

ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อในหลอดทดลองของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อ  
*Streptococcus agalactiae* ที่แยกได้จากปลานิล

In Vitro Inhibition Efficacy of Thai Herbal Extracts Against  
*Streptococcus agalactiae* Isolated from Nile Tilapia

ลลิตา นาคอุบอน<sup>1</sup>, ชนกันต์ จิตมนัส<sup>1</sup> อุดมลักษณ์ สมพงษ์<sup>1</sup> ชาติชาย โชนงนุช<sup>2</sup> และ จิราพร โรจน์ทินกร<sup>1\*</sup>

Lalita Nakhubon<sup>1</sup> Chanagun Chitmanat<sup>1</sup> Udomluk Sompong<sup>1</sup> Chartchai Khanongnuch<sup>2</sup>

and Jiraporn Rojtinakorn<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

<sup>2</sup>คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50100

<sup>1</sup>Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Chiangmai 50290

<sup>2</sup>Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University, Chiangmai 50100

\*Corresponding author: [jiraroj@mju.ac.th](mailto:jiraroj@mju.ac.th)

Received: Jun. 14, 2022

Revised: Jun. 15, 2022

Accepted: Aug. 11, 2022

**บทคัดย่อ**

เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Streptococcus agalactiae* เป็นเชื้อก่อโรคสำคัญที่มีการระบาดอย่าง ต่อเนื่องและทำให้เกิดความสูญเสียสูงในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เกษตรกรมีการใช้ยาปฏิชีวนะในปริมาณสูง และส่งผลกระทบต่อผลิตภัณฑ์ประมง สมุนไพรจึงเป็นทางเลือกที่สำคัญ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ ในหลอดทดลอง (in vitro test) ของสารสกัดสมุนไพรไทยด้วยวิธี agar disc diffusion โดยใช้สารสกัดหยาบ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากสมุนไพรไทยจำนวน 15 ชนิด ได้แก่ กระเทียม (หัว) กระชาย (เหง้า) กากแฟ (ใบ) ชิง (เหง้า) ข่อย (ใบ) มะลิ (ใบ) แดงกวา (ใบ) ยางพารา (ใบ) บัวบก (ใบ) ชะพลู (ใบ) พญาคาว (ใบ) สะระแหน่ (ใบ) ฝรั่ง (ใบ) ทับทิม (เปลือก) และหูกวาง (ใบ) ผลการศึกษาพบว่าสาร สกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งได้ดี เรียงตามลำดับจากมากไปน้อย คือ ใบหูกวาง เปลือกทับทิม และใบฝรั่ง โดยมีค่า inhibition zone เท่ากับ  $15.33 \pm 3.21$ ,  $14.83 \pm 0.76$  และ  $9.33 \pm 0.58$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ค่าความ เข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) เท่ากับ 2.5, 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) เท่ากับ 5.0, 10.0 และ 10.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สรุปได้ว่าสารสกัดสมุนไพรไทย 3 ชนิดนี้สามารถต่อต้านเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลในงานวิจัยนี้ ได้ดี ซึ่งมีแนวโน้มพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสเตรปโตคอคโคซิสต่อไปได้ โดยนำไปศึกษา เปรียบเทียบฤทธิ์ต่อ *S. agalactiae* ในปลานิลแหล่งอื่นและสัตว์น้ำชนิดอื่น

**คำสำคัญ :** ปลานิล การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ *Streptococcus agalactiae* สารสกัดสมุนไพร

## Abstract

*Streptococcus agalactiae*, a gram -positive bacteria, is one of the most important pathogens that continuously epidemic and causes high loss in aquaculture. Farmers have to use antibiotics in high doses affecting on undesirable residues in fisheries products. Herbs, then, are the particular choices. This research investigated the antibacterial activity (in vitro test) of Thai herb extract by agar disc diffusion method. The 50  $\mu$ l of crude extracts at concentrations of 20 mg/ml were tested. All 15 herbs were garlic (bulb), galingale (rhizome), coffee (leaf), ginger (rhizome), Siamese rough bush (leaf), jasmine (leaf), cucumber (leaf), para rubber (leaf), Asiatic pennywort (leaf), wildbetal leafbush (leaf), fishwort (leaf), peppermint (leaf), guava (leaf), pomegranate (peel) and Indian almond (leaves). Thai herb extracts showed good bacterial inhibition in descending order such as Indian almond (leaf), pomegranate (pericarp) and guava (leaf) whose their inhibition zones were  $15.33 \pm 3.21$ ,  $14.83 \pm 0.76$  and  $9.33 \pm 0.58$  mm, respectively; minimum inhibitory concentrations (MIC) were 2.5, 2.5 and 5.0 mg/ml, respectively; and minimum bactericidal concentration (MBC) were 5.0, 10.0 and 10.0 mg/ml, respectively. It was concluded that these 3 Thai herbal extracts showed good inhibition to this isolate *S. agalactiae* from Nile tilapia. That could be further developed as a bioproduct against streptococcosis bacteria by comparison study to *S. agalactiae* from other sources of Nile tilapia and aquatic animals.

**Keywords:** Nile tilapia, aquaculture, *Streptococcus agalactiae*, herb extract

## คำนำ

โรคสเตรปโตคอคโคซิสเป็นโรคระบาดที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เกิดจากเชื้อ *Streptococcus* spp. ซึ่งก่อโรคได้ในสัตว์น้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็ม สำหรับปลานิล พบการติดเชื้อได้ทุกระยะ โดยมีการระบาดสูงในระยะขุ่นทั้งในบ่อดินและกระชัง มีการระบาดอย่างต่อเนื่อง ปลานิลป่วยมีตาขุ่นขาวและโปน ไม่ว่ายน้ำ ลอยนิ่ง บางตัวว่ายน้ำควงส่ววน ซ่องซบถ่ายบวมแดง พบระบาดรุนแรงในหน้าร้อน (Yanong and Francis-Floyd, 2002; Suanyuk *et al.*, 2005; Thanomsit and Saowakoon, 2017) *S. agalactiae* เป็นแบคทีเรียสำคัญที่พบในปลานิลป่วยโรคสเตรปโตคอคโคซิส ซึ่งสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ  $\beta$ -haemolytic ทำให้เม็ดเลือดแดงปลาติดเชื้อเสียหาย และพบว่าบางเชื้อที่แยกได้สามารถทนต่อความเค็มสูงถึง 6% จึงไม่สามารถใช้เกลือควบคุมได้ ปลานิลป่วยโรคสเตรปโตคอคโคซิสจึงจะมีอัตราการตายสูงมากกว่า 50% จนถึงตายหมดบ่อ (Duremdez *et al.*, 2004; Suanyuk *et al.*, 2005; Jantawan *et al.*, 2007) ปัจจุบัน *S. agalactiae* มีทั้งหมด 10 ซีโรไทป์ (serotype) แต่ที่พบระบาดในปลานิล ได้แก่ ซีโรไทป์ Ia, Ib, II, III และ IX (Zhang *et al.*, 2018)

เกษตรกรจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อควบคุมและรักษาโรค เมื่อมีการระบาดก็จะใช้ลดการเลี้ยง มีรายงานว่า แนวโน้มใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพิ่มขึ้น โดยคาดว่าจะเพิ่มขึ้น 33% ในปี ค.ศ. 2030 (Schar *et al.*, 2020) ซึ่งอาจจะทำให้เชื้อโรคดื้อยาและมักจะมีการเพิ่มปริมาณยาหรือใช้ยาปฏิชีวนะระดับสูงขึ้น (Jantawan *et al.*, 2007) จากการตรวจสอบยีนดื้อยาในประชากรแบคทีเรียในฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ พบว่า ตัวอย่างจากฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีความหลากหลายของยีนดื้อยาในทุกประเทศ (Watts *et al.*, 2017; Niu *et al.*, 2020) การใช้ยาปฏิชีวนะเกินจำเป็นเช่นนี้ ส่งผลให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เชื้อจุลินทรีย์ดื้อยา ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค เมื่อเกิดการเจ็บป่วยจากเชื้อโรค ไม่สามารถให้ยาปฏิชีวนะรักษาได้ ทำให้มีผู้ป่วยทั่วโลกเสียชีวิตจากสาเหตุเชื้อดื้อยาจำนวนเพิ่มสูงขึ้น

พืชสมุนไพรและสารสกัดสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกที่สำคัญในการใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ เนื่องจากเป็นสารธรรมชาติ มีความปลอดภัยสูง ไม่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำและมนุษย์ และไม่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม (Direkbusarakom *et al.*, 1996; Nascimento *et al.*, 2000; Rojtinakorn, 2012; Chitmanat, 2013; Reverter *et al.*, 2014; Jana *et al.*, 2018; Rahardjo *et al.*, 2022) การใช้สมุนไพรและสารสกัดในสัตว์น้ำ จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน กำจัดอนุมูลอิสระ ลดความเครียด ส่งเสริมการกิน ป้องกันและกำจัดเชื้อก่อโรคได้ทั้งแบคทีเรีย เชื้อราและไวรัส (Rojtinakorn, 2012)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาสารสกัดสมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *Streptococcus agalactiae* ที่แยกได้จากปลานิลป่วยจากฟาร์มเกษตรกร เพื่อเป็นข้อมูลและแนวทางในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สารสกัดสมุนไพรไทยป้องกันและรักษาโรคสเตรปโตคอคโคซิส โดยได้เลือกสมุนไพรที่มีรายงานว่า มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค มีราคาถูกและหาได้ง่ายในท้องถิ่น

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การเตรียมสารสกัดสมุนไพรไทย

เตรียมสารสกัดโดยนำสมุนไพรไทย 15 ชนิด ได้แก่ กระเทียม (หัว) กระชาย (เหง้า) กาแฟ (ใบ) ชিং (เหง้า) ขอย (ใบ) มะลิ (ใบ) แตงกวา (ใบ) ยางพารา (ใบ) บัวบก (ใบ) ชะพลู (ใบ) พลูควา (ใบ) สะระแหน่ (ใบ) ฝรั่ง (ใบ) ทับทิม (เปลือก) และหูกวาง (ใบ) อบแห้งที่ 50-60 องศาเซลเซียสและบดผง นำมาสกัดและทำแห้งด้วยวิธี freeze drying ตามวิธีของ Rojtinakorn and Wangcharoen (2013) แล้วเก็บสารสกัดสมุนไพรไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการทดสอบ

### การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*

ใช้เชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลานิลป่วย (กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ บางเขน กรมประมง) ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปั่นล้างแบคทีเรียด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ ที่ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที รอบละ 15 นาที

ทั้งหมด 3 รอบ จากนั้นเจือจางเชื้อที่ 0.5 McFarland turbidity standard ( $OD_{600} = 0.09 - 0.1$ ) ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml

### การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ

ละลายสารสกัดสมุนไพรแห้งด้วยน้ำกลั่น ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใช้ปริมาตร 50  $\mu$ l หยดลง paper disc ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรโดยวิธี agar disc diffusion ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ สำหรับตัวควบคุมใช้น้ำกลั่น บันทึกผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (inhibition zone) 3 ค่า (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) แล้วหาค่าเฉลี่ย

### การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimal inhibitory concentration, MIC)

หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยวิธี broth macro-dilution ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton broth (MHB) และเจือจางสารสกัดสมุนไพรแบบ 10-fold dilution ทำ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม หลอดที่อาหารเลี้ยงเชื้อใส ที่ความเข้มข้นของสารสกัดต่ำที่สุดเท่ากับค่า MIC

### การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าได้เชื้อ (minimal bactericidal concentration, MBC)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากหลอดการทดสอบ MIC ที่ยังใสทุกหลอด มาเลี้ยงเชื้อแบบ spread plate บนอาหาร MHA แต่ละหลอดทำ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด เท่ากับค่า MBC

### ผลการวิจัย

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธี agar disc diffusion ด้วยสารสกัดสมุนไพรไทย 15 ชนิด ได้แก่ กระเทียม (หัว) กระชาย (เหง้า) กาแฟ (ใบ) ชিং (เหง้า) ข่อย (ใบ) มะลิ (ใบ) แตงกวา (ใบ) ยางพารา (ใบ) บัวบก (ใบ) ชะพลู (ใบ) พญาคาว (ใบ) สะระแหน่ (ใบ) ฝรั่ง (ใบ) ทับทิม (เปลือก) และหนุกวาง (ใบ) พบว่ามีสารสกัดสมุนไพรไทย 3 ชนิดแสดงวงใสการยับยั้ง (inhibition zone) ต่อเชื้อ *S. agalactiae* ได้แก่ ใบหนุกวาง ใบฝรั่ง และเปลือกทับทิม มีค่าเท่ากับ  $15.33 \pm 3.21$ ,  $14.83 \pm 0.76$  และ  $9.33 \pm 0.58$  ตามลำดับ (Figure 1 และ Table 1)

สำหรับค่า MIC พบว่าสารสกัดสมุนไพรไทยใบหนุกวาง เปลือกทับทิมและใบฝรั่ง มีค่าเท่ากับ 2.5, 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนค่า MBC มีค่า 5.0, 10.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 1)

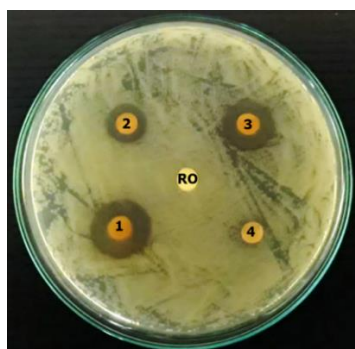


Figure 1 Inhibition zone of Thai herb extracts against *Streptococcus agalactiae*

1= leaf of Indian almond (*Terminalia catappa* L.), 2= leaf of Guava (*Psidium guajava* L., 1753), 3 = pericarp of pomegranate (*Punica granatum* L.), 4 = bulb of garlic (*Allium sativum*) and RO = RO water (solvent)

Table 1 Antibacterial activity of Thai herbal extracts against *Streptococcus agalactiae*

Thai Herbs	Inhibition zone (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
Indian almond (leaf) <i>Terminalia catappa</i> L.	15.33±3.21	2.5	5.0
Pomegranate (peel) <i>Punica granatum</i> L.	14.83±0.76	2.5	10.0
Guava (leaf) <i>Psidium guajava</i> L., 1753	9.33±0.58	5.0	10.0

### วิจารณ์ผล

จากการสกัดสมุนไพรไทยด้วยกระบวนการตามวิธีของ Rojtinakorn and Wangcharoen (2013) แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* พบว่าสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิดที่แสดงการยับยั้งเชื้อได้ดีอย่างชัดเจน มีฤทธิ์ดีเรียงตามลำดับ ได้แก่ ใบหูกวาง เปลือกทับทิมและใบฝรั่ง เมื่อศึกษาข้อมูลจากรายงานวิจัยเกี่ยวกับสารสำคัญที่อยู่ในสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด จะประกอบด้วยสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และแทนนิน (tannins) ดังสรุปใน Table 2 ซึ่งมีรายงานจำนวนมากระบุว่า มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิด ทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก

ผลของสารสกัดใบหูกวางที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลานิลป่วย สอดคล้องกับงานวิจัยที่มีมาก่อนเกี่ยวกับประสิทธิภาพของใบหูกวางในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ ได้แก่ Purivirojkul and Areechon (2006) ได้ทดสอบสารสกัดใบหูกวางด้วยน้ำและเอทานอล 70% และ 95%

ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 6 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* sp., *Edwardsiella tarda*, *Plesiomonas shigelloides* และ *Enterobacter* sp. แบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus* sp. และ *Staphylococcus* sp. พบว่าสารสกัดใบหูกวางทั้ง 3 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ดี Tummarongkongsatit and Rojtinnakorn (2007) ได้ทดสอบสารสกัดจากสมุนไพร 13 ชนิด ด้วยน้ำและเอทานอล 50% พบว่าสารสกัดใบหูกวางมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* และ *V. parahaemolyticus* ได้สูงที่สุด Chansue and Assawawongkasem (2008) ได้ใช้น้ำหมักใบหูกวาง (หมัก 1, 3 และ 7 วัน) พบว่าน้ำหมักที่ 3 และ 7 วันมีค่าแทนนินไม่แตกต่างกัน เมื่อนำน้ำหมักทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 15 ชนิดที่แยกได้จากสัตว์น้ำป่วย พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้งหมด ที่ความเข้มข้น 0.8 - 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร Ko-sing et al. (2018) รายงานว่าน้ำหมักใบหูกวางชนิดผงที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้ง *Aeromonas hydrophila* ได้ดี ส่วน Lusastuti et al. (2017) รายงานว่าการใช้ผงใบเขียวของหูกวางผสมอาหารเลี้ยงปลาชนิด 5-10% ให้กินเป็นเวลา 15 วัน ช่วยเพิ่มอัตราการรอดของปลาชนิดติดเชื้อ *S. agalactiae* ได้อย่างมีนัยสำคัญ

**Table 2** Bioactive compounds and antimicrobial activities of Thai herbal plants

Plants	Bioactive compounds	Antimicrobial activities in Aquaculture
Indian almond (leaf) <i>Terminalia catappa</i> L.	Alkaloids, Flavonoids, Saponins, Phenols, Terpenoids and Tannins (Katikia et al., 2017)	- <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Plesiomonas shigelloides</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Staphylococcus</i> sp. and <i>Streptococcus</i> sp. (Purivirojkul and Areechon, 2006) - <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Vibrio harveyi</i> and <i>V. parahaemolyticus</i> (Tummarongkongsatit and Rojtinnakorn, 2007) - <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>A. sobria</i> , <i>Photobacterium damsela</i> , <i>Pasteurella pneumotropica</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. oryzihabitans</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Vibrio parahemolyticus</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. alginolytica</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>Enterococcus fecalis</i> (Chansue and Assawawongkasem, 2008) - <i>Aeromonas hydrophila</i> (Ko-sing et al., 2018)

Table 2 (Continue)

Plants	Bioactive compounds	Antimicrobial activities in Aquaculture
Pomegranate (peel) <i>Punica granatum</i> L.	Alkaloids, Anthrocyanins, Flavonoids Polyphenols, Ellagitannins (Nascimento <i>et al.</i> , 2000)	- <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Vibrio harveyi</i> and <i>V. parahaemolyticus</i> (Rojtinnakorn and Tummarongkongsatit, 2006; Tummarongkongsatit and Rojtinnakorn, 2007) - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Bacillus subtilis</i> (Nascimento <i>et al.</i> , 2000)
Guava (leaf) <i>Psidium guajava</i> L., 1753	Essential oils, Triterpenoids and Flavonoids (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2007)	- <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>Salmonicida</i> , <i>Flavobacterium columnare</i> , <i>Lactococcus garvieae</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> and <i>Vibrio salmonicida</i> (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2007) - <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Vibrio harveyi</i> and <i>V. parahaemolyticus</i> (Tummarongkongsatit and Rojtinnakorn, 2007) - <i>Aeromonas hydrophila</i> (Pachanawana <i>et al.</i> , 2008)

สำหรับสารสกัดเปลือกทับทิม การศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำยังมีจำนวนน้อย จากผลจากงานวิจัยนี้ที่สารสกัดเปลือกทับทิมสามารถยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* สอดคล้องผลการศึกษาของ Nascimento *et al.* (2000) ได้ศึกษาสารสกัดสมุนไพร 10 ชนิดที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ต่อการยับยั้งเชื้อโรคคือยาปฏิชีวนะ พบว่า สารสกัดเปลือกทับทิมสามารถยับยั้งเชื้อตัวยางชนิดได้ ส่วน Rojtinnakorn and Tummarongkongsatit (2006) รายงานว่าสารสกัดเปลือกทับทิมสามารถใช้ในการป้องกันและรักษาโรคแอโรโมแนสในปลานิลและกุ้งก้ามกราม ต่อมา Tummarongkongsatit and Rojtinnakorn (2007) รายงานว่าสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยเอทานอลต้มและไม่ต้ม สามารถยับยั้ง *A. hydrophila*, *Vibrio harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ได้ โดยสารสกัดที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 แบบ มีค่า inhibition zone ของแต่ละเชื้อใกล้เคียงกัน

ผลของสารสกัดใบฝรั่งในการยับยั้ง *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลานิลป่วย สอดคล้องกับงานวิจัยที่มีมาก่อน ได้แก่ Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn (2007) ได้แยกสารกลุ่ม flavonoids 5 ชนิด ได้แก่ morin, morin-3-O-lyxoside, morin-3-O-arabinoside, quercetin และ quercetin-3-O-arabinoside ที่สกัดได้จากใบฝรั่ง นำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*

ATCC 14174, *Flavobacterium columnare* ATCC 23463, *Lactococcus garvieae* ATCC 49156, *Streptococcus agalactiae* และ *Vibrio salmonicida* ATCC 43839 พบว่าฟลาโวนอยด์ทั้ง 5 ชนิดที่ความเข้มข้น 150-300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดี (Pachanawana *et al.*, 2008) ได้เตรียมสารสกัดใบฝรั่งด้วยน้ำ เอทานอล และอีเธอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี มีค่า MIC ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 250, 62.5 และ 125 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

จากรายงานการศึกษาศาสตร์สำคัญของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด จะเห็นได้ว่าสารประกอบที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพ เป็นกลุ่มพอลิฟีนอล ได้แก่ แทนนิน และฟลาโวนอยด์ แทนนินเป็นพอลิฟีนอลโมเลกุลใหญ่ มีคุณสมบัติทำปฏิกิริยากับโมเลกุลขนาดใหญ่และทำให้ตกตะกอน ได้แก่ โปรตีน เกลาติน โพลีแซคคาไรด์ และอัลคาลอยด์ มีความสามารถในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียและยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน (oxidative phosphorylation) ของแบคทีเรีย (Scalbert, 1991) ทำให้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรีย โดยยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ (Girard and Bee, 2020) ส่วนฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ต้านอักเสบ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพด้วยกลไกต่างๆ ได้แก่ การยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกของแบคทีเรีย การยับยั้งการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ การยับยั้ง porin บนเยื่อหุ้มเซลล์ การยับยั้งการเผาผลาญพลังงาน การยับยั้งการก่อตัวของไบโอฟิล์ม การเปลี่ยนแปลงของการซึมผ่านของเมมเบรน และมีฤทธิ์ลดทอนของภาวะเกิดโรค (pathogenicity) (Xie *et al.*, 2015) จากรายงานที่พบว่า เชื้อ *S. agalactiae* มีการสร้างไบโอฟิล์ม ช่วยเพิ่มความสามารถในการสร้างโคโลนีอยู่ในเจ้าบ้าน และได้ (Rosini and Margarit, 2015) ส่วนสารสกัดสมุนไพรอีก 12 ชนิดที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* อาจเนื่องจากสารสำคัญที่มีอยู่ในสารสกัดไม่มีผลต่อโครงสร้างไบโอฟิล์ม เชื้อ *S. agalactiae* จึงเพิ่มจำนวนได้

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดที่ได้จากกระบวนการสกัดของงานวิจัยนี้ มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาในในการวิจัยนี้ ซึ่งคาดว่าจะสามารถยับยั้งเชื้อในปลาและสัตว์น้ำแหล่งอื่นได้เช่นกัน โดยจะมีการนำไปต่อยอดวิจัยในห้องปฏิบัติการและฟาร์ม และพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ทดแทนยาปฏิชีวนะ เพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรคสเตรปโตคอคโคซิสในสัตว์น้ำต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนจากโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.)

## เอกสารอ้างอิง

Chansue, N. and Assawawongkasem, N. 2008. The in vitro antibacterial activity and ornamental fish toxicity of the water extract of Indian almond leaves (*Terminalia catappa* Linn.). *KKU Veterinary Journal* 18(1): 36-45.



- Chitmanat C. 2013. Effects of herbal products on fish immunity. *KKU Research Journal* 18(2): 257-269. [in Thai]
- Direkbusarakom, S., Herunsalee, A., Yoshimizu M. and Ezura Y. 1996. Antiviral activity of several Thai traditional herb extracts against fish pathogenic viruses. *Fish Pathology* 31(4): 209- 213.
- Durdin, A. 2009. Utilization of herbs to control *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). M.S. thesis. Khon Kaen University, Khon Kaen. [in Thai]
- Duremdez, R., Al-Marzouk, A., Qasem, J.A., Al-Harbi, A. and Gharabally, H. 2004. Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Eupharsen), in Kuwait. *Journal of Fish Disease* 27: 307-310.
- Jana, P., Karmakar, S., Roy, U., Paul, M., Singh, A.K. and Bera, K.K. 2018. Phytobiotics in aquaculture health management: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 6(4): 1422-1429.
- Jantawan, D., Areechon, N. and Srisapoome P. 2007. Study on identification and antimicrobial sensitivity test of *Streptococcus* spp. isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Proceedings of 45th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries, 30 Jan - 2 Feb 2007, Bangkok Thailand. [in Thai]
- Jamboonsri P. 2019. Pharmacokinetics of Tannins. *Journal of Science Ladkrabang* 28(1): 1-14. [in Thai]
- Girard M. and Bee G. 2020. Invited review: Tannins as a potential alternative to antibiotics to prevent coliform diarrhea in weaned pigs. *Animal* 14(1): 95–107. DOI: 10.1017/S1751731119002143
- Katikia, L.M., Gomesa, A.C.P., Barbieria, A.M.E., Pachecoa, P.A., Rodriguesa, L., Veríssimoa, C.J., Gutmanisa, G., Pizaa, A.M., Louvandinib, H. and Ferreira, J.F.S. 2017. *Terminalia catappa*: Chemical composition, in vitro and in vivo effects on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 246: 118-123.
- Ko-sing, S., Ponza, P., Pisamayarom, K., Sangjun, P. and Ponza, S. 2018. Application of India almond (*Terminalia catappa* L.) leaves extract powder to inhibit bacteria (*Aeromonas hydrophila*) in Siamese Fighting Fish (*Betta Splendens* Regan). *Agricultural Science Journal* 49(3) (Suppl.): 85-91. [in Thai]
- Lusiastuti, M., Taukhid, T., Anggi, I. and Caruso, D. 2017. Dry green leaves of Indian almond (*Terminalia catappa*) to prevent streptococcal infection in juveniles of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 37(3): 119-125.

- Nascimento, G. G. F., Locatelli, J., Freitas, P. C. and Silva, G. L. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 31(4): 247–256.
- Niu, G., Khattiya, R., Zhang, T., Boonyayatra, S. and Wongsathein, D. 2020. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus* spp. isolated from tilapia (*Oreochromis* spp.) cultured in river-based cage and earthen ponds in Northern Thailand. *Journal of Fish Diseases* (3):391-398.
- Pachanawana, A., Phumkhachorna, P. and Rattanachaiakunsopon, P. 2008. Potential of *Psidium guajava* supplemented fish diets in controlling *Aeromonas hydrophila* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106(5): 419-424.
- Purivirojkul W. and Areechon N. 2006. Antibacterial activity and toxicity of Indian almond (*Terminalia catappa*) extract in Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan). *Proceedings of 44th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries*, 30 Jan - 2 Feb 2006, Bangkok Thailand. 109-116. [in Thai]
- Rahardjo S., The Vauza, M.A., Rukmono, D. and Wiradana P.A. 2022. Supplementation of hairy eggplant (*Solanum ferox*) and bitter ginger (*Zingiber zerumbet*) extracts as phytobiotic agents on whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 9(1): 78–86. DOI: 10.5455/javar.2022.i571
- Rattanachaiakunsopon, P. and Phumkhachorn P. 2007. Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of *Psidium guajava* on fish pathogens. *Fitoterapia* 78: 434–436.
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B. and Sasal, P. 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture* 433: 50-61.
- Rojtinnakorn J. 2012. Guidebook of herbal extracts for aquaculture. Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University. 35 p. [in Thai]
- Rojtinnakorn J. and Wangcharoen W. 2013. Development of powder product of herb extract suitable for aquatic animals. Research Report of Maejo University. 57 p. [in Thai]
- Rojtinnakorn J. and Tummarongkongsatid, A. 2006. Bath Treatment of Motile *Aeromonas* Septicaemia (MAS) in Aquatic Animal Using Pomegranate (*Punica granatum* L. var.) and Indian Almond (*Terminalia catappa* L.) Extracts. *Proceeding of the Annual Conference on Fisheries 2006*, Bangkok Thailand, 25-27 July 2006. 449-460. [in Thai]

- Rosini R. and Margarit I. 2015. Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5: 6. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00006
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30(12): 3875 – 3883.
- Schar, D., Klein, E., Laxminarayan, R., Gilbert, M. and Van Boeckel, T.P. Global trends in antimicrobial use in aquaculture. *Nature Research* (2020) 10:21878. DOI: 10.1038/s41598-020-78849-3.
- Suanyuk N., Kanghear H., Kongpradit R. and Supamattaya K. 2005. *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Songklanakarin Journal Science Technology* 27 (Suppl.): 307-319. [in Thai]
- Tummarongkongsatit, A. and Rojtinnakorn, J. 2007. Effectiveness of Thai herbs extracts to inhibit bacterial pathogens in Giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Journal of Fisheries Technology Research* 1(2): 192-200. [in Thai]
- Watts J.E.M., Schreier H.J., Lanska L. and Hale M.S. 2017. The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: Sources, Sinks and Solutions. *Marine Drugs* 15: 158. DOI: 10.3390/md15060158
- Xie Y., Yang W., Tang F., Chen X. and Ren L. 2015. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Current Medicinal Chemistry* 22(1): 132-49. DOI: 10.2174/0929867321666140916113443
- Yanong R. P. E. and Francis-Floyd R. 2002. *Streptococcal Infections of Fish*. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Circular 57, one of a series of the School of Forest Resources and Conservation, Program in Fisheries and Aquatic, UF/IFAS Extension.
- Zhang, Z., Lan, J., Li, Y., Hu, M. and Wei, S. 2018. The pathogenic and antimicrobial characteristics of an emerging *Streptococcus agalactiae* serotype IX in Tilapia. *Microbial Pathogenesis* 122: 39 – 45.