S		EC	@	EEEE	EEEEE EEEEE SSC A#&@
Low aggregative	0.5 M				SA	SC		
Low aggregative	0.75 M				ES			
Low aggregative	1.5 M	EE SS #	SS	S		ES A		
Non aggregative	>1.5 M	EEEEE EE	EEEEE EEEEE SCA#&@	EEEEE EEEEE SSCA#& @	EEEEEE &	EEEEEE EEE SSCC #&		

ภาพประกอบ 7 SAT assay ของเชื้อแบคทีเรีย เมื่อทดสอบกับสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำ (H_2O) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมด้วยน้ำกลั่น (C_{H2O}) และสารสกัดขมิ้นชันด้วย Petroleum ether (Pet), chloroform (Chlo), ethanol 95% (EtOH 95%) และ ethanol 50% (EtOH 50%) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม DMSO (C_{DMSO})

หมายเหตุ : E = *E. coli* ที่แยกได้ (n= 10) S = *Salmonella* sp. ที่แยกได้ (n= 5)

C = *E. cloacae* ที่แยกได้ (n= 3) A = *E. coli* ATCC 25922 (n= 1)

= *Salmonella* B (n= 1) & = *S. sonnei* (n= 1)

@ = *S. aureus* ATCC 25923 (n= 1)

ตาราง 6 Hydrophobicity ของเชื้อแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากขมิ้นชันที่สกัดด้วยน้ำ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมด้วยน้ำกลั่น

ชนิดเชื้อ (จำนวน)	**ค่า Hydrophobicity**		
	คงเดิม	**เพิ่ม**	**ลด**
E. coli **(10)**	7	0	3
Salmonella **sp. (5)**	3	0	2
E. cloacae **(3)**	2	0	1
E. coli **ATCC 25922 (1)**	0	0	1
Salmonella **B (1)**	0	0	1
S. sonnei **(1)**	0	0	1
S. aureus **ATCC 25923 (1)**	0	0	1

ตาราง 7 Hydrophobicity ของเชื้อแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อทดสอบกับ DMSO เปรียบเทียบกับชุดควบคุมด้วยน้ำกลั่น

ชนิดเชื้อ (จำนวน)	**ค่า Hydrophobicity**		
	คงเดิม	**เพิ่ม**	**ลด**
E. coli **(10)**	7	0	3
Salmonella **sp. (5)**	3	0	2
E. cloacae **(3)**	2	0	1
E. coli **ATCC 25922 (1)**	0	0	1
Salmonella **B (1)**	0	0	1
S. sonnei **(1)**	0	0	1
S. aureus **ATCC 25923 (1)**	0	0	1

ตาราง 8 Hydrophobicity ของเชื้อแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากขมิ้นชันที่สกัดด้วย petroleum ether (Pet), chloroform (Chlo), ethanol 95% (95%e) และ ethanol 50% (50%e) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมใน DMSO

ชนิดเชื้อ (จำนวน)	**ค่า Hydrophobicity**											
	Pet			**Chlo**			**95%e**			**50%e**		
	คงเดิม	**เพิ่ม**	**ลด**	**คงเดิม**	**เพิ่ม**	**ลด**	**คงเดิม**	**เพิ่ม**	**ลด**	**คงเดิม**	**เพิ่ม**	**ลด**
***E. coli* (10)**	6	4	0	9	1	0	0	10	0	0	10	0
***Salmonella* sp. (5)**	2	3	0	2	1	2	2	3	0	2	3	0
***E. cloacae* (3)**	2	1	0	1	0	2	2	1	0	2	1	0
***E. coli* ATCC 25922 (1)**	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
***Salmonella* B (1)**	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
***S. sonnei* (1)**	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
***S. aureus* ATCC 25923 (1)**	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0

4. ผลของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดต่อค่า SAT titer และค่า SAT aggregative group ของเชื้อแบคทีเรีย

จากการทดสอบผลของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดต่อค่า SAT titer และค่า SAT aggregative group ของเชื้อแบคทีเรีย ดังแสดงในตาราง 9 และภาพประกอบ 8 พบว่า เชื้อ *E. coli* ทั้ง 10 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในชั้นน้ำ (ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย) มีค่า SAT titer มากกว่า 1.5 M แปลผลได้ว่าอยู่ในกลุ่ม nonaggregative เชื้อ *Salmonella* sp. มีค่า SAT titer มากกว่า 1.5 และ 0.05 M จัดอยู่ในกลุ่ม nonaggregative และ highly aggregative จำนวน 3 และ 2 ไอโซเลท ตามลำดับ เชื้อ *E. cloacae* มีค่า SAT titer มากกว่า 1.5 และ 0.05 M จัดอยู่ในกลุ่ม nonaggregative และ highly aggregative จำนวน 1 และ 2 ไอโซเลท ตามลำดับ สำหรับเชื้อในชุดควบคุม พบว่า เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 จัดอยู่ในกลุ่ม highly aggregative เชื้อ *Salmonella* B, *S. sonnei* และ *S. aureus* ATCC 25923 มีค่า SAT titer มากกว่า 1.5 M จัดอยู่ในกลุ่ม nonaggregative

จากผลการทดสอบดังกล่าวข้างต้นเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่า SAT aggregative group ของชุดควบคุมในน้ำกลั่นพบว่า เชื้อ *E. coli* มีค่า SAT aggregative group ของเชื้อ 3207/1 และ 231/1 เปลี่ยนแปลงจาก low aggregative ไปเป็น nonaggregative และเชื้อ 240/1 เปลี่ยนแปลงจาก autoaggregative ไปเป็น nonaggregative ซึ่งเป็นการลด hydrophobicity ของเชื้อ โดยมี *E. coli* อีก 7 ไอโซเลท มีค่า SAT aggregative group คงเดิม สำหรับเชื้อ *Salmonella* sp. พบว่ามีจำนวน 2 ไอโซเลท ที่มีค่า SAT aggregative group คงเดิม และพบว่า เชื้อ Sal 5 และ Sal 8 เปลี่ยนแปลงจาก low aggregative ไปเป็น nonaggregative และ Sal 32 เปลี่ยนแปลงจาก highly aggregative ไปเป็น nonaggregative ซึ่งเป็นการลด hydrophobicity ของเชื้อ สำหรับเชื้อ *E. cloacae* ทั้ง 2 ไอโซเลทที่มีค่า SAT aggregative group คงเดิม และอีก 1 ไอโซเลทมีค่า SAT aggregative group เปลี่ยนแปลงจาก highly aggregative ไปเป็น nonaggregative ซึ่งเป็นการลด hydrophobicity ของเชื้อ สำหรับเชื้อในชุดควบคุม พบว่า เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 มีค่า SAT aggregative group คงเดิม เชื้อ *Salmonella* B, *S. sonnei* และ *S. aureus* ATCC 25923 มีค่า SAT aggregative group เปลี่ยนแปลงไป โดยเปลี่ยนแปลงไปในทางลด hydrophobicity ของเชื้อ ดังแสดงในตาราง 10

การทดสอบผลของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่สกัดด้วย petroleum ether, chloroform, ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ และ ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใช้ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อค่า SAT titer ของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดทั้ง 4 ชนิดข้างต้นมีแนวโน้มทำให้ค่า SAT aggregative group เปลี่ยนแปลงไปในทางเพิ่ม hydrophobicity ของเชื้อที่ทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมใน DMSO (C_{DMSO}) ตาราง 5 โดยทำให้เชื้อที่แยกได้จากมูลลูกสุกรจำนวน 15, 13

และ 14 ไอโซเลท ตามลำดับ จาก 18 ไอโซเลท มี hydrophobicity เพิ่มขึ้น โดยพบว่าสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่สกัดด้วย chloroform, ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ และ ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ มีผลมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่สกัดด้วย petroleum ether สำหรับผลของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดทั้ง 4 ชนิดต่อเชื้อ ชุดควบคุมพบว่าสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดทั้ง 4 ชนิดมีแนวโน้มทำให้ hydrophobicity ของเชื้อควบคุมทุกตัวเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตาราง 11

ตาราง 9 ค่า SAT titer และ SAT aggregative group ของเชื้อที่แยกได้จากมูลลูกสุกรท้องร่วง เชื้อควบคุมและผลของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดต่อค่า SAT titer และ SAT aggregative group

ชนิดเชื้อ	เปลือกผลมังคุด															ชนิดเชื้อ
	SAT titer								SAT aggregative group							
	C_{DMSO}	Pet*	Chlo*	95%e*	50%e*	C_{H2O}	H_2O**		C_{DMSO}	Pet	Chlo	95%e	50%e	C_{H2O}	H_2O	
E. coli																***E. coli***
3198/2			0.25	0.05												3198/2
3205/3		>1.5				>1.5				N				N		3205/3
3206/3			0.05	0.25	0.05						H		H			3206/3
3207/1		0.25		0.05		1.5				H		H		L		3207/1
231/1	>1.5	>1.5					>1.5		N	N					N	231/1
240/1		0.25	1.5	0.25	0	0				H	L		H/A	H/A		240/1
1088/1		>1.5		0.05						N						1088/1
1088/2			0.05	0		>1.5					H	H/A		N		1088/2
1089/1		0.25		>1.5	0.05					H		N	H			1089/1
3733/1		0.05	0	0.05							H/A	H				3733/1
***Salmonella* sp.**																***Salmonella* sp.**
Sal 5	>1.5	0.25	0.05	0.05		1.5			N		H	H		L		Sal 5
Sal 8	1.5						>1.5		L						N	Sal 8
Sal 32	>1.5	0.05	0	0	0.05	0.25			N	H	H/A	H/A	H	H		Sal 32
Sal 35	0.05		0.05	0.05		0.05	0.05		H		H	H			H	Sal 35
Sal 51																Sal 51
E. cloacae																***E. cloacae***
ECC 1	0.05	0				0.05	0.05		H	H/A					H	ECC 1
ECC 2		0.05	0.05	0.05	0.05					H	H	H	H	H		ECC 2
ECC 3	>1.5	0.25				0.25	>1.5		N						N	ECC 3
Control																**Control**
E. coli ATCC 25922		0.25				0.25	0.05							H	H	*E. coli* ATCC 25922
Salmonella B	>1.5	0.05	0.05	0.05	0.05	1.5			N	H	H	H	H	L		*Salmonella* B
S. sonnei		0.25				0.25	>1.5							H	N	*S. sonnei*
S. aureus ATCC 25923				0		0						H/A		H/A		*S. aureus* ATCC 25923

หมายเหตุ : H/A คือ Autoaggregative (เกิดการเกาะกลุ่มในหลุมควบคุม, SAT titer = 0 M) H คือ Highly aggregative (มี SAT titer 0.05 และ 0.25 M)

N คือ Nonaggregative (ไม่เกิดการเกาะกลุ่มที่ ammonium sulfate 1.5 M, SAT titer >1.5 M)

L คือ Low aggregative (มี SAT titer 0.5-1.5 M) * ความเข้มข้นที่ทดสอบ 4 mg/ml ** ความเข้มข้นที่ทดสอบเท่ากับค่า MIC

		C_{H2O}	H_2O	C_{DMSO}	Pet	Chlo	EtOH 95%	EtOH 50%
High aggregative	Aggregative in Pp buffer	E @			C	ES	ES@	EE
	0.05 M	SS CC	SSCC A	SS CC	ESSSSC #	EEEEE EESSSS CCC A#&@	EEEEEE SSSS CCC A#&	EEEEE EEE SSSSS CCC A#&@
	0.25 M	AC S &			EEESC A&@	E	EE	
Low aggregative	0.5 M							
	0.75 M							
	1.5 M	EE SS #		S		E		
Non aggregative	>1.5 M	EEEEE EE	EEEEE EEEEE SSSC #&@	EEEEE EEEEE SSCA#& @	EEEEEE		E	

ภาพประกอบ 8 SAT assay ของเชื้อแบคทีเรีย เมื่อทดสอบกับสารสกัดเปลือกผลมังคุดด้วยน้ำ (H_2O) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมด้วยน้ำกลั่น (C_{H2O}) และสารสกัดเปลือกผลมังคุดด้วย Petroleum ether (Pet), chloroform (Chlo), ethanol 95% (EtOH 95%) และ ethanol 50% (EtOH 50%) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม DMSO (C_{DMSO})

หมายเหตุ : E = *E. coli* ที่แยกได้ (n= 10) S = *Salmonella* sp. ที่แยกได้ (n= 5)

C = *E. cloacae* ที่แยกได้ (n= 3) A = *E. coli* ATCC 25922 (n= 1)

= *Salmonella* B (n= 1) & = *S. sonnei* (n= 1)

@ = *S. aureus* ATCC 25923 (n= 1)

ตาราง 10 Hydrophobicity ของเชื้อแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่สกัดด้วยน้ำ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมด้วยน้ำกลั่น

ชนิดเชื้อ (จำนวน)	**ค่า Hydrophobicity**		
	คงเดิม	**เพิ่ม**	**ลด**
E. coli **(10)**	7	0	3
Salmonella **sp. (5)**	2	0	3
E. cloacae **(3)**	3	0	0
E. coli **ATCC 25922 (1)**	1	0	0
Salmonella **B (1)**	0	0	1
S. sonnei **(1)**	0	0	1
S. aureus **ATCC 25923 (1)**	0	0	1

ตาราง 11 Hydrophobicity ของเชื้อแบคทีเรีย ที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่สกัดด้วย petroleum ether (Pet), chloroform (Chlo), ethanol 95% (95%e) และ ethanol 50% (50%e) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมใน DMSO

ชนิดเชื้อ (จำนวน)	**ค่า Hydrophobicity**											
	Pet			**Chlo**			**95%e**			**50%e**		
	คงเดิม	**เพิ่ม**	**ลด**	**คงเดิม**	**เพิ่ม**	**ลด**	**คงเดิม**	**เพิ่ม**	**ลด**	**คงเดิม**	**เพิ่ม**	**ลด**
E. coli **(10)**	6	4	0	0	10	0	1	9	0	0	10	0
Salmonella **sp. (5)**	2	3	0	2	3	0	2	3	0	2	3	0
E. cloacae **(3)**	1	2	0	1	2	0	2	1	0	2	1	0
E. coli **ATCC 25922 (1)**	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
Salmonella **B (1)**	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
S. sonnei **(1)**	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
S. aureus **ATCC 25923 (1)**	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0

จากการทดสอบหาค่า MIC โดยวิธี agar dilution ของสารสกัดจากขมิ้นชันและเปลือกผลมังคุด เป็นการผสมสารสกัดจากสมุนไพรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สารสกัดจากขมิ้นชันหรือเปลือกผลมังคุด กระจายทั่วอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับสารสกัดจากขมิ้นชันหรือเปลือกผลมังคุดที่สกัดด้วย petroleum ether, chloroform, ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ และ ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ ทำการละลายใน DMSO โดยที่ DMSO ความเข้มข้นสูงมีผลต่อการเจริญของ *E. coli* จึงทำการเจือจาง DMSO ในวุ้นอาหารความเข้มข้นต่างๆ พบว่า DMSO ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเตรียมโดย เจือจางในวุ้นอาหารในอัตราส่วน 1:25 ไม่มีผลยับยั้งเชื้อที่ทดสอบ ในการศึกษานี้เตรียมสารสกัดความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำให้สามารถเตรียมวุ้นที่มีสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบได้ความเข้มข้นสูงสุดได้เพียง 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับสารสกัดด้วยน้ำใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย สามารถเจือจางในวุ้นอาหารได้ในอัตราส่วน 1:10 ทำให้ได้ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัด 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผลการทดสอบพบว่า ค่า MIC ที่ได้ของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดที่สกัดด้วย petroleum ether, chloroform, ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ และ ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่มีค่า MIC มากกว่า 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารที่สกัดด้วยน้ำ มีค่า MIC มากกว่า 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งอ่านผลได้ว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทดสอบ ซึ่งตรงข้ามกับสรรพคุณของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดที่ระบุไว้ในตำหรับยาแผนโบราณของไทยที่ระบุว่าเปลือกผลมังคุดและขมิ้นชันสามารถแก้อาการท้องร่วงได้ (สถาบันการแพทย์แผนไทย, 2540) ดังนั้นประสิทธิภาพของสมุนไพรทั้งสองชนิดในการรักษาโรคท้องร่วงอาจไม่ได้เป็นผลมาจากฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยตรงแต่อาจเป็นผลต่อ virulence factor ของเชื้อ ระบบป้องกันตัวเองของร่างกาย เช่น ความสามารถในการเกาะติดของเชื้อกับผนังลำไส้ของ host เป็นต้น ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลของสมุนไพรต่อ hydrophobicity ที่ผิวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย โดย SAT test ที่ดัดแปลงจาก Türi และคณะ (1997) พบว่าสารสกัดจากขมิ้นชันหรือสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่สกัดด้วย petroleum ether, chloroform, ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ และ ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มในการเพิ่ม hydrophobicity ของเชื้อ และสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 2 ที่สกัดด้วยน้ำมีแนวโน้มในการลด hydrophobicity ของเชื้อ โดยสารสกัดจากขมิ้นชันด้วยน้ำทำให้เชื้อที่แยกได้จากมูลลูกสุกรท้องร่วงจำนวน 12 ไอโซเลท จาก 18 ไอโซเลท มี hydrophobicity คงเดิม คิดเป็น 66.66 เปอร์เซ็นต์ และเชื้ออีก 6 ไอโซเลท มี hydrophobicity ลดลง คิดเป็น 33.33 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดด้วยน้ำทำให้เชื้อที่แยกได้จากมูลลูกสุกรท้องร่วงจำนวน 12 ไอโซเลท จาก 18 ไอโซเลท มี hydrophobicity คงเดิม คิดเป็น 66.66 เปอร์เซ็นต์ และเชื้ออีก 6 ไอโซเลท hydrophobicity ลดลง คิดเป็น 33.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Türi และคณะ (1997) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* ของสมุนไพร 4 ชนิดที่ใช้ในการลดอาการผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร แผลติดเชื้อและการอักเสบในระบบทางเดินปัสสาวะ พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อปานกลาง แต่สมุนไพรทั้ง 4 ชนิดมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง cell surface

hydrophobicity ของ *E.coli* การเพิ่ม hydrophobicity ของเชื้อทำให้เชื้อเกิดการเกาะกลุ่มกันทำให้ระบบป้องกันตัวเองของร่างกายสามารถขับเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการท้องร่วงออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น ส่วนการลด hydrophobicity ของเชื้อเป็นการลดความสามารถในการเกาะติดผนังลำไส้ทำให้เชื้อไม่สามารถผ่านเข้าสู่ผนังลำไส้ได้เชื้อจึงถูกขับออกจากร่างกายได้ โดยระบบป้องกันตัวเองของร่างกาย Annuk และคณะ (1999) ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคกระเพาะอาหาร โดยทำการทดสอบกับเชื้อสาเหตุคือ *Helicobacter pylori* พบว่าสมุนไพรที่ใช้ทดสอบไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ แต่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง cell surface hydrophobicity ของเชื้อ นอกจากนี้ Majtan and Majtanova (1998, 2000) ได้ศึกษาผลของยาต้านจุลินทรีย์ เช่น ยากลุ่ม β-lactam และ ciprofloxzacin ในระดับ subinhibitory concentration ต่อ cell surface hydrophobicity ของเชื้อ พบว่า ยาเหล่านี้สามารถยับยั้ง hydrophobicity ของเชื้อได้ จะเห็นได้ว่าการศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรหรือยาต้านจุลินทรีย์ ต่อ cell surface hydrophobicity ของเชื้อ เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาอธิบายประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรหรือยาต้านจุลินทรีย์นั้นๆในการรักษาโรคติดเชื้อต่างๆได้

การทดลองที่ 2 : การศึกษาระดับที่เหมาะสมของเปลือกผลมังคุดและหรือขมิ้นชันต่อการรักษาลูกสุกรท้องร่วงในระยะก่อนหย่านม

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้เปลือกผลมังคุดและหรือขมิ้นชันต่อการรักษาลูกสุกรท้องร่วงในระยะก่อนหย่านม
2. ศึกษาระดับที่เหมาะสมของเปลือกผลมังคุดและหรือขมิ้นชันต่อการรักษาลูกสุกรท้องร่วงในระยะก่อนหย่านม

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัสดุอุปกรณ์

1.1 สมุนไพร
1.2 กระบอกฉีดยา
1.3 ลูกสุกรท้องร่วงพันธุ์ 3 สายเลือด (LRxLWxDR) อายุ 7-14 วัน น้ำหนัก 2-3 กิโลกรัม
1.4 ถุงพลาสติกขนาดเล็ก
1.5 เครื่องชั่งน้ำหนักลูกสุกร
1.6 ถังพลาสติก

1.7 คีมตัดเบอร์หู

1.8 ถุงมือ

1.9 ทิงเจอร์ไอโอดีน

1.10 ชอร์คสี

1.11 ผ้ากันเปื้อน

1.12 รองเท้าบูต

1.13 กรรไกร

1.14 เครื่องเขียนต่างๆ เช่น ปากกา ดินสอ เป็นต้น

2. วิธีการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ประกอบด้วย 10 ทรีตเมนต์ คือ ชุดควบคุม (ใช้ยาปฏิชีวนะโคลิสตินเป็น positive control โดยโคลิสติน 1 มิลลิลิตร มีโคลิสตินซัลเฟต 150,000 ไอ.ยู.) และทรีตเมนต์ร่วมระหว่าง เปลือกผลมังคุดมี 3 ระดับ คือ 0, 800 และ 1000 มิลลิกรัม กับ ขมิ้นชันมี 3 ระดับ คือ 0, 800 และ 1000 มิลลิกรัม ดังตาราง 12 โดยใช้รักษาลูกสุกรท้องร่วงที่อยู่ในระยะก่อนหย่านมโดยเป็นลูกที่เกิดจากพ่อสายพันธุ์เดียวกัน และมาจากแม่สุกรที่ให้ลูกมาแล้ว 2- 5 ครอก โดยในแต่ละทรีตเมนต์จะใช้ลูกสุกร 7 ตัว (ซ้ำ) ต่อ 1 ทรีตเมนต์ ซึ่งจะใช้ลูกสุกรทั้งหมด 70 ตัว ที่มีอายุ 7-14 วัน ซึ่งมีน้ำหนักประมาณ 2-3 กิโลกรัม

วิธีการเลี้ยงดูหลังจากลูกสุกรคลอดในวันแรก ฉีดธาตุเหล็กให้ในวันที่ 3 ตัวละ 2 มิลลิลิตร และฝึกให้ลูกสุกรกินอาหารเมื่ออายุได้ 7 วัน คัดเลือกลูกสุกรท้องร่วงมีอาการถ่ายเหลวเป็นน้ำอยู่ในระดับที่ 3 และ 4 ตามรายงานจัดระดับมูลสุกรท้องร่วงของยุทธนา (2543ข) (ดังแสดงในตาราง 13) ที่มีอายุประมาณ 7-14 วัน มาจำนวน 70 ตัว สุ่มลูกสุกรแบบคละเพศให้ได้รับการรักษาด้วยทรีตเมนต์ที่แตกต่างกันดังตาราง 12 ใช้การรักษาโดยกรอกยาทางปากวันละครั้งช่วงเช้า จนกระทั่งลูกสุกรหายจากอาการท้องร่วงและทำการหย่านมลูกสุกรเมื่อมีอายุได้ 28 วัน วิธีการรักษา ทำการชั่งสมุนไพรตามทรีตเมนต์ต่างๆใส่ถุงพลาสติกขนาดเล็กและทำการปิดถุงให้แน่นเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป เมื่อได้ลูกสุกรท้องร่วงที่ต้องการแล้ว ก่อนป้อนยารักษาทำการบันทึกข้อมูล คือ วันเดือนปีเกิด เพศ พันธุ์ น้ำหนักเริ่มรักษา เกิดจากแม่ที่ให้ลูกครอกที่เท่าไหร่ เป็นต้น จากนั้นทำการสุ่มทรีตเมนต์สมุนไพรเพื่อทำการรักษา โดยใช้กรรไกรตัดถุงสมุนไพรที่เตรียมไว้ของแต่ละทรีตเมนต์ใส่ลงในกระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ที่ตัดปลายกระบอกให้กว้างกว่าเดิมเล็กน้อย โดยใช้นิ้วอุดรูที่ปลายกระบอกฉีดยาเอาไว้เพื่อกันสมุนไพรรั่วออกมา จากนั้นค่อยๆดูดน้ำสะอาดเข้าไปในหลอดประมาณ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้สมุนไพรกระจายในน้ำให้ทั่วจากนั้นจับลูกสุกรอ้าปากแล้วค่อยๆสอดปลายกระบอกฉีดยาเข้าไปโดยใช้ปลายกระบอกกดที่โคนลิ้นแล้วค่อยๆปล่อยยาสมุนไพรเข้าไปอย่างช้าๆจนหมดหลอด คอยสังเกตว่าลูกสุกรกลืนยาหรือไม่

แล้วจึงเอากระบอกฉีดยาออกจากปากลูกสุกร ทำการป้อนวันละครั้งในช่วงเช้าโดยป้อนยาอย่างน้อยเป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน ถ้าไม่หายทำการป้อนยาสมุนไพรต่อถึง 6 วัน ถ้ายังไม่หายก็หยุดทำการรักษา

ตาราง 12 แผนการจัดทรีตเมนต์ต่างๆ

ทรีตเมนต์	ระดับสมุนไพร (มิลลิกรัม)		
	ขมิ้นชัน	เปลือกผลมังคุด	ราคายา(บาท)/1โด๊ส
1	ยาปฏิชีวนะ (positive ชุดควบคุม) 1 ซี.ซี.		0.78
2	0	0	0
3	0	800	0.36
4	0	1000	0.38
5	800	0	0.53
6	800	800	0.60
7	800	1000	0.61
8	1000	0	0.59
9	1000	800	0.65
10	1000	1000	0.67

หมายเหตุ : ทรีตเมนต์ที่ 3-10 ประกอบด้วยสมุนไพรเสริมด้วยผงเกลือแร่ ORS 500 มิลลิกรัม และหญ้าหวานบดละเอียด 10%

: ขมิ้นชันราคา 256 บาท/กิโลกรัม, เปลือกผลมังคุด 44.96 บาท/กิโลกรัม, ผงเกลือแร่ ORS 500 มิลลิกรัม ราคา 0.298 บาท และหญ้าหวานราคา 350 บาท/ กิโลกรัม

3. การจดบันทึกข้อมูล

3.1 ทำการบันทึกน้ำหนักเริ่มรักษา อายุเริ่มรักษาและชั่งน้ำหนักลูกสุกรที่เปลี่ยนแปลงทุกสัปดาห์ที่ 14, 21 และ 28 วัน

3.2 ให้คะแนนลักษณะมูลสุกรที่ท้องร่วงและมูลสุกรปกติในระหว่างการศึกษาทดลอง ดังแสดงในตาราง 13

3.3 ให้คะแนนลักษณะบริเวณทวาร แบ่งออกเป็น 3 ระดับดังแสดงในตาราง 14

3.4 บันทึก วันที่คลอด วันที่เริ่มรักษา จำนวนวันที่รักษาหาย

ตาราง 13 ระดับการให้คะแนนลักษณะมูลลูกสุกรท้องร่วงและมูลลูกสุกรปกติ

ระดับ	ลักษณะมูล	ระบบการขับถ่าย
0	แข็งเป็นเม็ดสีดำหรือสีน้ำตาล	ท้องผูก
1	อ่อนเป็นก้อนสีดำหรือสีน้ำตาล	ปกติ
2	อ่อนเหลวสีดำหรือครีมเข้ม	เริ่มท้องร่วง
3	เหลวมีเนื้ออุจจาระมากสีดำหรือครีมจาง	ท้องร่วง
4	เหลวเป็นน้ำมีเนื้ออุจจาระน้อยสีเทาหรือครีมจาง	ท้องร่วงรุนแรง

ที่มา : ยุทธนา (2543ข)

ตาราง 14 ระดับการให้คะแนนลักษณะบริเวณทวารของลูกสุกรท้องร่วงและมูลลูกสุกรปกติ

ระดับ	ลักษณะบริเวณทวาร	ระดับการขับถ่าย
1	สีขาวไม่มีอุจจาระติด	ปกติ
2	สีชมพูมีอุจจาระติด	เริ่มท้องร่วงหรือท้องร่วง
3	สีชมพูเข้มหรือสีแดงมีอุจจาระเหลวติดก้น	ท้องร่วงรุนแรง

ที่มา : ยุทธนา (2543ข)

4. ลักษณะที่ศึกษา

4.1 จำนวนวันที่ใช้ในการรักษาลูกสุกรท้องร่วงระยะก่อนหย่านม

4.2 น้ำหนักเริ่มรักษา อายุเริ่มรักษาลูกสุกรหายป่วยระยะก่อนหย่านม

4.3 น้ำหนักที่อายุ 14, 21 และ 28 วัน

4.4 อัตราการเจริญเติบโตต่อวันในช่วง 14-21 วัน, 21-28 วัน และ 14-28 วัน

4.5 ราคายาต่อ 1 โด๊ส และ ต้นทุนค่ารักษาหาย

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้งหมดมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ส่วนการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ตามรายงานของยุทธนา (2541) โดยใช้โปรแกรม Statistic analysis system ; SAS (1985)

6. สถานที่ทำการวิจัย

ฟาร์มสุกรบริษัท เบทาโกร ภาคใต้จำกัด อำเภอรัตภูมิ จังหวัดสงขลา

ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาการใช้เปลือกผลมังคุดและหรือขมิ้นชันในการรักษาลูกสุกรท้องร่วงระยะก่อนหย่านม แสดงในตาราง 15 โดยเมื่อเริ่มต้นการทดลองนั้น อายุเริ่มรักษาและน้ำหนักเริ่มรักษาของลูกสุกรท้องร่วงในแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

จากตาราง 15 พบว่าลูกสุกรท้องร่วงที่ได้รับเปลือกผลมังคุดและหรือขมิ้นชันในแต่ละทรีตเมนต์รักษาอาการท้องร่วงเปรียบเทียบกับลูกสุกรที่ไม่ได้รับการรักษาโดยป้อนเพียงน้ำเปล่า พบว่า ลูกสุกรที่ได้รับเปลือกผลมังคุดและหรือขมิ้นชันในแต่ละทรีตเมนต์หายจากอาการท้องร่วงและมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันในช่วงอายุ 14-28 วันสูงกว่าลูกสุกรที่ไม่ได้รับการรักษาแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01) ดังนั้น การป้อนเพียงน้ำเปล่าไม่สามารถทำให้ลูกสุกรหายจากอาการท้องร่วงและมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันในช่วงอายุ 14-28 ต่ำกว่าลูกสุกรที่ได้รับการรักษาด้วยสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด และเมื่อเปรียบเทียบการรักษาลูกสุกรท้องร่วงด้วยเปลือกผลมังคุดและหรือขมิ้นชันในแต่ละทรีตเมนต์กับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะโคลิสติน พบว่า การใช้เปลือกผลมังคุดและหรือขมิ้นชันในแต่ละทรีตเมนต์สามารถรักษาอาการท้องร่วงของลูกสุกรหาย ซึ่งให้ผลดีเทียบเท่ากับการใช้ยาปฏิชีวนะโคลิสตินรักษา โดยพบว่าจำนวนวันที่รักษาหายและอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันในช่วงอายุ 14-28 วันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) จากการที่ผลการทดลองเป็นเช่นนี้อธิบายได้ว่า เมื่อลูกสุกรได้รับเชื้อสาเหตุ โดยเฉพาะเชื้อ *E. coli* เชื้อนี้จะสามารถเกาะติดผนังลำไส้โดยรอดพ้นจากระบบ peristalsis ของลำไส้แบคทีเรียใช้ส่วนของ pill ที่อยู่รอบๆตัวของแบคทีเรียเกาะกับ villi ของลำไส้ และเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วโดยไม่รุกล้ำเข้าไปในอวัยวะอื่น เมื่อเชื้อ *E. coli* เพิ่มจำนวนมากขึ้นจะผลิตสารพิษ (toxin) ออกมา สารพิษนี้จะเป็นตัวทำให้เกิดความผิดปกติของระบบ cAMP และ cGMP มีผลทำให้เพิ่มการปล่อยน้ำเข้าสู่ลำไส้เป็นจำนวนมาก ทำให้ร่างกายสูญเสียน้ำและ eletrolyte เป็นจำนวนมาก (อรรณพ, 2533; ประพฤกษ์, 2536; วิไลลักษณ์, 2538; สุชีพ, 2539; วัลลภา, 2541 และ Carr, 1994) ดังนั้นเมื่อทำการให้เปลือกผลมังคุดรักษาอาการท้องร่วงในลูกสุกรผลของเปลือกผลมังคุดซึ่งมีรสฝาด มีฤทธิ์ฝาดสมาน แก้ท้องร่วง แก้บิดมูกเลือด และมีสารแทนนิน (tannin) 8.75-10.5 เปอร์เซ็นต์ (สถาบันการแพทย์แผนไทย, 2540) ซึ่งสารแทนนินนี้จะตกตะกอนโปรตีนที่ผนังลำไส้ ทำให้ผนังลำไส้ตึง บริเวณผนังลำไส้ที่ถูกทำลายจากสารพิษของแบคทีเรียจะถูกตกตะกอน ทำให้มีการปิดบาดแผลและเกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นมาทดแทน ทำให้กลไกท้องร่วงถูกยับยั้ง (วิศิษย์, 2543) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ

ตาราง 15 ผลของระดับเปลือกผลมังคุดและหรือขมิ้นชันต่อการรักษาโรคท้องร่วงในลูกสุกรระยะก่อนหย่านม (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน)

ทรีตเมนต์	ระดับสมุนไพร (มิลลิกรัม/ครั้ง)		อายุเริ่มรักษา (วัน)[ns]	น้ำหนักเริ่มรักษา (กิโลกรัม)[ns]	จำนวนวันที่รักษาหาย (วัน)**	น้ำหนักเมื่ออายุ 14 วัน (กิโลกรัม)**	น้ำหนักเมื่ออายุ 21 วัน (กิโลกรัม)**	น้ำหนักเมื่ออายุ 28 วัน (กิโลกรัม)**
	ขมิ้นชัน	เปลือกผลมังคุด						
1	ยาปฏิชีวนะ colistin p		10.71 ± 1.25	3.27 ± 0.18	3.14 ± 0.35^{a}	4.13 ± 0.13^{a}	5.38 ± 0.12^{a}	7.04 ± 0.15^{a}
2	น้ำเปล่า		10.71 ± 1.25	3.40 ± 0.31	5.86 ± 0.35^{b}	3.54 ± 0.29^{b}	4.10 ± 0.34^{b}	5.11 ± 0.22^{b}
3	0	800	10.57 ± 1.13	3.30 ± 0.31	3.43 ± 0.49^{a}	4.28 ± 0.26^{a}	5.40 ± 0.19^{a}	7.10 ± 0.16^{a}
4	0	1000	10.14 ± 1.21	3.36 ± 0.28	3.57 ± 0.49^{a}	4.26 ± 0.27^{a}	5.38 ± 0.23^{a}	7.07 ± 0.14^{a}
5	800	0	10.14 ± 1.21	3.31 ± 0.25	3.14 ± 0.35^{a}	4.27 ± 0.24^{a}	5.31 ± 0.30^{a}	7.11 ± 0.19^{a}
6	800	800	10.42 ± 1.13	3.27 ± 0.20	3.14 ± 0.35^{a}	4.157 ± 0.33^{a}	5.35 ± 0.31^{a}	7.14 ± 0.25^{a}
7	800	1000	10.42 ± 1.13	3.27 ± 0.20	3.14 ± 0.35^{a}	4.128 ± 0.21^{a}	5.22 ± 0.24^{a}	7.14 ± 0.27^{a}
8	1000	0	10.28 ± 1.28	3.23 ± 0.20	3.28 ± 0.45^{a}	4.11 ± 0.27^{a}	5.33 ± 0.30^{a}	7.18 ± 0.23^{a}
9	1000	800	10.28 ± 1.28	3.36 ± 0.31	3.28 ± 0.45^{a}	4.21 ± 0.19^{a}	5.31 ± 0.23^{a}	7.16 ± 0.17^{a}
10	1000	1000	10.57 ± 1.13	3.43 ± 0.21	3.28 ± 0.45^{a}	4.10 ± 0.18^{a}	5.22 ± 0.19^{a}	7.11 ± 0.17
สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (เปอร์เซ็นต์)			11.96	7.47	12.67	5.93	4.86	2.91

** ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน แสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$)

ns ค่าเฉลี่ยในแถวตั้งเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตาราง 15 (ต่อ)

ทรีตเมนต์	ระดับสมุนไพร (มิลลิกรัม/ครั้ง)		อัตราการเจริญเติบโตต่อวันช่วง14-21 วัน (กรัม)**	อัตราการเจริญเติบโตต่อวันช่วง21-28 วัน (กรัม)**	อัตราการเจริญเติบโตต่อวันช่วง14-28 วัน (กรัม)**	ราคายา (บาท) ต่อ 1 โด๊ส	ต้นทุนค่ารักษาหาย (บาท)
	ขมิ้นชัน	เปลือกผลมังคุด					
1	ยาปฏิชีวนะ colistin p		179.59±11.24^{a}	236.76±16.20^{a}	208.16±4.93^{a}	0.78	2.45
2	น้ำเปล่า		79.59±24.55^{b}	144.90±26.64^{b}	112.24±14.11^{b}	0.00	0.00
3	0	800	159.18±25.33^{a}	242.86±32.99^{a}	201.02±18.64^{a}	0.36	1.23
4	0	1000	161.22±29.41^{a}	240.82±25.33^{a}	201.02±17.21^{a}	0.38	1.36
5	800	0	148.98±35.82^{a}	257.14±40.41^{a}	203.06±12.27^{a}	0.53	1.66
6	800	800	171.43±23.33^{a}	255.10±53.72^{a}	213.26±29.86^{a}	0.60	1.88
7	800	1000	157.14±20.20^{a}	273.47±39.06^{a}	215.30±22.37^{a}	0.61	1.92
8	1000	0	173.47±17.36^{a}	265.31±46.55^{a}	219.39±18.31^{a}	0.59	1.94
9	1000	800	157.14±34.99^{a}	263.27±47.28^{a}	210.20±15.35^{a}	0.65	2.13
10	1000	1000	161.22±29.41^{a}	269.39±35.41^{a}	215.00±15.66^{a}	0.67	2.20
สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (เปอร์เซ็นต์)			16.98	15.52	8.98		

** ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน แสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01)

ns ค่าเฉลี่ยในแถวตั้งเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

จริยาและสมเกียรติ (2532) ที่พบว่า สารสกัดหยาบในเปลือกผลมังคุดจะออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโรคที่เป็นสาเหตุของอาการท้องร่วงได้โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 12.5-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับลูกสุกรท้องร่วงที่ได้รับขมิ้นชันรักษาแล้วทำให้อาการท้องร่วงดีขึ้น เพราะ ขมิ้นชันมีฤทธิ์รักษาอาการท้องอืดท้องเฟ้อ ช่วยขับลม ป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ขับน้ำดี ทำให้การย่อยอาหารดีขึ้น ลดอาการจุกเสียด แก้อาการท้องร่วง แก้บิด ซึ่งสาร curcumin ในขมิ้นชันจะช่วยทำให้การย่อยอาหารดีขึ้น (พเยาว์, 2539) นอกจากลูกสุกรจะหายจากอาการท้องร่วงแล้วขมิ้นชันยังช่วยให้เจริญอาหารทำให้การย่อยอาหารดีขึ้น ทำให้ลูกสุกรไม่มีการสูญเสียน้ำหนักตัวเพราะโรคท้องร่วง แต่จากการทดสอบเบื้องต้นหาค่า MIC โดยวิธี agar dilution ในการทดลองที่ 1 พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่สกัดด้วย petroleum ether, chloroform, ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ และ ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมได้คือ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดด้วยน้ำความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งเชื้อกลุ่ม *E. coli* , *Salmonella* sp., *E. cloacae* และ *Shigella sonnei* ที่ใช้ทดสอบได้เลย แต่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ได้ ซึ่งตรงข้ามกับสรรพคุณของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดที่ระบุไว้ในตำหรับยาแผนโบราณของไทยที่ระบุว่าเปลือกผลมังคุดและขมิ้นชันสามารถแก้อาการท้องร่วงได้ (สถาบันการแพทย์แผนไทย, 2540) และความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่ทดสอบในครั้งนี้มีค่าต่ำกว่าค่า MIC ที่จริยาและสมเกียรติ (2532) รายงานไว้ จึงทำให้ตรวจไม่พบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลของสมุนไพรต่อ hydrophobicity ที่ผิวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย โดย SAT test ที่ดัดแปลงจาก Türi และคณะ (1997) การทดสอบหาค่า SAT titer และ SAT aggregative group นี้จะช่วยอธิบายได้ว่าทำไมสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดไม่สามารถยับยั้งเชื้อกลุ่มที่ทดสอบได้เลยแต่มีผลในการรักษาอาการท้องร่วงในสัตว์ทดลอง โดยพบว่าสารสกัดจากขมิ้นชันและเปลือกผลมังคุดที่สกัดด้วย petroleum ether, chloroform, ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ และ ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มในการเพิ่ม hydrophobicity ของเชื้อทดสอบ และสารสกัดจากขมิ้นชันและเปลือกผลมังคุดที่สกัดด้วยน้ำมีแนวโน้มในการลด hydrophobicity ของเชื้อทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Türi และคณะ (1997) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* ของสมุนไพร 4 ชนิดที่ใช้ในการลดอาการผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร แผลติดเชื้อ และการอักเสบในระบบทางเดินปัสสาวะ พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อปานกลาง แต่สมุนไพรทั้ง 4 ชนิดมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง cell surface hydrophobicity ของ *E. coli* การเพิ่ม hydrophobicity ของเชื้อทำให้เชื้อเกิดการเกาะกลุ่มกันทำให้ระบบป้องกันตัวเองของร่างกายสามารถขับเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการท้องร่วงออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น ส่วนการลด hydrophobicity ของเชื้อเป็นการลดความสามารถในการเกาะติดผนังลำไส้ทำให้เชื้อไม่สามารถผ่านเข้าสู่ผนังลำไส้ได้เชื้อจึงถูกขับออกจากร่างกายได้ โดยระบบป้องกันตัวเองของร่างกาย Annuk และคณะ (1999) ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคกระเพาะอาหาร โดยทำการทดสอบกับเชื้อสาเหตุคือ *Helicobacter pylori*

พบว่าสมุนไพรที่ใช้ทดสอบไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ แต่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง cell surface hydrophobicity ของเชื้อ นอกจากนี้ Majtan and Majtanova (1998, 2000) ได้ศึกษาผลของยาต้านจุลชีพ เช่น ยากลุ่ม β-lactam และ ciprofloxzacin ในระดับ subinhibitory concentration ต่อ cell surface hydrophobicity ของเชื้อ พบว่า ยาเหล่านี้สามารถยับยั้ง hydrophobicity ของเชื้อได้ จะเห็นได้ว่าการศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรหรือยาต้านจุลินทรีย์ต่อ cell surface hydrophobicity ของเชื้อ เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาอธิบายประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรหรือยาต้านจุลินทรีย์นั้นๆในการรักษาโรคติดเชื้อต่างๆได้

จากการทดลองพบว่าผลการรักษาอาการท้องร่วงในลูกสุกรโดยใช้เปลือกผลมังคุดและหรือขมิ้นชันให้ผลดีเทียบเท่าการใช้ยาปฏิชีวนะรักษา เมื่อพิจารณาต้นทุนค่ายาสมุนไพรเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะต่อ 1 โด๊ส พบว่ายาสมุนไพรทุกทรีตเมนต์มีต้นทุนค่ารักษาหายและราคายาถูกกว่ายาปฏิชีวนะ โดยทรีตเมนต์ที่ 3 ซึ่งมีเปลือกผลมังคุด 800 มิลลิกรัม มีราคาถูกที่สุด คือ 0.36 บาท

การทดลองที่ 3 : ผลของการเสริมเปลือกผลมังคุดและหรือขมิ้นชันในอาหารต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของลูกสุกรระยะหลังหย่านม

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาระดับที่เหมาะสมของเปลือกผลมังคุดและหรือขมิ้นชันเมื่อเสริมลงในอาหารลูกสุกรเพื่อเพิ่มสมรรถภาพการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของลูกสุกรหลังหย่านม
2. เปรียบเทียบต้นทุนค่าอาหารในการเลี้ยงลูกสุกรหลังหย่านมเมื่อเสริมเปลือกผลมังคุดและหรือขมิ้นชัน

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัสดุอุปกรณ์

1.1 สมุนไพร

1.2 ลูกสุกรพันธุ์สามสายเลือด (DR x LR x LW) ที่หย่านม 28 วัน คละเพศ ที่มีน้ำหนักประมาณ 7-8 กิโลกรัม มาจำนวน 42 ตัว

1.3 อาหารทดลองของลูกสุกรระยะหลังหย่านม

1.4 คอกเลี้ยงลูกสุกรแบบขังเดี่ยว

1.5 ถังใส่อาหารทดลอง

1.6 เครื่องผสมอาหารลูกสุกรทดลอง

1.7 ช้อนตักอาหารทดลอง

1.8 เครื่องชั่งน้ำหนักลูกสุกรทดลอง

1.9 กรงชั่งน้ำหนักลูกสุกรทดลอง

2. วิธีการทดลอง

นำระดับสมุนไพรเดี่ยวมาชนิดละ 1 ระดับ และสมุนไพรผสมมา 2 ระดับ ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 โดยดูจากอัตราการเจริญเติบโตจากตาราง 15 รวม 4 สูตร เพื่อนำมาเสริมลงในสูตรอาหารให้ลูกสุกรกินโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่สมุนไพรและกลุ่มที่ใส่ยาปฏิชีวนะ CSP ซึ่งจะประกอบด้วย 6 ทรีตเมนต์ แสดงในตาราง 16 โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD โดยคัดเลือกลูกสุกรพันธุ์สามสายเลือด (DR x LR x LW) ที่หย่านม 28 วัน คละเพศ ที่มีน้ำหนักประมาณ 7-8 กิโลกรัม มาจำนวน 42 ตัว ซึ่งแต่ละทรีตเมนต์จะใช้ลูกสุกรจำนวน 7 ตัว

ตาราง 16 สูตรอาหารมาตรฐานที่เสริมเปลือกผลมังคุดและหรือขมิ้นชันในระดับต่างๆ

ทรีตเมนต์	**ระดับสมุนไพร**
T1	สูตรควบคุม (ไม่ใส่สมุนไพรและยาปฏิชีวนะ)
T2	ยาปฏิชีวนะ CSP 0.10%
T3	ขมิ้นชัน 0.15%
T4	เปลือกผลมังคุด 0.10%
T5	ขมิ้นชัน 0.15% + เปลือกผลมังคุด 0.10%
T6	ขมิ้นชัน 0.15% + เปลือกผลมังคุด 0.15%

หมายเหตุ : CSP 1 กิโลกรัม ประกอบด้วย Chlortetracycline 80 กรัม, Sulfadimidine 80 กรัม และ Procaine Penicillin G 40 กรัม

การเตรียมอาหารทดลอง ในการทดลองครั้งนี้ใช้อาหารสูตรสำหรับสุกรเล็กดังแสดงในตาราง 17 และคุณค่าทางโภชนะของสูตรอาหารทดลอง ขมิ้นชันบดแห้ง เปลือกผลมังคุดบดแห้ง ได้วิเคราะห์ด้วยวิธี proximate analysis ตามรายงานของ เสาวนิต (2537) แสดงในตาราง 18

ตาราง 17 ส่วนประกอบและปริมาณของวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้ในสูตรอาหารมาตราฐานสุกรระยะหลังหย่านม

รายการ	**ปริมาณวัตถุดิบ (%)**
ปลายข้าวนึ่ง	30.25
ข้าวโพดบด	28.90
ปลาป่น	8.00
กากถั่วเหลือง	15.25
ถั่วเหลืองไขมันสูง	10.00
แอล-ไลซีน	0.30
หางนมผง	6.00
เปลือกหอย	0.70
VMP3 (ไวตามิน, แร่ธาตุ, พรีมิกซ์)	0.60

ตาราง 18 โภชนะในอาหารสุกรระยะหลังหย่านม เปลือกผลมังคุด และขมิ้นชันที่ได้จากการวิเคราะห์ทางเคมีโดยวิธี proximate analysis (air dry basis)

โภชนะ(เปอร์เซ็นต์)	อาหารสูตรมาตราฐาน	ขมิ้นชัน	เปลือกผลมังคุด
โปรตีน	21.49	7.91	2.58
ไขมัน	4.43	9.39	6.50
เยื่อใย	2.57	5.64	24.31
ความชื้น	7.85	11.57	8.13
เถ้า	5.51	12.55	4.08
แคลเซียม	0.89	0.22	0.13
ฟอสฟอรัส	0.53	0.41	0.06
ราคา (บาท/กิโลกรัม)	10.77	256.00	44.96

3. การจัดการเลี้ยงดูและบันทึกข้อมูล

เลี้ยงสุกรในกรงขังเดี่ยวขนาดกว้าง 75 เซนติเมตร ยาว 150 เซนติเมตร พื้นแบบตาข่ายลวดถัก จัดให้สุกรกินอาหารตลอดเวลา (แบบเต็มที่) โดยแบ่งให้กินตอนเช้า เที่ยง และเย็น ทำการชั่งปริมาณอาหารที่กินทุกสัปดาห์ สำหรับน้ำจะมีให้กินตลอดเวลา ทำการชั่งน้ำหนักสุกรเมื่อเริ่มทดลองและทุกสัปดาห์ ตลอดการทดลอง สุกรจะได้รับการฉีดวัคซีนตามโปรแกรมและมีการเลี้ยงดูตามปกติทั่วไป

4. ลักษณะที่ศึกษา

4.1 อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average daily gain : ADG) ของลูกสุกรระยะหลังหย่านม
4.2 ปริมาณอาหารที่กินระยะหลังหย่านม
4.3 ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed conversion ratio : FCR) ของลูกสุกรหลังหย่านม
4.4 ต้นทุนค่าอาหาร

5. การวิเคราะห์ทางเคมี

วิเคราะห์หาโภชนะต่างๆในสมุนไพรและในสูตรอาหารที่ใช้ทดลองซึ่งได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้าแคลเซียม ฟอสฟอรัส โดยวิธี proximate analysis ตามรายงานของ เสาวนิต (2537)

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้งหมดมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ส่วนการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ตามรายงานของยุทธนา (2541) โดยใช้โปรแกรม Statistic analysis system ; SAS (1985)

7. สถานที่ทำการวิจัย

ฟาร์มสุกร บริษัท เบทาโกรภาคใต้ จำกัด อำเภอรัตภูมิ จังหวัดสงขลา

ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลของการเสริมเปลือกผลมังคุดและหรือขมิ้นชันในอาหารต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของลูกสุกรระยะหลังหย่านม แสดงในตาราง 19 โดยเมื่อเริ่มต้นการทดลองนั้น น้ำหนักเริ่มทดลองและน้ำหนักสิ้นสุดการทดลองของลูกสุกรระยะหลังหย่านมในแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยลูกสุกรมีน้ำหนักเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 8 กิโลกรัม และเมื่อสิ้นสุดการทดลองเมื่อลูกสุกรน้ำหนักประมาณ 25 กิโลกรัม

ตาราง 19 ผลของระดับเปลือกผลมังคุดและหรือขมิ้นชันในอาหารต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของลูกสุกรระยะหลังหย่านม (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน)

ทรีตเมนต์	**ระดับสมุนไพร (เปอร์เซ็นต์)**		**น้ำหนักเริ่มต้น (กิโลกรัม)^{ns}**	**น้ำหนักสิ้นสุดการทดลอง (กิโลกรัม)^{ns}**	**ปริมาณอาหารที่กินตลอดการทดลองต่อตัว (กิโลกรัม)^{ns}**	**ปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อวัน กรัม/ตัว/วัน****
	ขมิ้นชัน	**เปลือกผลมังคุด**				
1	อาหารสูตรมาตราฐาน (สูตรควบคุม)		8.06±0.99	25.28±2.05	25.04±2.04	760.82±33.22^{a}
2	อาหารสูตรมาตราฐาน +ยาปฏิชีวนะ		8.01±0.91	25.61±0.90	25.13±1.79	764.08±32.53^{a}
3	0.15	0	8.04±0.85	25.96±1.46	27.41±2.29	833.06±39.68^{b}
4	0	0.10	8.03±1.04	25.74±1.14	25.43±2.44	771.84±30.26^{a}
5	0.15	0.10	8.01±0.85	25.88±1.82	26.77±2.81	786.53±41.16^{a}
6	0.15	0.15	8.03±0.82	26.00±1.35	26.81±1.13	766.12±32.22^{a}
สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (เปอร์เซ็นต์)			11.38	5.85	8.25	4.49

** ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน แสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$)

ns ค่าเฉลี่ยในแถวตั้งเดียวกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาวสถิติ ($P>0.05$)

ตาราง 19 (ต่อ)

ทรีตเมนต์	ระดับสมุนไพร (เปอร์เซ็นต์)		อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (กรัม)[ns]	ประสิทธิภาพการใช้อาหาร**	ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)[ns]	ต้นทุนค่าอาหารต่อน้ำหนักเพิ่ม 1 กิโลกรัม (บาท)
	ขมิ้นชัน	เปลือกผลมังคุด				
1	อาหารสูตรมาตราฐาน (สูตรควบคุม)		522.86±32.49	1.457±0.058[bc]	33.0±3.42	15.70±0.62
2	อาหารสูตรมาตราฐาน +ยาปฏิชีวนะ		544.08±26.33	1.428±0.057[c]	33.0±3.42	15.44±0.62
3	0.15	0	543.27±22.34	1.534±0.045[a]	33.0±3.42	17.10±0.50
4	0	0.10	538.37±31.34	1.436±0.054[c]	33.0±3.42	15.53±0.58
5	0.15	0.10	525.30±31.57	1.498±0.030[ab]	34.0±2.65	16.77±0.34
6	0.15	0.15	513.47±18.93	1.492±0.044[ab]	35.0±0.0	16.74±0.49
สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (เปอร์เซ็นต์)			5.20	3.33	8.93	

** ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวตั้งเดียวกัน แสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$)

ns ค่าเฉลี่ยในแถวตั้งเดียวกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาวสถิติ ($P>0.05$)

1. ปริมาณอาหารที่กิน

จากตาราง 19 พบว่า ปริมาณอาหารที่กินต่อตัวตลอดการทดลองของแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) แต่พบว่าปริมาณอาหารที่กินต่อตัวต่อวันของทรีตเมนต์ที่ 3 ซึ่งเสริมขมิ้นชัน 0.15 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารสูตรมาตราฐาน ทำให้ลูกสุกรกินอาหารได้เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01) สำหรับอาหารสูตรมาตราฐานที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะ CSP (Chlortetracycline, Sulfadimidine, Procaine Penicillin G) (ทรีตเมนต์ที่ 2) เปลือกผลมังคุด 0.10 เปอร์เซ็นต์ (ทรีตเมนต์ที่ 4) ขมิ้นชัน+เปลือกผลมังคุด (0.15:0.10, ทรีตเมนต์ที่ 5) ขมิ้นชัน+เปลือกผลมังคุด (0.15:0.15, ทรีตเมนต์ที่ 6) พบว่าปริมาณการกินได้ของลูกสุกรไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) จากผลการทดลองอธิบายได้ว่าลูกสุกรที่ได้รับอาหารสูตรมาตราฐานผสมขมิ้นชัน 0.15 เปอร์เซ็นต์ (ทรีตเมนต์ที่ 3) และอาหารใน ทรีตเมนต์ 5 และ 6 ซึ่งมีส่วนผสมของขมิ้นชันอยู่ด้วยจะมีปริมาณการกินได้มากกว่าสูตรอื่นๆที่ไม่ได้ผสมขมิ้นชัน (ทรีตเมนต์ที่ 1, 2 และ 4 ตามลำดับ) เป็นเพราะว่าขมิ้นชันมีสรรพคุณในการลดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ช่วยขับลมในกระเพาะอาหาร เพิ่มการหลั่ง mucin ช่วยขับน้ำดี และยังมีกลิ่นหอมช่วยให้เจริญอาหาร (พเยาว์, 2539) สรรพคุณของขมิ้นชันต่างๆเหล่านี้ช่วยให้สุกรกินอาหารได้เพิ่มขึ้น

2. อัตราการเจริญเติบโต

จากตาราง 19 พบว่าลูกสุกรในแต่ละกลุ่มมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) อธิบายได้ว่าลูกสุกรที่ได้รับอาหารแต่ละสูตรได้รับโภชนะจากอาหารอย่างเพียงพอในระดับที่เท่าๆกัน จึงทำให้ลูกสุกรมีอัตราการเจริญเติบโตต่อวันไม่แตกต่างกัน แม้ว่าลูกสุกรที่ได้รับอาหารในทรีตเมนต์ที่ 3 (ขมิ้นชัน 0.15 เปอร์เซ็นต์) จะมีปริมาณอาหารที่กินสูงกว่าลูกสุกรที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆก็ตาม

3. ประสิทธิภาพการใช้อาหาร

จากตาราง 19 พบว่าลูกสุกรที่ได้รับอาหารทรีตเมนต์ที่ 3 มีประสิทธิภาพการใช้อาหารเลวที่สุด (1.533) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01) กับอาหารสูตรมาตราฐาน (ทรีตเมนต์ที่ 1) อาหารสูตรมาตราฐานที่ผสมกับยาปฏิชีวนะ CSP (ทรีตเมนต์ที่ 2) และเปลือกผลมังคุด 0.10 เปอร์เซ็นต์ (ทรีตเมนต์ที่ 4) แต่ประสิทธิภาพการใช้อาหารของลูกสุกรที่ได้รับอาหารในทรีตเมนต์ที่ 3 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) กับ ทรีตเมนต์ที่ 5 (ขมิ้นชัน+เปลือกผลมังคุด, 0.15 : 0.10) และทรีตเมนต์ที่ 6 (ขมิ้นชัน+เปลือกผลมังคุด, 0.15 : 0.15) โดยพบว่าอาหารสูตรมาตราฐานที่ผสมกับ ยาปฏิชีวนะ CSP (ทรีตเมนต์ที่ 2) มีประสิทธิภาพการใช้อาหารดีที่สุด (1.428) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ (P>0.05) กับอาหารสูตรมาตราฐาน (ทรีตเมนต์ที่ 1)และเปลือกผลมังคุด 0.10 เปอร์เซ็นต์ (ทรีตเมนต์ที่ 4) จากผลการทดลองอธิบายได้ว่า ลูกสุกรที่ได้รับอาหารสูตรมาตราฐานผสมขมิ้นชัน 0.15 เปอร์เซ็นต์

(ทรีตเมนต์ที่ 3) และอาหารในทรีตเมนต์ 5 และ 6 ซึ่งมีส่วนผสมของขมิ้นชันอยู่ด้วยจะมี ประสิทธิภาพการใช้อาหารเลวกว่าสูตรอื่นๆ เป็นเพราะว่า ขมิ้นชันมีสรรพคุณในการลดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ช่วยขับลมในกระเพาะอาหาร เพิ่มการหลั่ง mucin ช่วยขับน้ำดี และยังมีกลิ่นหอมช่วยให้ เจริญอาหาร (พเยาว์, 2539) สรรพคุณของขมิ้นชันต่างๆเหล่านี้ช่วยให้สุกรกินอาหารได้เพิ่มขึ้น เพราะ ขมิ้นชันจะช่วยในการขับลมในกระเพาะอาหารลดอาการท้องอืดท้องเฟ้อ ทำให้ปริมาตรในกระเพาะอาหารเพิ่มขึ้นส่งผลให้ลูกสุกรสามารถกินอาหารได้เพิ่มขึ้น ทำให้อัตราการไหลผ่านของอาหารในระบบทางเดินอาหารเร็วขึ้น จึงทำให้ประสิทธิภาพการย่อยอาหารลดลง ทำให้อาหารเหล่านั้นถูกขับถ่ายออกมาโดยเปล่าประโยชน์ ดังนั้นเมื่อคิดเป็นประสิทธิภาพการใช้อาหารจึงพบว่า อาหารที่มีส่วนผสมของขมิ้นชันอยู่ด้วยจะมีประสิทธิภาพการใช้อาหารเลวกว่าสูตรอื่นๆ ที่ไม่ได้ผสมขมิ้นชัน (ทรีตเมนต์ที่ 1, 2 และ 4 ตามลำดับ) สำหรับลูกสุกรที่ได้รับอาหารสูตรมาตราฐานที่ผสมกับยาปฏิชีวนะ CSP (ทรีตเมนต์ที่ 2) มีประสิทธิภาพการใช้อาหารดีที่สุดเท่ากับ 1.428 แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) กับลูกสุกรที่ได้รับอาหารสูตรมาตราฐาน (ทรีตเมนต์ที่ 1) และ อาหารสูตรมาตราฐานผสมเปลือกผลมังคุด 0.10 เปอร์เซ็นต์ (ทรีตเมนต์ที่ 4) อาจเป็นเพราะว่า ลูกสุกรอยู่ในภาวะที่สมบูรณ์ ไม่ได้รับผลกระทบจากความเครียด หรือภาวะเหนี่ยวนำอื่นๆที่จะส่งผลเสียต่อสุขภาพ อัตราการเจริญเติบโต จึงทำให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารของลูกสุกรที่ได้รับอาหารทรีตเมนต์ที่ 2 และ 4 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) กับลูกสุกรที่ได้รับอาหารสูตรมาตราฐาน

4. ระยะเวลาการเลี้ยง

จากตาราง 19 พบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงของลูกสุกรที่ได้รับอาหารในแต่ละสูตร (ทรีตเมนต์) ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงตั้งแต่น้ำหนักเริ่มต้นประมาณ 8 กิโลกรัม จนถึงน้ำหนักประมาณ 25 กิโลกรัม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

5. ต้นทุนค่าอาหารต่อน้ำหนักเพิ่ม 1 กิโลกรัม

จากตาราง 19 พบว่าต้นทุนค่าอาหารต่อน้ำหนักเพิ่ม 1 กิโลกรัม ของลูกสุกรที่ได้รับอาหารทรีตเมนต์ที่ 2 (อาหารสูตรมาตราฐานที่ผสมกับยาปฏิชีวนะ CSP) มีต้นทุนค่าอาหารต่อน้ำหนักเพิ่ม 1 กิโลกรัม ถูกที่สุด คือ 15.44 บาท