

สารสกัดจากใบพลูด้วยเอทานอล สำหรับการควบคุมโรคเต้านมอักเสบในโคนม

Ethanolic Extract of *Piper betle* L. Leaves for Controlling of Bovine Mastitis

รัชนิกร มุลปา¹ อนันตกร สุนทรพิทักษ์¹
และมณฑล วิสุทธิ^{2*}

Ratchaneekorn Moonpa¹ Anantagorn Suntornpittue¹
and Monton Visutthi^{2*}

รับบทความ 10 พฤศจิกายน 2563/ ปรับแก้ไข 22 ธันวาคม 2563/ ตอรับบทความ 22 ธันวาคม 2563
Received: November 10, 2020/ Revised: December 22, 2020/ Accepted: December 22, 2020

บทคัดย่อ

การใช้ยาปฏิชีวนะในโคนมอาจก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับโรคเต้านมอักเสบในโคนม ในปัจจุบันจึงได้มีการวิจัยสารสกัดจากพืชเพื่อใช้เป็นสารทางเลือกแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ ใน การวิจัยนี้จึงได้ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพลู และศึกษาประสิทธิภาพในการป้องกันและ รักษาโรคเต้านมอักเสบในโคนม โดยใช้สารสกัดจากใบพลูที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มาทดสอบฤทธิ์ต้าน แบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion และหาค่า MIC ด้วยวิธี Broth micro-dilution จากนั้นนำสารสกัดมา เติร์ยมเป็นน้ำยาสารสกัดจากใบพลู และนำไปทดลองใช้ควบคุมโรคเต้านมอักเสบในโคนม ผลการทดลองที่ได้ พบว่า สารสกัดจากใบพลูมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ได้ โดยมี ค่า MIC ต่อ *S. aureus* และ *E. coli* เท่ากับ 0.62 mg/ml และ 2.5 mg/ml ตามลำดับ สำหรับผลการทดสอบ ในโคนมน้ำยาสารสกัดจากใบพลูสามารถป้องกันการติดเชื้อในเต้านมโคได้อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ เปรียบเทียบกับน้ำยา Masodine และผลจากการทดลองเพื่อรักษาอาการเต้านมอักเสบในโคนมด้วยการใช้ น้ำยาสารสกัดจากใบพลูสอดเต้านมโค พบว่าน้ำยาสารสกัดจากใบพลูสามารถลดค่าโซมาติกเซลล์ในน้ำนมลงได้ เมื่อใช้ต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน งานวิจัยนี้ให้ผลการศึกษาที่มีแนวโน้มที่ดีในการที่จะพัฒนาสารสกัดจากใบพลู เพื่อใช้เป็นสารฆ่าเชื้อทางเลือกทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มปศุสัตว์

คำสำคัญ: โคนม โรคเต้านมอักเสบ พลู สารสกัดจากพืช ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

¹ สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา
Agriculture Program, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University, 340 Suranarai road,
Maueng District, Nakhon Ratchasima, 30000

² สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา
Biology Program, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University, 340 Suranarai road, Maueng
District, Nakhon Ratchasima, 30000

* Corresponding Author: monton.v@nrru.ac.th

Abstract

The use of antibiotics in dairy castles, for a long time, has led to increased bacterial drug resistance. At present, plant extracts have been investigated as an alternative method for the control of bacterial pathogens causing mastitis. In this study, the antibacterial activity of betel leaf extract was studied and its efficacy in the prevention and treatment of mastitis in dairy cows. The ethanolic extract of betel leaf was determined the antibacterial activity by agar disc diffusion and broth micro-dilution method. Then, the extract was prepared as a solution of betel leaf extract, after that, the solution was applied to study for control mastitis in dairy cows. Antibacterial activity results showed that Betel leaf extract influences *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with MIC values against both of them were 0.62 mg/ml and 2.5 mg/ml, respectively. For the results, in dairy cows, the solution extract was not statistically significant to prevent infection in the mammary gland of the dairy cow compared to Masodine. While the mastitis treatment result presented after treated the mammary gland with the solution, for 7 days, the somatic cells in milk were reduced after using continuously. This primary research provides betel leaf extract could be developed as an alternative disinfectant to antibiotic use in livestock farms.

Keywords: Dairy cow, Mastitis, *Piper betle* L., Plant extract, Antibacterial activity

บทนำ

โรคเต้านมอักเสบในโคนม (mastitis) เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมเลี้ยงโคนม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อลักษณะของเต้านมและส่วนประกอบของน้ำนม ส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของน้ำนมดิบ (Gonçalves et al., 2020) สาเหตุการเกิดโรคเต้านมอักเสบส่วนใหญ่พบว่าเป็นการติดเชื้อแบคทีเรียเข้าไปในเต้านม ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococci* และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ กลุ่มโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Dalanezi et al., 2020) แนวทางการรักษาโรคเต้านมอักเสบ ต้องใช้ยาปฏิชีวนะและยาต้านการอักเสบในการรักษา ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะติดต่อกันเรื่อย ๆ ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการดื้อยาปฏิชีวนะเกิดขึ้น (Ameen et al., 2019; Yang et al., 2018) ทำให้การรักษาหายยาก และต้องใช้ปริมาณยามากขึ้น ส่งผลให้เกษตรกรเสียค่าใช้จ่ายในการรักษา นอกจากนี้ ยังพบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคเต้านมอักเสบอาจก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนม และส่งผลให้เกษตรกรไม่สามารถขายน้ำนมดิบได้ เสียรายได้ในแต่ละ

วัน นอกจากนี้หากแม่โคเป็นโรคเรื้อรัง จะทำให้แม่โคต้องถูกคัดทิ้งก่อนเวลาอันควร การใช้สมุนไพรในการรักษาและควบคุมโรคเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในปัจจุบัน (Prusa, 2020)

สารสกัดจากใบพลูเป็นสารสกัดที่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และแกรมลบ *Escherichia coli* (Visutthi, 2017; มณฑล, 2560) รวมไปถึงเชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะทั้งแกรมบวก และแกรมลบ (Valle et al., 2016) สารสกัดที่สกัดได้จากใบพลูมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ในกลุ่ม Monoterpenes Alcohols Esters และ Phenols ซึ่งสารแต่ละกลุ่มที่มาอยู่รวมกันทำให้สารสกัดจากใบพลูมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรีย (Fazal et al., 2014) อย่างไรก็ตามการใช้สารบริสุทธิ์ในการควบคุมเชื้อในระดับฟาร์ม อาจทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น อีกทั้งสารสกัดหายากจากใบพลูให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ในระดับที่ดี (มณฑล, 2560) ดังนั้นการประยุกต์ใช้สารสกัดจากใบพลูในการควบคุมโรคติดเชื้อในระดับฟาร์มจึงมีความน่าสนใจ และยังมีรายการศึกษาไม่มาก คณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึง

ความสำคัญของประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพลู ด้วยการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์พืชสมุนไพร และศึกษาประสิทธิภาพการรักษาโรคเต้านมอักเสบในโคนม เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์น้ำยาฆ่าเชื้อสมุนไพรสำหรับใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะและลดปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรีย รวมไปถึงลดปัญหาการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์จากนมวัว และเนื้อวัว

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดจากใบพลู

ใบพลูน้ำหนักสด 1 kg ถูกซื้อจากตลาดในเขตอำเภอเมืองนครราชสีมา จากนั้นนำมาล้างน้ำ และอบแห้งให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °C (ประมาณ 3-4 วัน) และบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด นำใบพลูที่บดละเอียดไปแช่ในเอทานอล 95% เป็นเวลา 7 วัน เพื่อสกัดสารสำคัญ จากนั้นกรองแยกกากและสารสกัด จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) เก็บสารสกัดหยาดที่ได้ไปทดลองในการทดลองต่อไป

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดด้วยวิธี Agar disc diffusion และวิธี Broth microdilution

เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 นำไปเพาะเลี้ยงบน Tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ จากนั้นเชยเชื้อ 3-5 โคโลนีเพาะเลี้ยงใน Mueller-Hinton broth (MHB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 3-5 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เซลล์ในระยะ exponential phase ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบรียมซัลเฟต McFarland no. 0.5 ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (มีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml) เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เตรียมได้ ถูกนำไปทดสอบกับสารสกัดจากใบพลู เพื่อวิเคราะห์หาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion และตรวจหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal

concentration, MBC) ด้วยวิธี Broth microdilution ซึ่งได้อธิบายไว้ในรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ (มณฑล, 2560)

ในการทดลองนี้ได้ใช้ชุดควบคุม negative control ใช้เป็น Dimethyl Sulfoxide (DMSO) และ positive control เป็นยาปฏิชีวนะ Enrofloxacin

3. การเตรียมสารละลายสารสกัดจากใบพลู และการตรวจสอบฤทธิ์ของสารละลายสารสกัดเบื้องต้นกับเต้านมโค

นำสารสกัดจากใบพลูที่เตรียมได้ มาละลายด้วยสาร DMSO ให้มีความเข้มข้น 500 mg/ml จากนั้นนำไปผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% และสารละลายโคโคซาน 1% ให้มีระดับความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 2.5, 5, 10 และ 20 mg/ml (ความเข้มข้นที่เลือกใช้เป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ จากผลการทดลองในตารางที่ 1) นำไปตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารละลายสารสกัดจากใบพลูด้วยวิธี Agar disc diffusion จากนั้นนำสารละลายที่ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียที่ดีที่สุด ไปทดสอบเบื้องต้นในโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ การทดสอบจะทำเช่นเดียวกับการให้ยาปฏิชีวนะกับเต้านมโค ตามที่อธิบายไว้ในวิธีการถัดไป (ข้อ 4.)

4. การประยุกต์ใช้สารสกัดจากใบพลูในการรักษาโรคเต้านมอักเสบในโคนม

โคนมสายพันธุ์ลูกผสมโฮลสไตน์-ฟรีเซียน เลือดมากกว่า 85% และเป็นโคนมในระยะกลางของการให้นมจำนวน 15 ตัว ณ ฟาร์มโคนมในเขตพื้นที่บ้านคลองไทร ตำบลหนองย่างเสือ อำเภอห้วยเหล็ก จังหวัดสระบุรี โคนมทั้งหมดที่ถูกคัดเลือกเข้าสู่การทดลองเป็นโคนมที่มีผลการตรวจสอบน้ำนมด้วยน้ำยาทดสอบ California mastitis test (CMT) และพบว่ามีปัญหาเต้านมอักเสบในการทดลองนี้จัดให้โคแต่ละตัวกินอาหารอย่างเป็นอิสระอาหารที่ให้เป็นอาหารชั้นสำเร็จรูปเสริมกากมันสำปะหลัง มีคุณค่าทางโภชนาการต่อความต้องการของโคนม ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง ในเวลา 08.00 น และ 16.00 น อาหารหยาดที่ให้ จะให้ตามฤดูกาล และมีน้ำดื่มสะอาดใส่อย่างสำหรับให้โคกินตลอดเวลา

สารละลายสารสกัดหยาดจากใบพลูแต่ละความเข้มข้น ถูกนำไปทดสอบกับโคนมสายพันธุ์ลูกผสมโฮลสไตน์-ฟรีเซียน เลือดมากกว่า 85% และเป็นโคนมในระยะ

กลางของการให้นมที่มีอาการของโรคเต้านมอักเสบ โดยทดสอบกับเต้านมจำนวน 4 เต้า ด้วยการสอดสารละลาย สารสกัดความเข้มข้น 2.5, 5, 10 และ 20 mg/ml แต่ลดความเข้มข้นปริมาตร 10 ml เข้าสู่เต้านมแต่ละเต้าทุก ๆ วัน เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นรีดน้ำนมไปตรวจสอบด้วยน้ำยาทดสอบ California mastitis test (CMT) เพื่อหาระดับปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำนม

5. การประยุกต์ใช้สารสกัดจากใบพลูต่อการป้องกันโรคเต้านมอักเสบในโคนม

โคนมสายพันธุ์ลูกผสมไฮสไตน์-ฟรีเซียน เลือดมากกว่า 85% และเป็นโคนมในระยะกลางของการให้นมจำนวน 15 ตัว ณ ฟาร์มโคนมในเขตพื้นที่ บ้านลำพญา กลาง ตำบลจันทิก อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา การคัดเลือกโคนม และการดูแลโคนม มีวิธีการจัดการตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น (ข้อ 4.)

โคนมทั้งหมดถูกแบ่งกลุ่มทดลองโดยการสุ่มออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ใช้แผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) กำหนดให้กลุ่มการทดลองที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมให้ยาปฏิชีวนะในการรักษา กลุ่มการทดลองที่ 2 และกลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ใช้สารสกัดจากพลูความเข้มข้น 5 mg/ml และ 10 mg/ml ในการรักษา ตามลำดับ ทุกกลุ่มการทดลองจะทำการสอดยาปฏิชีวนะ หรือสารสกัดจากใบพลูช่วงเวลาหลังรีดนม โดยทำการสอดสารทดสอบ 3 เวลา คือ เช้า กลางวัน และ เย็น เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบผลด้วยน้ำยา CMT หากพบว่าไม่เป็นปัญหาเต้านมอักเสบ ทำการรีดนมส่งตรวจที่ศูนย์รับน้ำนมเพื่อตรวจสอบคุณภาพน้ำนม จากนั้นเก็บข้อมูลและตัวอย่างน้ำนมจากโคในกลุ่มที่ทำการทดลองเพื่อนำมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย โดย

ประเมินผลการตรวจด้วยน้ำยาทดสอบ CMT และจำนวนโซมาติกเซลล์

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance ; ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 20

ผลการวิจัย

1. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพลูและน้ำยาสารสกัดจากใบพลู

ใบพลูสดน้ำหนัก 1 kg. หลังอบแห้งแล้วได้น้ำหนักแห้งประมาณ 161.67 g. และเมื่อนำไปสกัดได้น้ำหนักสารสกัดประมาณ 16.94 g. คิดเป็นร้อยละ 10.48 จากนั้นนำไปทำการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ก่อนที่จะนำไปศึกษาฤทธิ์ป้องกัน และรักษาโรคเต้านมอักเสบในโคนม

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบพลูต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ด้วยวิธี Agar disc diffusion สารสกัดจากใบพลูมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ดีโดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเท่ากับ 20.55 ± 3.31 mm. และ 18.53 ± 1.56 mm. ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ตามลำดับ โดยมียาปฏิชีวนะ Enrofloxacin และสารละลาย DMSO เป็นชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 1 ผลการหาค่า MIC ของสารสกัดจากใบพลูต่อเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* มีค่าเท่ากับ 0.62 mg/ml และ 2.5 mg/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากใบพลู

สารที่ใช้ทดสอบ	ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลาง (mm.)		ค่า MIC/MBC (mg/ml)	
	SA*	EC*	SA	EC
Piper betle extract	20.55 ± 3.31	18.53 ± 1.56	0.62/0.62	2.5/2.5
Enrofloxacin	29.31±0.77	30.56±0.23	0.125/0.25	0.125/0.125
DMSO	-	-	-	-

*SA หมายถึง *Staphylococcus aureus* EC หมายถึง *Escherichia coli*

- หมายถึง ไม่เกิดผลการยับยั้งแบคทีเรีย

2. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำยาสารสกัดจากใบพลู

หลังจากตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดที่เตรียมได้แล้ว สารสกัดจากใบพลูถูกนำมาใช้ในการเตรียมน้ำยาสารสกัดจากใบพลู ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ น้ำเกลือ และน้ำผสมโคโตซาน 1% เป็นตัวทำละลาย โดยผสมสารสกัดจากใบพลูในตัวทำละลายทั้งสองชนิดให้ความเข้มข้นของสารสกัดสุทธิที่ 2.5, 5, 10 และ 20 mg/ml จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion ผลการทดลองพบว่าน้ำยาสารสกัดจากใบพลูที่มีน้ำเกลือผสมสารสกัดให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ทุกความเข้มข้น ในขณะที่น้ำยาสารสกัดจากใบพลูที่มีสารละลายโคโตซานไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

ดังนั้นจากการทดลองเบื้องต้นของน้ำยาสารสกัดในโคนมจึงได้เลือกใช้น้ำเกลือเป็นตัวทำละลายสารสกัด

ผลการตรวจสอบฤทธิ์เบื้องต้นของน้ำยาสารสกัดจากใบพลู พบว่าน้ำนมจากเต้านมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบที่ให้น้ำยาสารสกัดจากใบพลูที่ความเข้มข้น 10 และ 20 mg/ml มีผลการทดสอบเป็นลบ (ไม่มีอาการติดเชื้อ) ส่วนน้ำนมจากเต้านมที่ให้น้ำยาสารสกัดจากใบพลูที่ความเข้มข้น 2.5 และ 5 mg/ml ให้ผลบวก (มีอาการติดเชื้อแบคทีเรียในเต้านม) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงทำการประเมินการใช้น้ำยาสารสกัดจากใบพลูในการรักษาอาการเต้านมอักเสบ งานวิจัยในขั้นตอนนี้ได้เลือกใช้น้ำยาสารสกัดจากใบพลูที่ความเข้มข้น 10 mg/ml กับโคนมที่น้ำนมไม่ผ่านการตรวจสอบ

ตารางที่ 2 ผลการรักษาอาการเต้านมอักเสบในโคนมเบื้องต้นด้วยน้ำยาสารสกัดจากใบพลู

ความเข้มข้นของสารสกัดใบพลู (mg/ml)	ผลการทดสอบน้ำนมจากโคนมที่ใช้น้ำยาสารสกัดจากใบพลูในระยะเวลา 7 วัน
2.5	+*
5.0	+
10.0	**
20.0	-

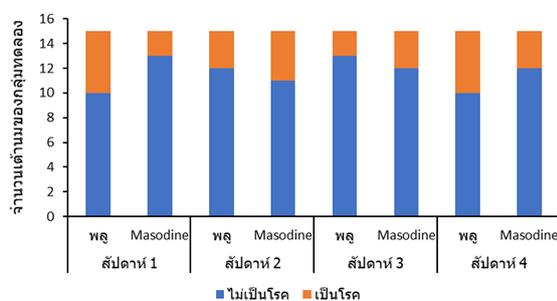
*, ไม่ผ่าน **, ผ่าน หมายถึง ค่า CMT ของน้ำนมจากเต้านมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ

3. ฤทธิ์ของน้ำยาสารสกัดจากใบพลูต่อการรักษาโรคเต้านมอักเสบในโคนม

การประเมินฤทธิ์ของน้ำยาสารสกัดจากใบพลูต่อการรักษาโรคเต้านมอักเสบ ได้รับความอนุเคราะห์โคนมจากเจ้าของฟาร์มโคนมทั้งหมด 8 ฟาร์ม ฟาร์มละ 1 ตัว รวมจำนวน 8 ตัว ทุกตัวให้น้ำนมที่มีค่าโซมาติกเซลล์มากกว่า 500,000 เซลล์ และทำการทดสอบโดยการให้น้ำยาสารสกัดจากใบพลูที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 10 ml ต่อ 1 เต้านมต่อวัน เป็นระยะเวลา 14 วัน และตรวจสอบค่าโซมาติกเซลล์ของน้ำนมทุกวันที่ 3, 7 และ 14 ของการทดลอง ผลการทดลองพบว่า ค่าโซมาติกเซลล์ในวันที่ 3 ของการทดลองน้ำนมจากเต้านมของโคนมจำนวน 5 ตัว มีค่าโซมาติกเซลล์ของน้ำนมผ่านเกณฑ์ ในวันที่ 7 น้ำนมจากเต้านมของโคนมอีก 2 ตัว มีค่าโซมาติกเซลล์ผ่านเกณฑ์ และในวันที่ 14 โคนมที่เหลือมีค่าโซมาติกเซลล์ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน

4. ฤทธิ์ของน้ำยาสารสกัดจากใบพลูต่อการป้องกันโรคเต้านมอักเสบในโคนม

จากผลการทดลองข้างต้น น้ำยาสารสกัดจากใบพลูที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ได้ถูกเลือกนำมาเตรียมเป็นน้ำยาเช็ดทำความสะอาดเต้านมของโคนมก่อนและหลังการรีดนม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อศึกษาการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนม โดยเปรียบเทียบกับน้ำยาฆ่าเชื้อ Masodine ผลการศึกษาพบว่า อัตราการเกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนมที่ใช้น้ำยาสารสกัดจากใบพลู และน้ำยา Masodine ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังรูปที่ 1 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า น้ำยาสารสกัดจากใบพลูสามารถใช้ทดแทนน้ำยา Masodine ได้



รูปที่ 1 ฤทธิ์ของน้ำยาสารสกัดจากใบพลูต่อการป้องกันโรคเต้านมอักเสบในโคนม

วิจารณ์ผลการวิจัย

การลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในฟาร์มเลี้ยงสัตว์เป็นแนวทางของการเกษตรในยุคปัจจุบัน เพื่อลดการแพร่กระจายสารเคมี หรือยาปฏิชีวนะสู่ผู้บริโภค และลดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ด้วยเหตุนี้จึงมีการวิจัยเพื่อหาสารจากธรรมชาติมาทดแทนการใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะ

โรคเต้านมอักเสบในโคนมมีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus* (Käppeli et al., 2019) และแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* sp. และการติดเชื้อร่วมจากแบคทีเรียแกรมลบที่พบในบริเวณฟาร์ม เช่น *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumonia* เป็นต้น แบคทีเรียเหล่านี้มีอุบัติการณ์การตรวจเจอเชื้อดื้อยาในโคนมทุกปี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S. aureus* (Santos et al., 2017; Sur et al., 2020) และ *E. coli* (Yu et al., 2020) ดังนั้นการควบคุมโรคด้วยสารสกัดจากธรรมชาติ จึงเหมาะสมที่จะใช้เป็นการเลือกอันดับแรก ก่อนที่จะใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาในลำดับถัดไป

สารสกัดจากพืชส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ และมีบางส่วนที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เช่น สารสกัดจากสีเสียด (*Acacia catechu* Willd.) นนทรี (*Peltophorum pterocarpum* DC.) ฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn.) ทับทิม (*Punica granatum* L.) เบญจกานี (*Quercus infectoria* G.Olivier) และพลู (Voravuthikunchai et al., 2004; 2005; Visutthi, 2016) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพลู เป็นพืชที่มีงานวิจัยในระดับห้องปฏิบัติการมากมาย (มณฑล, 2560; Voravuthikunchai, et al., 2005; Teanpaisan et al., 2017; Visutthi, 2016; Jamelarin & Balinado, 2019) และมีการรายงานผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกัน อีกทั้งยังเป็นพืชที่มีปริมาณการปลูกสูง จึงเป็นพืชที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารสกัดจากพืชสำหรับควบคุมเชื้อแบคทีเรีย ในงานวิจัยเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่า น้ำยาสารสกัดจากใบพลูที่ละลายในน้ำเกลือ (NaCl) 0.85% สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย หรือควบคุมอาการอักเสบของเต้านมโคได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ที่กล่าวว่าสารสกัดน้ำมัน และกรดไขมันจากพืชหลายชนิด ได้แก่ จิง ออบเชย มะพร้าว ไทม์ ออริกาโน่ สามารถยับยั้ง และฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนมได้ (Prusa, 2020)

นอกจากนี้ น้ำยาสารสกัดจากใบพลูสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังของเต้านมโคได้ดี เช่นเดียวกับน้ำยา Masodine แสดงให้เห็นว่า น้ำยาสารสกัดจากใบพลูสามารถใช้แทนน้ำยาฆ่าเชื้อที่เป็นสารเคมีได้ สอดคล้องกับผลการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการที่สารสกัดจากใบพลูสามารถลดปริมาณเซลล์แบคทีเรีย *Streptococcus mutans* และ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ที่สามารถเกาะอยู่บนผิววัตถุได้ (Teapaisan et al., 2017)

สรุปผลการวิจัย

น้ำยาสารสกัดจากใบพลูมีฤทธิ์ควบคุมอาการโรคเต้านมอักเสบ และมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคเต้านมอักเสบได้ ผลการวิจัยเบื้องต้นนี้ แสดงให้เห็นประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบพลูในการควบคุมโรคเต้านมอักเสบในระดับฟาร์มได้ และน้ำยาสารสกัดจากใบพลูมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นน้ำยาฆ่าเชื้อจากพืช เพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปีงบประมาณ 2562 และขอขอบคุณนางสาวอัจฉรา พิมพ์กระโทก นายชัย อนันต์ พิมพ์รัมย์ นางสาวดาราวดี ศรีนาคสุข และนางสาวน้ำฝน ยานูไทย ที่ให้ความช่วยเหลือ เพื่อให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

มณฑล วิสุทธี (2560). ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในกลุ่ม Staphylococci ของพืชท้องถิ่นบางชนิดในนครราชสีมา. *วารสารวิทยาศาสตร์ มช.* 45(4), 805-816.

Ameen, F., Reda, S. A., El-Shatoury, S. A., Riad, E. M., Enany, M. E., & Alarfaj, A. A. (2019). Prevalence of antibiotic resistant mastitis pathogens in dairy cows in Egypt and potential biological control agents produced from plant endophytic

actinobacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1492-1498.

Dalanezi, F. M., Joaquim, S. F., Guimarães, F. F., Guerra, S. T., Lopes, B. C., Schmidt, E. M. S., Cerri, R.L.A. & Langoni, H. (2020). Influence of pathogens causing clinical mastitis on reproductive variables of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3648-3655.

Fazal, F., Mane, P. P., Rai, M. P., Thilakchand, K. R., Bhat, H. P., Kamble, P. S., Palatty, P.L. & Baliga, M. S. (2014). The phytochemistry, traditional uses and pharmacology of Piper Betel. linn (Betel Leaf): A pan-asiatic medicinal plant. *Chinese journal of Integrative Medicine*, pp. 1-11.

Gonçalves, J. L., Kamphuis, C., Vernooij, H., Araújo Jr, J. P., Grenfell, R. C., Juliano, L., Anderson, K.L., Hogeveen, H. & dos Santos, M. V. (2020). Pathogen effects on milk yield and composition in chronic subclinical mastitis in dairy cows. *The Veterinary Journal*, 105473.

Jamelarin, E. M., & Balinado, L. O. (2019). Evaluation of antibacterial activity of crude aqueous, ethanolic and methanolic leaf extracts of *Piper retrofractum* Vahl. and *Piper betle* L. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 8(2), 63-67.

Käppeli, N., Morach, M., Corti, S., Eicher, C., Stephan, R., & Jöhler, S. (2019). *Staphylococcus aureus* related to bovine mastitis in Switzerland: Clonal diversity, virulence gene profiles, and antimicrobial resistance of isolates collected throughout 2017. *Journal of Dairy Science*, 102(4), 3274-3281.

Prusa, B. (2020). Alternative solutions to antibiotics in mastitis treatment for dairy

- cows-a review. *Animal Science Papers and Reports*, 38(2), 117-133.
- Santos, R. I., Zunino, P. M., Gil, A. D., Laport, A., & Hirigoyen, D. J. (2017). Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical mastitis in Uruguay during an eight-year period. *Australian Journal of Veterinary Sciences*, 49(3), 191-194.
- Sur, E., & Turkyilmaz, S. (2020). Investigation of the Toxin genes and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical mastitic cow milk. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 75(1), 35-42.
- Teanpaisan, R., Kawsud, P., Pahumunto, N., & Puripattanavong, J. (2017). Screening for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(2), 172-177.
- Valle Jr, D. L., Cabrera, E. C., Puzon, J. J. M., & Rivera, W. L. (2016). Antimicrobial activities of methanol, ethanol and supercritical CO₂ extracts of Philippine *Piper betle* L. on clinical isolates of Gram positive and Gram negative bacteria with transferable multiple drug resistance. *PloS one*, 11(1), e0146349.
- Visutthi, M. (2016). Anti-staphylococcal screening of selected Thai medicinal plants from Nakhon Ratchasima province. *Suranaree Journal of Science and Technology*, 23, 109-114.
- Voravuthikunchai, S. P., Phongpaichit, S., & Subhadhirasakul, S. (2005). Evaluation of antibacterial activities of medicinal plants widely used among AIDS patients in Thailand. *Pharmaceutical Biology*, 43(8), 701-706.
- Voravuthikunchai, S., Lortheeranuwat, A., Jeeju, W., Sririrak, T., Phongpaichit, S., & Supawita, T. (2004). Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 49-54.
- Yang, F., Zhang, S., Shang, X., Wang, L., Li, H., & Wang, X. (2018). Characteristics of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in China. *Journal of dairy science*, 101(7), 6244-6252.
- Yu, Z. N., Wang, J., Ho, H., Wang, Y. T., Huang, S. N., & Han, R. W. (2020). Prevalence and antimicrobial-resistance phenotypes and genotypes of *Escherichia coli* isolated from raw milk samples from mastitis cases in four regions of China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22, 94-101.