

จุลพยาธิวิทยาของตับปลานิล *Oreochromis niloticus* หลังจากได้รับสารสกัด
จากใบตออบแตงน้ำ *Derris trifoliata* เป็นระยะเวลานาน



นายเจษฎา สกุลสุ

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-638-939-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**HISTOPATHOLOGY OF TILAPIA *Oreochromis niloticus* LIVER AFTER
LONG-TERM EXPOSURE TO *Derris trifoliata* LEAVES EXTRACT**

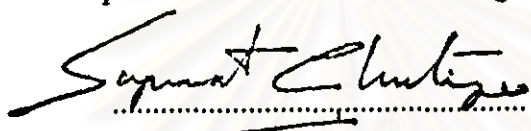
Mr. Jassada Sakulku

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Zoology**

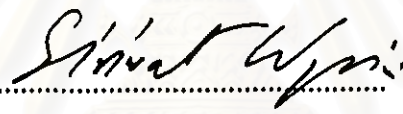
**Department of Biology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1997
ISBN 974-638-939-4**

Thesis Title Histopathology of Tilapia *Oreochromis niloticus* liver after
 long-term exposure to *Derris trifoliata* leaves extract
By Mr. Jassada Sakulku
Department Biology
Thesis Advisor Associate Professor Kingkaew Wattanasirmkit, Ph.D.
Thesis Co-Advisor Associate Professor Udom Kokpol, Ph.D.


Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

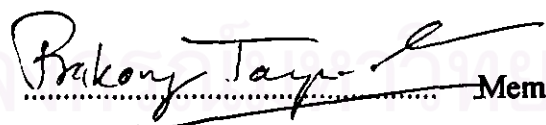

..... Dean of Graduate School
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee


..... Chairman
(Professor Siritwat Wongsiri, Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Associate Professor Kingkaew Wattanasirmkit, Ph.D.)


..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Udom Kokpol, Ph.D.)

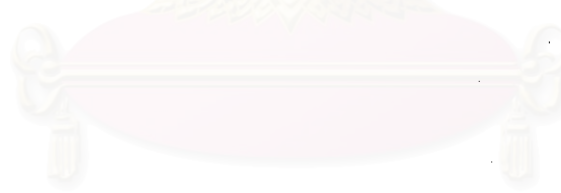

..... Member
(Associate Professor Prakong Tangpraprutgul, Ph.D.)


..... Member
(Assistance Professor Patchanee Singh-Asa, Ph.D.)

เจษฎา สกุลสุ : จุลพยาธิวิทยาของตับปลานิล *Oreochromis niloticus* หลังจากได้รับสารสกัดจากใบตองแคบน้ำ *Derris trifoliata* เป็นระยะเวลานาน (HISTOPATHOLOGY OF TILAPIA *Oreochromis niloticus* LIVER AFTER LONG-TERM EXPOSURE TO *Derris trifoliata* LEAVES EXTRACT) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ, อ. ที่ปรึกษาร่วม รศ. ดร. อุดม กักผล, 165 หน้า. ISBN 974-638-939-4

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน และความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดใบตองแคบน้ำ *Derris trifoliata* ต่อปลานิล *Oreochromis niloticus* ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง และ 5 เดือน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับที่ได้รับสารสกัดจากใบตองแคบน้ำในระดับความเป็นพิษเรื้อรังเฉียบพลัน โดยวิธีการทดสอบแบบน้ำนิ่งเปลี่ยนน้ำ รวมทั้งตรวจวัดการเจริญเติบโต และหาค่าดัชนีความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัว และน้ำหนักตับ

จากผลการศึกษา ค่ามัธยฐานความเป็นพิษเฉียบพลัน ($96-h LC_{50}$) มีค่าเท่ากับ 1.99 ไมโครกรัมต่อลิตร และนำไปคำนวณค่าความเข้มข้นเพื่อใช้ศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังเฉียบพลันได้ค่าเท่ากับ 0.2 ไมโครกรัมต่อลิตร ผลของสารสกัดจากใบตองแคบน้ำทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ ได้แก่ hydropic swelling, vacuolation and fatty degenerate ของเซลล์ตับ, hemorrhagic inflammation, macrophage invasion, necrosis and fibrosis และ การศึกษาทาง histochemistry พบว่าตับปลาจากกลุ่มทดลองมีการสะสมไกลโคเจนลดลง แต่มีการสะสมไขมันเพิ่มขึ้น การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า มีการขยายตัว และ หรือหดตัวของไมโทคอนเดรีย การหัก และ การเพิ่มจำนวนของ RER, secondary lysosome และการเปลี่ยนแปลงของ RER ไปเป็น SER ความรุนแรงของการเกิดความเสียหายของโครงสร้างเซลล์ตับเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับสารสกัด นอกจากนี้สารสกัดยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของปลานิลอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.5$) พบว่าความยาว และน้ำหนักของปลาในกลุ่มทดลอง มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่เดือนที่ 3 จนถึงเดือนที่ 5 ส่วนค่าดัชนีความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัวและน้ำหนักตับ พบว่ามีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.5$) ตั้งแต่เดือนที่ 4 ของการทดลอง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา วิชา.....
สาขาวิชา สาขาวิชา.....
ปีการศึกษา 2540.....

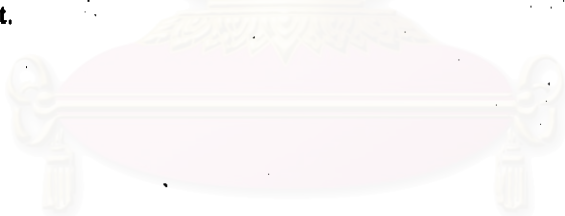
ลายมือชื่อนิติ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
Udom Karp

C725542 : MAJOR ZOOLOGY

KEY WORD: *Derris trifoliata* / *Oreochromis niloticus* / HISTOPATHOLOGY / AQUATIC TOXICOLOGY
JASSADA SAKULKU : HISTOPATHOLOGY OF TILAPIA *Oreochromis niloticus* LIVER AFTER
LONG-TERM EXPOSURE TO *Derris trifoliata* LEAVES EXTRACT. THESIS ADVISOR :
ASSOC. PROF. KINGKAEW WATTANASIRMKIT, PH.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSOC.
PROF. UDOM KOKPOL, Ph.D. 165 PP. ISBN. 974-638-939-4

Acute toxicity and sub-acute effects of *Derris trifoliata* leaves extract on histological and ultrastructural alteration of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* liver were studied. The experiments were performed under laboratory conditions with static renewal test-type. The fish were investigated for growth (indicated by length and weight), relative liver weight index, histological and ultrastructural alteration of liver during 5 months.

The median lethal concentration (96-h LC₅₀) for acute toxicity was 1.99 mg/L. Base on this value, a sub-acute concentration for this study was calculated to 0.02 mg/L. From light microscopic study, the histological changes of hepatic tissue comprised of swelling, vacuolation and fat droplets accumulation in hepatocytes, hemorrhagic inflammation, macrophage invasion, fibrosis, foci and diffused necrosis. Histochemical studies indicated that the treated liver were less in glycogen storage but much more lipid accumulation than control groups. The ultrastructural alterations of hepatocyte consisted of mitochondrial contraction and/or swelling, proliferation and fragmentation of RER, shifting of RER to SER, increasing of secondary lysosome. Hepatic cell injuries and liver tissue lesions were increased along the continuous exposure of 5 months experimental period. Hence, these cellular changes were time dependent effect. Additionally, a significant (p<0.5) reduction in growth was observed in 3rd month till 5th month of treated groups. The relative liver weight index was also significant (p<0.5) increased in the 4th month of experiment.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....สัตววิทยา.....

สาขาวิชา.....สัตววิทยา.....

ปีการศึกษา..... 2540.....

ลายมือชื่อนิสิต..... Kingkaew Wattanasirmit.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... Kingkaew Wattanasirmit.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... Udom Kokpol.....

ACKNOWLEDGMENT

I would like to express my deepest gratitude to my thesis advisor, Assoc. Prof. Dr. Kingkaew Wattanasirmkit, who encouraged me to carry out this thesis, and provided helpful advice and suggestion throughout the study. I am grateful to my thesis co-advisor, Assoc. Prof. Dr. Udom Kokpol for his valuable suggestions and helpful.

I truly thank Prof. Siriwat Wongsiri, Head of the Department of Biology. I am grateful to thesis committee, Assoc. Prof. Dr. Prakong Tangpraputgul and Assist. Prof. Patchanee Singh-Asa, for their valuable advice, comments, and suggestions in completion of this thesis.

I truly thank to Dr. Santi Tipyang, for his helpfulness in the chemistry laboratory technique.

I would like to thank Bangkant Inland Fisheries Center, Patumtanee for their kindly supplied the juvenile fish in this thesis.

I would like to thank Miss Sumpun Suwanarat for her helpfulness and suggestion in laboratory technique.

I would like to thank Mr. Sorapot Arsasene, Miss Somsri Klongpanichpuk and all of others who are not named here for their best wish, helpfulness, friendship all over the periods of my study.

Finally and most importantly, the deepest appreciation extended to my family, for their never-ending love, support, believing and understanding for all the time being.

CONTENT

	PAGE
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGMENT.....	vi
CONTENT.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	ix
LIST OF PLATES.....	x
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW.....	4
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.....	22
CHAPTER IV RESULTS.....	33
CHAPTER V DISCUSSION.....	100
CHAPTER VI CONCLUSION AND RECOMMENDATION.....	105
REFERENCES.....	107
APPENDIX A.....	111
APPENDIX B.....	114
APPENDIX C.....	121
APPENDIX D.....	137
BIOGRAPHY.....	165

LIST OF TABLES

	PAGE
Table 2.1	The chemical composition of <i>Derris spp.</i> extract..... 5-11
Table 4.1	The yield percentage of <i>D. trifoliata</i> leaf extract..... 33
Table 4.2	Mortality percentage of Nile tilapia <i>O. niloticus</i> at various <i>D. trifoliata</i> water extract concentrations over 96 hours..... 34
Table 4.3	Mortality percentage of Nile tilapia <i>O. niloticus</i> at various <i>D. trifoliata</i> dichloromethane extract concentrations over 96 hours..... 35
Table 4.4	Mortality percentage of Nile tilapia <i>O. niloticus</i> at various <i>D. trifoliata</i> dichloromethane extract concentrations over 96 hours..... 36
Table 4.5	Mortality percentage of Nile tilapia <i>O. niloticus</i> at various <i>D. trifoliata</i> extract concentrations over 96 hours..... 37
Table 4.6	The LC50 of <i>D. trifoliata</i> leaf extract exposure to juvenile Nile tilapia..... 38
Table 4.7	Water quality during the acute toxicity test..... 39
Table 4.8	Water quality during the sub-acute toxicity test..... 40
Table 4.9	The presence of cellular injury..... 43
Table 4.10	Mean of length (cm) from growth test..... 44
Table 4.11	Mean of weight (g) from growth test..... 45
Table 4.12	Mean of relative weight index..... 49

LIST OF FIGURES

	PAGE
Figure 3.1	Extraction procedure of the leaves of <i>Derris trifolia</i> 23
Figure 3.2	The tissue embedding procedure..... 29
Figure 3.3	The heamatoxylin/eosin staining procedure..... 30
Figure 3.4	The Oil red O staining procedure..... 31
Figure 3.5	The Periodic acid / Schiff (PAS) procedure..... 31
Figure 3.6	The Rapid Method for Electron Microscopic Technique..... 32
Figure 4.1	Probit transformed responses at 96-hour LC ₅₀ 38
Figure 4.2	Percent survival of <i>O. niloticus</i> during acute toxicity..... 39
Figure 4.3	Mean of length of Nile tilapia <i>O. niloticus</i> in 5-month test period... 46
Figure 4.4	Mean of length of Nile tilapia <i>O. niloticus</i> in 5-month test period... 47
Figure 4.5	Mean of weight of Nile tilapia <i>O. niloticus</i> in 5-month test period.. 47
Figure 4.6	Mean of weight of Nile tilapia <i>O. niloticus</i> in 5-month test period.. 48
Figure 4.7	Relative liver weight index (%)..... 49
Figure C.1	Probit transformed responses at 24-hour LC ₅₀ 124
Figure C.2	Probit transformed responses at 48-hour LC ₅₀ 127
Figure C.3	Probit transformed responses at 72-hour LC ₅₀ 130
Figure C.4	Probit transformed responses at 96-hour LC ₅₀ 133

LIST OF PLATES

	PAGE
Plate 1	Gross anatomy of Nile tilapia liver..... 51
Plate 2	Photomicrograph of the liver from 1st month of experimnt (H&E staining)..... 53
Plate 3	Photomicrograph of the liver from 1st month of experiment (PAS and Oil red O staining)..... 55
Plate 4	Electronmicrograph of the control liver from 1st month of experiment..... 57
Plate 5	Electronmicrograph of the treated liver from 1st month of experiment..... 59
Plate 6	Electronmicrograph of the treated liver from 1st month of experiment..... 61
Plate 7	Photomicrograph of the liver from 2nd month of experimnt (H&E staining)..... 63
Plate 8	Photomicrograph of the liver from 2nd month of experiment (PAS and Oil red O staining)..... 65
Plate 9	Electronmicrograph of the control liver from 2nd month of experiment..... 67
Plate 10	Electronmicrograph of the treated liver from 2nd month of experiment..... 69
Plate 11	Electronmicrograph of the treated liver from 2nd month of experiment..... 71
Plate 12	Photomicrograph of the liver from 3rd month of experimnt (H&E staining)..... 73
Plate 13	Photomicrograph of the liver from 3rd month of experiment (PAS and Oil red O staining)..... 75

LIST OF PLATES (Cont.)

	PAGE
Plate 14 Electronmicrograph of the control liver from 3rd month of experiment.....	77
Plate 15 Electronmicrograph of the treated liver from 3rd month of experiment.....	79
Plate 16 Electronmicrograph of the treated liver from 3rd month of experiment.....	81
Plate 17 Photomicrograph of the liver from 4th month of experiment (H&E staining).....	83
Plate 18 Photomicrograph of the liver from 4th month of experiment (PAS and Oil red O staining).....	85
Plate 19 Electronmicrograph of the control liver from 4th month of experiment.....	87
Plate 20 Electronmicrograph of the treated liver from 4th month of experiment.....	89
Plate 21 Electronmicrograph of the treated liver from 4th month of experiment.....	91
Plate 22 Photomicrograph of the liver from 5th month of experiment (H&E staining).....	93
Plate 23 Photomicrograph of the liver from 5th month of experiment (PAS and Oil red O staining).....	95
Plate 24 Electronmicrograph of the treated liver from 5th month of experiment.....	97
Plate 25 Electronmicrograph of the treated liver from 5th month of experiment.....	99