



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาคณิบัณต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง บทบาทของสารสกัดขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) และฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* Wall. Ex Nees) ต่อภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำและฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค
Roles of Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) and Creat (*Andrographis paniculata* Wall. Ex Nees) Extract on Immunity of Aquatic Animals and Their Activities on the Control of Pathogenic Bacteria

นางผู้วิจัย นางสาวกิตติมา วานิชกุล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีรักษ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่..... เดือน..... พ.ศ.....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

บทบาทของสารสกัดขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) และฟ้าทะลายโจร
(*Andrographis paniculata* Wall. Ex Nees) ต่อภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ
และฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

Roles of Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) and Creat (*Andrographis paniculata* Wall. Ex Nees) Extract
on Immunity of Aquatic Animals and Their Activities on the Control of Pathogenic Bacteria

โดย

นางสาวกิตติมา วานิชกุล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

พ.ศ. 2553

กิตติมา วานิชกุล 2553: บทบาทของสารสกัดขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) และฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* Wall. Ex Nees) ต่อภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำและฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค
ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์นันทวิทย์ อารีรักษ์, Ph.D. 174 หน้า

การศึกษารoles บทบาทของสารสกัดขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) และฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* Wall. Ex Nees) ต่อภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำและฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค พบว่า สารสกัด (crude extract) ขมิ้นชันมีค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และค่า Minimal Bactericidal Concentration (MBC) กับเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่ 512 และ 2,275.55 ppm ส่วนเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ 853.33 และ > 4,452.17 ppm ตามลำดับ และสารสกัดฟ้าทะลายโจรมีค่า MIC และ MBC กับเชื้อ *V. harveyi* ที่ 2,560 และ 2,560 ppm ส่วนเชื้อ *S. agalactiae* ที่ 853.33 และ > 4,452.17 ppm ตามลำดับ สำหรับการใส่สารสกัดในการเลี้ยงสัตว์น้ำ พบว่า กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) และกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone) ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 25.0 ppm เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* โดยมีอัตราการตายต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันมีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยเฉพาะค่า phenoloxidase activity และค่า bactericidal activity ส่วนปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.) ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ 20.0 ppm เป็นเวลา 2 สัปดาห์ สามารถต้านทานต่อเชื้อ *S. agalactiae* ดีกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อทดลองเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 20 ppm เป็นระยะเวลา 15 วัน มีผลทำให้มีการเพิ่ม phagocytic activity และที่ระยะเวลา 30 วัน มีผลทำให้มีการเพิ่มกิจกรรม respiratory burst สูงกว่าชุดควบคุม ส่วนกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ 30.0 ppm เป็นเวลา 2 สัปดาห์สามารถต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* ได้ดีกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือนสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ โดยเฉพาะกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase, phagocytic activity และ ค่า bactericidal activity สำหรับปลานิลเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ สามารถต้านทานต่อเชื้อ *S. agalactiae* ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ($P > 0.05$) เมื่อทดลองเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ 10 ppm เป็นเวลา 15 วันสามารถกระตุ้นการทำงานของ phagocytic activity ได้ดี นอกจากนี้สารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรทุกความเข้มข้นสามารถลดจำนวนแบคทีเรียรวมทั้ง *Vibrio* sp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งกุลาดำ กุ้งขาว และปลานิล ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากผลการศึกษานี้ระบุได้ว่า สารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรมีผลดีในการใช้ควบคุมเชื้อก่อโรคโรค และสามารถเสริมภูมิคุ้มกันบางระบบในสัตว์น้ำ นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ได้ดี

Kittima Vanichkul 2010: Roles of Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) and Creat (*Andrographis paniculata* Wall. Ex Nees) Extract on Immunity of Aquatic Animals and Their Activities on the Control of Pathogenic Bacteria. Doctor of Philosophy (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Associate Professor Nontawith Areechon, Ph.D. 174 pages.

The study on roles of turmeric (*Curcuma longa* Linn.) and creat (*Andrographis paniculata* Wall. Ex Nees) extract on the control of pathogenic bacteria in aquaculture was conducted. The results showed Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) values of turmeric extract with *Vibrio harveyi* at 512 and 2,275.55 ppm and *Streptococcus agalactiae* at 853.33 and > 4,452,17 ppm respectively. Creat extract showed MIC and MBC values with *Vibrio harveyi* at 2,560 and 2,560 ppm and *S. agalactiae* at 853.33 and > 4,452,17 ppm respectively. Black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) and Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone) fed with turmeric extract at 25.0 ppm for 2 weeks had significantly better resistance against pathogenic *V. harveyi* when compared with control ($P < 0.05$). Study on immune functions revealed that both marine shrimps fed with turmeric extract had significantly higher phenoloxidase and bactericidal activity than the control. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.) fed with turmeric extract 20.0 ppm for 2 weeks had significantly better resistance against pathogenic *S. agalactiae* than the control ($P < 0.05$). Phagocytic and respiratory burst activity of tilapia were significantly higher than control after feeding with 20.0 ppm turmeric extract for 15 and 30 days. Similar results were found with creat extract experiment with shrimp immunity. After feeding with creat extract at 30.0 ppm for 2 weeks, both marine shrimps had better resistance against *V. harveyi* than control ($P < 0.05$). Phenoloxidase, phagocytic activity and bactericidal activity of treated shrimp were significantly higher ($P < 0.05$). Creat extract did not have any impact on resistance against *S. agalactiae* in Nile tilapia. However, phagocytic activity of tilapia fed with 10 ppm creat extract for 15 days was significantly higher than control. Study on total bacterial count in shrimp and tilapia intestine indicated the significantly lower number of bacteria and *Vibrio* spp. in all turmeric and creat extract-treated shrimp and fish when compared with the control.

The results from this study suggest that the turmeric and creat extract can effectively enhance the resistance against pathogenic bacteria of marine shrimp and Nile tilapia. These herb extracts can also enhance some immune functions and can effectively control the intestinal bacteria of these cultured aquatic animals.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นนทวิทย์ อารีรัชชกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษาทั้งในเรื่องการเรียน การทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนเป็นกำลังใจในการดำเนินชีวิต สนับสนุนส่งเสริมความก้าวหน้าทางการศึกษาให้มีโอกาสที่ดีในชีวิตมากขึ้น รวมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิติ ชูเชิด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ประทักษ์ ดาบทิพย์วรรณ อาจารย์ประธานการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย รองศาสตราจารย์ สพ. ญ. ดร. เจนนุช ว่องธวัชชัย อาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และ รองศาสตราจารย์ ดร. ชล่อ ติมสุวรรณ อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยในการสอบประมวลความรู้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. งามผ่อง คงคาทิพย์ จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติและเคมีอินทรีย์วิเคราะห์ (NPOS) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่เอื้อเฟื้อเรื่องการสกัด และการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ของขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร และขอขอบคุณน้องเอที่ช่วยสอนใช้ HPLC เพื่อวิเคราะห์ขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วชิรยา ฐิริวิโรจน์กุล ที่ช่วยสอนการตรวจวิเคราะห์ระบบภูมิคุ้มกันในกึ่ง ขอขอบคุณน้องฉัท น้องหนิงในการช่วยหาสัตว์น้ำ และดำเนินการทดลองในส่วนกึ่ง ขอขอบคุณน้องแอ๋ว น้องมิน น้องตึก และน้องเป๊ยก ในการช่วยเก็บตัวอย่าง รวมทั้ง พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำที่คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดจนการทำวิทยานิพนธ์เสร็จสิ้น

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่อบรม เลี้ยงดู และ สนับสนุนกำลังทรัพย์มาอย่างต่อเนื่องจนสำเร็จการศึกษา ขอขอบคุณพี่สาว น้องชาย และ จักร ที่คอยให้กำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์แก่ข้าพเจ้าจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

กิตติมา วานิชกุล

พฤษภาคม 2553

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	38
อุปกรณ์	38
วิธีการ	43
ผลและวิจารณ์	61
ผล	61
วิจารณ์	126
สรุปและข้อเสนอแนะ	139
สรุป	139
ข้อเสนอแนะ	141
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	142
ภาคผนวก	164
ภาคผนวก ก ตารางแสดงน้ำหนักเฉลี่ยของสัตว์น้ำทดลอง	165
ภาคผนวก ข สารเคมีและขั้นตอนต่าง ๆ	169
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	174

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ <i>V. harveyi</i> และ <i>S. agalactiae</i> ของสารสกัด ไขมันชั้นและฟ้าทะลายโจร	62
2	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด ไขมันชั้นและฉีดด้วยเชื้อ <i>V. harveyi</i>	63
3	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้น และฉีดด้วยเชื้อ <i>V. harveyi</i>	65
4	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด ไขมันชั้นและฉีดด้วยเชื้อ <i>S. agalactiae</i>	66
5	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้า ทะลายโจรและฉีดด้วยเชื้อ <i>V. harveyi</i>	68
6	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้า ทะลายโจรและฉีดด้วยเชื้อ <i>V. harveyi</i>	70
7	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้า ทะลายโจรและฉีดด้วยเชื้อ <i>S. agalactiae</i>	71
8	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหาร ผสมสารสกัดไขมันชั้นตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)	73
9	กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม สารสกัดไขมันชั้นตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (unit/นาที่/mg Protein)	74
10	percent phagocytosis ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้น ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	76
11	ค่า bactericidal activity ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้น ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	77
12	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหาร ผสมสารสกัดไขมันชั้นตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)	78

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (unit/นาทีก/mg Protein)	80
14	percent phagocytosis ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	81
15	ค่า bactericidal activity ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	83
16	ปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cells) ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)	84
17	ค่า hematocrit ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (เปอร์เซ็นต์)	85
18	ปริมาณ hemoglobin ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (g/dl)	87
19	จำนวน peripheral blood leukocytes ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)	88
20	ค่า respiratory burst ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (O.D.)	90
21	percent phagocytosis ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	92
22	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)	94
23	กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (unit/นาทีก/mg Protein)	95
24	percent phagocytosis ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	97

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
25	ค่า bactericidal activity ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟาทะลายโຈรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	98
26	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟาทะลายโຈรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)	99
27	กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟาทะลายโຈรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (unit/นาที่/ mg Protein)	101
28	percent phagocytosis ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟาทะลายโຈรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	103
29	ค่า bactericidal activity ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟาทะลายโຈรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	104
30	ปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cells) ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟาทะลายโຈรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)	105
31	ค่า hematocrit ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟาทะลายโຈรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (เปอร์เซ็นต์)	107
32	ปริมาณ hemoglobin ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟาทะลายโຈรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (g/dl)	108
33	จำนวน peripheral blood leukocytes ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟาทะลายโຈรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)	110
34	ค่า respiratory burst ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟาทะลายโຈรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (O.D.)	111
35	percent phagocytosis ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟาทะลายโຈรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	113
36	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน ($\times 10^7$ CFU/g)	115

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
37	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด ไขมันชั้น ($\times 10^9$ CFU/g)	117
38	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด ไขมันชั้น ($\times 10^9$ CFU/g)	119
39	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้า ทะลายโจร ($\times 10^7$ CFU/g)	121
40	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้า ทะลายโจร ($\times 10^9$ CFU/g)	123
41	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้า ทะลายโจร ($\times 10^{11}$ CFU/g)	125
ตารางผนวกที่		
ก1	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำหลังจากเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นเป็น เวลา 30 วัน	166
ก2	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวหลังจากเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นเป็น เวลา 30 วัน	166
ก3	น้ำหนักเฉลี่ยของปลานิลหลังจากเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นเป็น เวลา 30 วัน	167
ก4	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำหลังจากเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลาย โจรเป็นเวลา 30 วัน	167
ก5	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวหลังจากเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร เป็นเวลา 30 วัน	168
ก6	น้ำหนักเฉลี่ยของปลานิลหลังจากเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร เป็นเวลา 30 วัน	168

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นและฉีดด้วยเชื้อ <i>V. harveyi</i>	64
2	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นและฉีดด้วยเชื้อ <i>V. harveyi</i>	65
3	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นและฉีดด้วยเชื้อ <i>S. agalactiae</i>	67
4	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรและฉีดด้วยเชื้อ <i>V. harveyi</i>	69
5	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรและฉีดด้วยเชื้อ <i>V. harveyi</i>	70
6	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรและฉีดด้วยเชื้อ <i>S. agalactiae</i>	72
7	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)	73
8	กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (unit/นาที่/mg Protein)	75
9	percent phagocytosis ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	76
10	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)	79
11	กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (unit/นาที่/mg Protein)	80
12	percent phagocytosis ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	82
13	ปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cells) ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)	84

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	ค่า hematocrit ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (เปอร์เซ็นต์)	86
15	ปริมาณ hemoglobin ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (g/dl)	87
16	จำนวน peripheral blood leukocytes ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)	89
17	ค่า respiratory burst ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (O.D.)	90
18	percent phagocytosis ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	92
19	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)	94
20	กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด ฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (unit/นาที่/mg Protein)	96
21	percent phagocytosis ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	97
22	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)	100
23	กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด ฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (unit/นาที่/mg Protein)	101
24	percent phagocytosis ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	103
25	ปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cells) ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)	106

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
26	ค่า hematocrit ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (เปอร์เซ็นต์)	107
27	ปริมาณ hemoglobin ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (g/dl)	109
28	จำนวน peripheral blood leukocytes ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)	110
29	ค่า respiratory burst ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (O.D.)	112
30	percent phagocytosis ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	113
31	ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย <i>Vibrio</i> spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน ($\times 10^7$ CFU/g)	115
32	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน ($\times 10^7$ CFU/g)	116
33	ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย <i>Vibrio</i> spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน ($\times 10^9$ CFU/g)	117
34	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน ($\times 10^9$ CFU/g)	118
35	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน ($\times 10^9$ CFU/g)	119
36	ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย <i>Vibrio</i> spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร ($\times 10^7$ CFU/g)	121
37	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร ($\times 10^7$ CFU/g)	122

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
38	ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย <i>Vibrio</i> spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร ($\times 10^9$ CFU/g)	123
39	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร ($\times 10^9$ CFU/g)	124
40	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร ($\times 10^{11}$ CFU/g)	125
ภาพผนวกที่		
ข1	มาตรฐานโปรตีน (Bovine Serum Albumin)	173

บทบาทของสารสกัดขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) และฟ้าทะลายโจร
(*Andrographis paniculata* Wall. Ex Nees) ต่อภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ
และฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

**Roles of Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) and Creat (*Andrographis paniculata* Wall.
Ex Nees) Extract on Immunity of Aquatic Animals and Their Activities on the
Control of Pathogenic Bacteria**

คำนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสามารถทำรายได้ให้แก่ประเทศไทยปีละหลายแสนล้านบาท (กรมส่งเสริมการส่งออก, 2549) แต่เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์น้ำทั้งการเลี้ยงกุ้งและปลาเศรษฐกิจยังคงประสบปัญหาเรื่องโรคในการเลี้ยงตลอดมา ประกอบกับปัจจุบันการเลี้ยงเป็นแบบพัฒนา (Intensive) มีการปล่อยสัตว์น้ำในอัตราความหนาแน่นที่สูง ทำให้มีของเสียจากการขับถ่ายและการสะสมของสารอินทรีย์จากอาหารเหลือตกค้างในบ่อเลี้ยงเป็นปริมาณมาก ส่งผลให้สภาพแวดล้อมของการเลี้ยงสัตว์น้ำเสื่อมโทรม สัตว์น้ำเกิดความเครียดและมีภูมิคุ้มกันลดลง เชื้อโรคต่าง ๆ เข้าทำอันตรายได้ง่าย ทำให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาโรคเหล่านั้น แต่ลักษณะการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นไปอย่างพร่ำเพรื่อไม่มีการควบคุมปริมาณและชนิดของยาให้เหมาะสมกับโรค ซึ่งอาจทำให้สัตว์ได้รับยาปฏิชีวนะเป็นเวลานานจนเชื้อโรคเกิดการดื้อยา และทำให้การใช้ยาปฏิชีวนะในปริมาณเท่าเดิมไม่ได้ผลเท่าที่ควร นอกจากนี้การให้ยาปฏิชีวนะเป็นเวลานานอาจก่อให้เกิดการตกค้างในเนื้อสัตว์ เมื่อบริโภคสัตว์เหล่านี้เข้าไปจะมีการสะสมยาปฏิชีวนะในระยะยาว ซึ่งบางชนิดเมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วอาจเปลี่ยนไปเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงกว่าสารตั้งต้น หรืออาจเป็นสารก่อมะเร็ง (วลัยพร, 2544)

นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2545 มีปัญหาซึ่งส่งผลกระทบต่อวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำไทยอย่างมาก คือ การที่สหภาพยุโรป (อียู) ตรวจพบยาปฏิชีวนะตกค้างในสินค้ากุ้งจากประเทศไทย ส่งผลให้ทางรัฐบาลไทยสั่งกำหนดมาตรการในการควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์ที่เข้มางวดยมากยั้งขึ้น เพราะถ้ามีการตรวจพบยาปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อสัตว์ที่ส่งออก อาจส่งผลให้มีการสั่งห้ามนำเข้าสินค้าสัตว์น้ำจากประเทศไทยได้ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อทางเศรษฐกิจของประเทศเป็นมูลค่ามหาศาล

จากสาเหตุต่าง ๆ ดังกล่าวจึงทำให้มีการทดลองนำสมุนไพรมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจ เพื่อประโยชน์ทั้งในการรักษาโรคทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ และใช้เป็นสารเสริมสุขภาพของสัตว์น้ำ โดยเน้นการใช้สมุนไพรชนิดที่หาง่ายเพื่อการประยุกต์ใช้ในอนาคต ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทดลองใช้สมุนไพร 2 ชนิด ประกอบด้วย ขมิ้นชันซึ่งมีสารกลุ่ม Curcuminoids มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา สมานแผล ป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ด้านการอักเสบชนิดต่าง ๆ ทั้งชนิดเฉียบพลันและชนิดเรื้อรัง (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544 ก; ข) ส่วนอีกชนิด คือ ฟ้าทะลายโจร ซึ่งเป็นสมุนไพรที่มีสารสำคัญประเภท Lactone ชื่อ Andrographoline มีฤทธิ์ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการท้องเสีย และหลอดลมอักเสบ (ธิดารัตน์, 2534)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการใช้สารสกัดจากสมุนไพรชนิดมันชันและฟ้าทะลายโจรเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในการเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจ
2. ศึกษาการใช้สารสกัดจากสมุนไพรชนิดมันชันและฟ้าทะลายโจรเพื่อเสริมสุขภาพสัตว์น้ำเศรษฐกิจ



การตรวจเอกสาร

กุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798) ชื่อสามัญว่า Giant tiger shrimp เป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ ส่วนลำตัวมีเนื้อมาก เป็นชนิดที่พบทั่วไปในน่านน้ำของทุกประเทศในแถบเอเชีย ยกเว้น ประเทศญี่ปุ่นและประเทศจีน ขนาดใหญ่ที่เคยพบมีความยาวทั้งหมดจากกรีกถึงปลายหาง 363 มิลลิเมตร หรือ 36.3 เซนติเมตร เป็นขนาดที่ใหญ่ที่สุดของกุ้ง *Penaeus* ในฝั่งมหาสมุทรอินเดีย กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี ทนต่อความเค็มได้ในช่วงกว้าง ตั้งแต่ความเค็มใกล้เคียงกับความเค็มสูงสุดเกือบ 40 ppt จึงมีการนำมาเลี้ยงในฟาร์มกันมาก (ประจวบ, 2543)

1. ชีวิตวิทยาของกุ้งกุลาดำ

1.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

กุ้งกุลาดำถูกจัดอันดับทางอนุกรมวิธานไว้ตาม Motoh (1985) ดังนี้

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Superorder Eucarida

Order Decapoda

Suborder Natantia

Infraorder Penaeoidae

Family Penaeidae

Genus *Penaeus*

Species *Penaeus monodon*

1.2 รูปร่างลักษณะโดยทั่วไป

เป็นสัตว์ที่มีกระดูกหุ้มส่วนเนื้อ หรือมีเปลือกหุ้มลำตัว มีลักษณะเป็นแผ่นบางค่อนข้างแข็ง โดยมี 2 ชั้นซ้อนกันอยู่ โดยลำตัวแบ่งเป็นข้อและปล้อง มีทั้งหมด 19 ปล้อง เชื่อมติดกันเพื่อสะดวกในการเคลื่อนไหว แต่ละปล้องมีระยะ 1 คู่ แต่ละคู่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ส่วนของลำตัวแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ประกอบไปด้วย ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนลำตัว (บังอร, 2530; เบญจมินทร์, 2547) ลำตัวมีสีแดงอมน้ำตาลจนถึงน้ำตาลเข้ม มีลายพาดด้านหลังประมาณ 9 ลาย กรีด้านบนมีฟัน 6-8 ซี่ ด้านล่างมี 6-8 ซี่ ขอบหลังและขาว่ายน้ำมีขนเล็ก ๆ สีแดง ปลายขาเดินคู่ที่ 1 และ 2 มีสีน้ำตาลเข้ม (ปรกรณ์, 2531)

2. โรคกุ้งกุลาดำ

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยมีการพัฒนาไปเป็นการเลี้ยงแบบหนาแน่น เพื่อให้ได้ผลผลิตต่อพื้นที่มากที่สุด แต่สิ่งเหล่านี้ก่อให้เกิดผลกระทบอย่างมากต่อสภาพแวดล้อม เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเลี้ยง เช่น มีปริมาณสารอินทรีย์สะสม เกิดการเน่าเสียบริเวณพื้นบ่อ ทำให้มีการสะสมของปริมาณแอมโมเนียสูง สัตว์น้ำเกิดความเครียด พวกเชื้อโรคต่าง ๆ จะเข้าทำอันตรายสัตว์น้ำได้ โดยโรคที่พบในกุ้งกุลาดำประกอบไปด้วย

2.1 โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียเป็นปัญหาอย่างมากและทำความเสียหายกับกุ้งกุลาดำ ซึ่งโดยส่วนมากเป็นการก่อโรคแบบ secondary infection คือ เมื่อร่างกายของสัตว์น้ำอ่อนแอจากภาวะความเครียดที่เกิดขึ้น ทำให้แบคทีเรียสามารถเข้าทำลายได้จึงเรียกว่า opportunistic pathogen (Prosser *et al.*, 1996) แบคทีเรียที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ ได้แก่ *Vibrio* spp., filamentous bacterium, *Pseudomonas* sp., *Aeromonas formicans* และ *Flavobacterium* sp. (Lewis *et al.*, 1982 ; ครุณี และคณะ, 2530) แต่โรคที่ทำความเสียหายส่วนมากเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Vibrio harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิดจัดเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เชลล์เป็นแท่งตรงหรือโค้ง สามารถมีชีวิตอยู่ได้ทั้งมีและไม่มีอากาศ พบได้ทั่วไปทั้งน้ำจืดและน้ำทะเล แบคทีเรียพวกนี้ทำให้กุ้งป่วยและเปลือกมีสีน้ำตาลอ่อนเนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเอสเมาย่อยไคตินซึ่งเป็นส่วนประกอบของเปลือกกุ้งได้ นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถทำอันตรายตัวกุ้งเป็นแห่ง ๆ เช่น การเกิดอาการคล้าย

ฝักเสป (encapsulated abcess) ที่กล้ำเนื้อ เหงือก และอวัยวะภายใน หากพบวนการต่อต้านเชื้อโรคโดยการอักเสบไม่ได้ผล เชื้อโรคอาจเข้าสู่กระแสเลือด (septicemia) ทำให้กุ้งตายในที่สุด (Sindermann and Lightner, 1988)

2.2 โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส

พบเป็นปัญหาสำคัญในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำอย่างมาก เนื่องจากทำอันตรายต่อกุ้งและอาจส่งผลทำให้เกิดการตายได้ โดยเชื้อไวรัสที่ก่อโรคที่สำคัญ เช่น

2.2.1 White Spot Syndrome Virus (WSSV) เป็นสาเหตุของโรคตัวแดงดวงขาว กุ้งที่เป็นโรคนี้จะมีลักษณะอาการจุดขาวหรือดวงขาวที่บริเวณใต้เปลือกโดยเฉพาะส่วนหัว ด้านข้างลำตัว และส่วนหาง มีอาการว่ายน้ำเกยขอบบ่อ ไม่มีแรงติดตัว กินอาหารลดลง อัตราการตายเกิดอย่างรวดเร็วภายใน 1-2 วัน (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) เนื่องจากเชื้อไวรัสสามารถทำลายเนื้อเยื่อใต้เปลือก เหงือก อวัยวะสร้างเม็ดเลือด ต่อมเหงื่อ และเม็ดเลือด โดยทำให้นิวเคลียสของเซลล์บวมโต (กิจการ, 2538)

2.2.2 Yellow Head Virus (YHV) เป็นสาเหตุของโรคหัวเหลือง กุ้งที่เป็นโรคนี้มักมีลำตัวซีด มองเห็นส่วนหัวมีสีเหลืองเนื่องจากตับและตับอ่อน (hepatopancreas) มีสีซีดเหลือง เมื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของโรคที่ทำความเสียหายในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำทุกชนิดพบว่าโรคนี้ทำให้กุ้งตายเร็วและรุนแรงที่สุด (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

2.2.3 Monodon Baculovirus (MBV) และ Hepatopancreatic Parvo Virus (HPV) เป็นสาเหตุทำให้กุ้งโตช้า เนื่องจากไวรัสทำลายส่วนของ hepatopancreas ซึ่งทำหน้าที่หลักในการผลิตน้ำย่อยและสะสมอาหาร โดยส่วนมาก HPV สามารถแฝงตัวอยู่ได้ในกุ้งระยะตัวอ่อนจนถึง postlarvae แต่ไม่แสดงอาการจนกระทั่งเจริญเข้าสู่วัยรุ่นจะมีการตายเกิดขึ้น (Lightner, 1983) แต่ส่วน MBV สามารถตรวจพบได้ทั้งกุ้งระยะวัยอ่อนจนถึงกุ้งโต นอกจากนี้ทั้ง HPV และ MBV ยังทำให้นิวเคลียสของเซลล์มีขนาดใหญ่กว่าปกติ (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

2.3 โรคที่เกิดจากเชื้อปรสิต

ปรสิตส่วนใหญ่จะพบเกาะตามตัวและระยะไข่เป็นจำนวนมาก ทำให้กุ้งกินอาหารไม่ได้ เคลื่อนไหวไม่สะดวก ร่ายกายอ่อนแอและตายไป (ประจวบ, มปป.) นอกจากนี้ยังพบว่าปรสิตที่เกาะ มีผลต่อการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจนและการหายใจของกุ้ง โดยปรสิตที่พบมากเป็นพวกโปรโตซัว (peritrichous ciliate) ได้แก่ *Zoothamnium* sp., *Epitylis* sp., *Vorticella* sp., *Acineta* sp. และ *Lagenophrys* sp. (Brock, 1983) ในกรณีที่มีการเกาะของปรสิตไม่มากนัก เมื่อกุ้งลอกคราบปรสิตก็จะหลุดไปและสามารถหายเป็นปกติได้ (Sindermann and Lightner, 1988)

2.4 โรคที่เกิดจากเชื้อรา

ในกุ้งกุลาดำจะพบเชื้อราที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคในกุ้ง ได้แก่ *Leginidium* sp., *Saprolegnia* sp., *Siropidium* sp., *Leptolegenia* sp. และ *Fusarium* sp. (บังอร, 2530) โดยส่วนใหญ่ เชื้อราที่ก่อโรคในกุ้งเป็นพวก saprophytic fungi และถือเป็น opportunistic pathogen (Lightner, 1983) โดยเฉพาะ *Leginidium* sp. นั้นพบได้ตั้งแต่ระยะที่เป็นไข่จนถึง postlarvae ดันๆ โดยอาการภายนอกที่แสดง คือ กุ้งจะลงไปนอนกับพื้นบ่อ ไม่ค่อยกินอาหาร ลำตัวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองครีม มีจุดน้ำตาลอ่อนตลอดตัว กล้ามเนื้อเปื่อย การตายของกุ้งจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ หากแก้ไขไม่ทันอาจตายหมดบ่อภายใน 1-2 วัน (บังอร, 2530) ส่วนเชื้อรา *Fusarium solani* ซึ่งเป็น imperfungi สามารถทำให้เกิดโรคเหงือกดำ ซึ่งเหงือกมีสีดำคล้ายโคลนติดอยู่ กุ้งไม่กินอาหาร โตช้า และทยอยตายได้ (บรรจง, 2521)

กุ้งขาว

กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone) ชื่อสามัญว่า Pacific white shrimp หรือที่เรียกกันทั่วไปว่า White leg shrimp เป็นกุ้งพื้นเมืองในทวีปอเมริกาใต้ พบทั่วไปบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันออก และเนื่องจากเป็นกุ้งที่เลี้ยงง่ายและโตเร็ว จึงมีการนำเข้ามาเลี้ยงในทวีปเอเชียครั้งแรกในประเทศไต้หวันปี 2539 สำหรับประเทศไทยเริ่มมีการนำกุ้งชนิดนี้เข้ามาทดลองเลี้ยงตั้งแต่ปี 2541 เป็นต้นมา (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

1. ชีวิตวิทยาของกุ้งขาว

1.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

กุ้งขาวถูกจัดอันดับทางอนุกรมวิธานไว้ตาม (ภิญโญ, 2545) ดังนี้

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Order Decapoda

Family Penaeidae

Genus Penaeus Fabricius 1978

Subgenus Litopenaeus

Species *Litopenaeus vannamei*

1.2 รูปร่างลักษณะโดยทั่วไป

กุ้งขาวมีลำตัวขาวใส ขาสีขาว หางมีสีแดง โดยเฉพาะบริเวณปลายหางจะมีสีแดงเข้ม กริจะมีแนวตรงปลายงุ้มเล็กน้อย ฟันกรีด้านบนมี 8 อัน และด้านล่างมี 2 อัน กริยาวกว่าลูกตาไม่มากนัก มีเมือกบริเวณลำตัวมากกว่ากุ้งขาวอื่น ๆ และมีลำไส้ขนาดใหญ่ (ภิญโญ, 2545)

2. โรคกุ้งขาว

ตั้งแต่มีการนำกุ้งชนิดนี้เข้ามาเลี้ยงในประเทศไทย มีโรคหลายชนิดที่สำคัญและทำความเสียหายแก่กุ้งขาวมาก (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) ได้แก่

2.1 โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่มีบทบาทต่อโรคกุ้งขาวอย่างมาก คือ เชื้อ vibrio (*Vibrio* sp.) โดย *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* จะทำให้กุ้งกินอาหารลดลง ตัวกรอบแกรบ เปลือกนึ่ม ตัวกุ้งอาจมีสีแดง อัตราการตายสูง ส่วน *V. harveyi* นั้นทำให้กุ้งลอยหัว และมีการเรืองแสงในเวลากลางคืน หรือในที่มืด และจะมีการขึ้นขบบ่อ กินอาหารลดลงหรือไม่กินอาหารเลย โดยส่วนใหญ่ มักพบเชื้อแบคทีเรียในกระแสดเลือด และกล้ามเนื้อเป็นต้น (ฝ่ายวิชาการบริษัทไทยยูเนียน ฟีดมิลล์, 2549)

2.2 โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส

2.2.1 White Spot Syndrome Virus (WSSV) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคดวงขาว หรือ จุกขาว โดยอาการของโรคนี้คล้ายกันกับในกุ้งกุลาดำ คือ กุ้งป่วยจะมีดวงขาวหรือจุกขาวได้เปลือกบริเวณส่วนหัว จะเห็นได้ชัดเจนเมื่อดึงเปลือกส่วนหัวหลุดออกมาเนื่องจากว่ากุ้งขาวมีลำตัวขาวใส การสังเกตจุกขาวจะยากกว่ากุ้งกุลาดำ โดยพบโรคนี้ได้ตลอดทั้งปีแต่ส่วนใหญ่จะพบมากในช่วงการเลี้ยงที่มีอุณหภูมิต่ำลง คือ ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน ถึง เดือนมกราคม

2.2.2 Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคตัวพิการ โดยกุ้งขาวที่เป็นโรคตัวพิการจะมีลักษณะที่สังเกตง่าย คือ กริฝิดปกติ อาจ худหรือสั้นกว่าปกติ อาจบิดไปทางซ้ายหรือขวา นอกจากนั้นอาจพบว่ากุ้งมีลำตัวขรุขระหรือว่าคดงอ กุ้งที่เป็นโรคนี้จะโตช้ามาก มีอัตราการรอดในบ่อต่ำ พบได้ทั่วไปในระหว่างการเลี้ยงในบ่อตลอดปี

2.2.3 Taura Syndrome Virus (TSV) เป็นโรคไวรัสที่พบเฉพาะกุ้งขาว และทำความเสียหายอย่างมากในหลายประเทศ โดยในประเทศไทยมีรายงานครั้งแรกในช่วงเดือนเมษายนปี 2546 ในจังหวัดนครปฐม และ ฉะเชิงเทรา กุ้งที่ติดเชื้อนี้จะไม่แสดงลักษณะอาการของโรค มีเพียงลักษณะทางเนื้อเยื่ออย่างเดียวที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อ คือ การเกิด lymphoid organ spheroids (LOS) ซึ่งเป็นการรวมกลุ่มของเซลล์ในลักษณะเป็นก้อนกลมบริเวณ intertubular space และต้องมีการยืนยันด้วยเทคนิค in situ DNA hybridization หรือ RT-PCR

2.3 โรคที่เกิดจากปรสิต

โรค Microsporidians มีสาเหตุมาจากปรสิตในกลุ่ม microsporidia ได้แก่ *Ameson* (*Nosema*) *nelsoni*, *Pleistophora* sp., *Agmasoma penaei*, *Microsporidium* sp., *Thelohania duorura* และ *T. butler* โดยปรสิตเหล่านี้จะเข้าทำลายส่วนของกล้ามเนื้อและสร้างสปอร์จำนวนมาก ทำให้กล้ามเนื้อขุ่นขาวเป็นสีนํ้านม ถ้ามีอาการรุนแรงกุ้งจะมีอัตราการเจริญเติบโตช้า และอาจตายได้ (Brock and Main, 1994) นอกจากนี้ยังมีปรสิตที่เกาะอยู่ตามระยางค์และเหงือก ซึ่งอาจขัดขวางการทำงานของระบบการหายใจทำให้กุ้งอ่อนแอ และไม่ค่อยเคลื่อนที่ เช่น *โปรโตซัวชนิด Zoothamnium* sp. เป็นต้น (ฝ่ายวิชาการบริษัทไทยยูเนียน ฟีดมิลล์, 2549)

2.4 โรคอื่นๆ

โรคเงือกดำ พบได้ในกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อที่มีสีน้ำเข้มจัด มีปริมาณแพลงก์ตอนอย่างหนาแน่น และมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำน้อยหรือในบ่อมีการกระจายเลนอยู่ทั่วไป ซึ่งทำให้กุ้งส่วนใหญ่ในบ่อมีเหงือกสีดำคล้ายการอุดตันของตะกอนดิน หลังจากนั้นจะแสดงอาการป่วยและตาย ซึ่งถ้าเปลี่ยนน้ำและให้อากาศไม่เพียงพออาจทำให้เกิดการตายเป็นจำนวนมาก

ปลานิล

ปลานิลมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* (Linn.) เป็นปลาน้ำจืดที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา แต่สามารถแพร่ขยายพันธุ์ได้ดีจนแพร่กระจายไปทั่วโลก และประกอบกับเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย มีความแข็งแรง สามารถปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมได้ดี เจริญเติบโตรวดเร็ว และสามารถแพร่พันธุ์ได้เองตามธรรมชาติทำให้กลายเป็นปลาสกุลที่นิยมเพาะเลี้ยงกันทั้งในประเทศและต่างประเทศ (มานพ และคณะ, 2536)

1. ชีวิตวิทยาของปลานิล

1.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

ปลานิลถูกจัดอันดับทางอนุกรมวิธานไว้ตาม Nelson (1994) ดังนี้

Phylum Chordata

Subphylum Vertebrata

Superclass Gnathostomata

Class Actinopterygii

Subclass Neoterygii

Superorder Labroidei

Family Cichidae

Genus *Oreochromis*

Species *Oreochromis niloticus*

1.2 รูปร่างลักษณะโดยทั่วไป

ปลานิลมีรูปร่างลักษณะคล้ายปลาหมอเทศ ลักษณะพิเศษของปลานิล คือ จะมีริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน มีเกล็ด 4 แถวตรงบริเวณแก้ม และจะมีลายพาดขวางลำตัวประมาณ 9 - 10 แถบ มีนิสัยชอบอาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูงตามแม่น้ำ ลำคลองหนองบึง และทะเลสาบ เป็นปลาที่อยู่ได้ทั้งน้ำจืดและน้ำกร่อย คือ สามารถอยู่ได้ในที่มีความเค็มสูงสุด 20 ppt มีความอดทน และ

สามารถปรับตัวให้เข้ากับธรรมชาติได้ง่าย เนื่องจากสามารถมีชีวิตได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างมาก ตั้งแต่ 11 - 42 °C เหมาะที่จะนำมาเลี้ยงในบ่อ (มานพ และคณะ, 2536 ; สุทธิชัย, 2545)

2. โรคปลานิล

2.1 โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

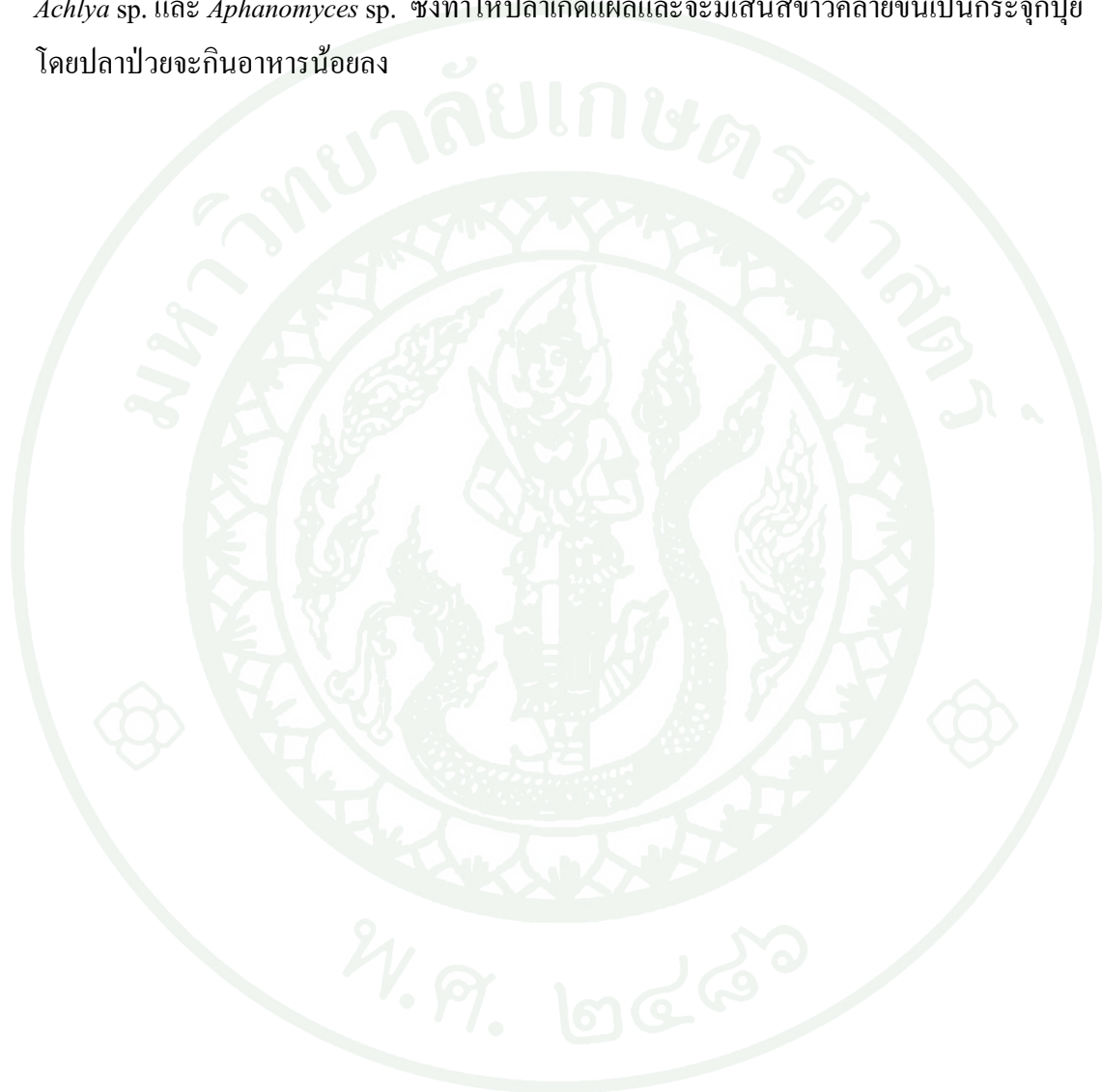
ปัญหาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียในปลานิลนั้น มักพบในบ่อเลี้ยงซึ่งมีอินทรีย์วัตถุสะสมมาก ๆ โดยเชื้อแบคทีเรียที่พบในปลานิล เช่น *Streptococcus* sp., *Aeromonas liquefaciens*, *Pseudomonas* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Myxobacterium* และ *Flexibacter columnaris* (มานพ และคณะ, 2536) แต่โรคแบคทีเรียที่ก่อความเสียหายกับปลานิลในประเทศไทยมาก คือ โรค Streptococcosis ซึ่งส่วนมากเกิดจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยปลานิลที่ติดเชื้อจะแสดงอาการภายนอก เช่น ลำตัวสีเข้ม ตาโปน ว่ายน้ำควงส่ว้น มีของเหลวในช่องท้อง และตกเลือดตามลำตัว ซึ่งปลาที่ป่วยมากจะมีการลอยหัวบนผิวน้ำในช่วงเช้าและตายได้ นอกจากนี้ยังมีผลต่อพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อตับ ม้าม และไต โดยมีการอักเสบและการตายของเซลล์ พบมีเม็ดเลือดขาวแทรกตัวเป็นจำนวนมาก และมีการคั่งของเลือดบริเวณเนื้อเยื่อ เป็นต้น (นเรศ และคณะ, 2548 ; ตรีญญา และคณะ, 2550 ; Areechon *et al.*, 2005)

2.2 โรคที่เกิดจากเชื้อปรสิต

ปรสิตที่เป็นสาเหตุของโรคในปลานิลนั้น มีทั้งปรสิตภายนอกและภายใน ซึ่งปรสิตภายนอกพบเกาะตามเหงือก ลำตัว และผิวหนังทำให้ปลาเกิดความระคายเคือง เกิดบาดแผล ส่วนพวกที่เกาะบริเวณเหงือกจะมีผลต่อระบบการหายใจ ทำให้ปลาขาดออกซิเจนได้ (ศิริ, 2542) ประกอบด้วยกลุ่มโปรโตซัว และ crustacean อย่างเช่น *Ichthyophthirius multifiliis*, *Costia* sp., *Trichodina* spp., *Argulus* sp., *Lernaea* sp. และ *Chilodonella* sp. เป็นต้น (มานพ และคณะ, 2536 ; นวลมณี, 2548) ส่วนปรสิตภายในมักพบในทางเดินอาหารและไม่ทำอันตรายต่อปลามากนัก แต่ถ้ามีปริมาณมากจะทำให้ปลาผอมได้ เช่น *Eimeria* sp., *Digenes*, *Cestodes*, *Nematodes* และ *Acanthocephalans* เป็นต้น (ศิริ, 2542)

2.3 โรคที่เกิดจากเชื้อรา

เชื้อราไม่ได้เป็นสาเหตุโดยตรงของโรคปลานิล แต่เป็นอาการแทรกซ้อนในกรณีที่ปลาอ่อนแอ หรือมีแผลบริเวณลำตัว คีรี (2542) รายงานว่าราที่เป็นสาเหตุของโรคในประเทศไทย ได้แก่ *Achlya* sp. และ *Aphanomyces* sp. ซึ่งทำให้ปลาเกิดแผลและจะมีเส้นสีขาวคล้ายขนเป็นกระจุกนูน โดยปลาป่วยจะกินอาหารน้อยลง



ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำกลุ่ม crustaceans

ระบบภูมิคุ้มกันโรคในสัตว์น้ำกลุ่ม crustaceans เป็นลักษณะการต่อต้านสิ่งแปลกปลอมแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immune response) จึงไม่มีการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดี ต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาคุกคามนั้น โดยระบบภูมิคุ้มกันที่ต้องทำงานร่วมกันแบ่งเป็น 2 ระบบ คือ ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ (cellular defenses) และ ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ (humoral defenses) (Ratcliffe *et al.*, 1985)

1. ชนิดและหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือด

เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) เป็นเซลล์ที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกัน (Ratcliffe *et al.*, 1985) นอกจากนี้ ได้มีการจำแนกเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งทะเลออกเป็น 3 ชนิด โดย กิจการและคณะ (2543 ก) , Martin and Graves (1985), Soderhall and Smith (1986) และ Soderhall and Cerenius (1992) คือ

1.1 Hyaline cells (non-granular cells, hyalinocyte หรือ hyalocytes) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่ไม่มี granule ใน cytoplasm เซลล์ชนิดนี้มีขนาดเล็กที่สุด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.4 - 8.3 ไมครอน (ในกรณีเซลล์กลม) หรือมีขนาดความกว้าง 2.5 - 3.6 ไมครอน ยาว 6.8 - 13.9 ไมครอน (ในกรณีเซลล์เป็นรูปกระสวย หรือกลม) มีรูปร่างกลมแบน ผิวเรียบ ไม่พบ microvilli หรือเท้าเทียม (pseudopodia) nucleus ขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์มีขอบเขตของ cytoplasm น้อย เมื่อย้อมติดสี Giemsa' stain มีหน้าที่ในขบวนการ phagocytosis ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย

1.2 Semi-granular cells (semi-granulocyte หรือ intermediated cells) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่อยู่ใน cytoplasm มี granule มีลักษณะและขนาดกึ่งกลางระหว่าง hyaline cell และ granular cells โดยเซลล์มีความกว้าง 4.2 - 6.8 ไมครอน ยาว 9.0 - 14.2 ไมครอน มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปกระสวย มีส่วนของ pseudopodia มากกว่า granular cells ลักษณะเซลล์ไม่แน่นอน nucleus มีขนาดเล็กตรงกลางเซลล์หรือขอบเซลล์ มักเกิดการ degranulation ได้ง่าย เป็นเม็ดเลือดที่ทำหน้าที่รับรู้และมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม โดยกระบวนการ nodule formation และ encapsulation รวมทั้งในเม็ดเลือดชนิดนี้มี prophenol activity ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบ prophenoloxidase activating system

1.3 Granular cells (granulocyte หรือ eosinophilic cells) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่ภายใน cytoplasm มี granule มาก เซลล์ชนิดนี้มีขนาดใหญ่ที่สุด เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ 8 - 10 ไมครอน กว้าง 7.2 - 7.8 ไมครอน ยาว 12.2 - 14.6 ไมครอน รูปร่างเป็นรูปไข่ รูปร่างโค้งคล้ายไต นิวเคลียสมีขนาดเล็ก เมื่อเทียบกับ semi-granular cells มีหน้าที่หลักเกี่ยวกับการทำงานของระบบ prophenoloxidase activating system เนื่องจากมี prophenol activity เช่นเดียวกับที่พบใน semi-granular cells

เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดจะทำหน้าที่เป็นสื่อกลางที่ทำให้เกิดระบบภูมิคุ้มกัน เนื่องจากสามารถเคลื่อนที่ไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายเมื่อมีการรุกรานเข้ามาของสิ่งแปลกปลอม ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา โดยเม็ดเลือดชนิดที่โตเต็มที่แล้วจะไม่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนอีก ดังนั้นเม็ดเลือดซึ่งสร้างมาจากเนื้อเยื่อที่สร้างเม็ดเลือดหรือ hemopoietic tissue จะทดแทนส่วนที่แก่และตายไป ซึ่งอวัยวะนี้พบอยู่ด้านบนของกระเพาะอาหารและโคนขาเดิน โดยอยู่เป็นกลุ่มในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและอยู่ใกล้แองโกลีค นอกจากนี้ในน้ำเลือดจะมีรงควัตถุ hemocyanin ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ (Ratcliffe *et al.*, 1985) และมีแร่ธาตุสำคัญคือ C, N, H, S และ Cu

2. ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ (cellular defenses)

2.1 Phagocytosis

กระบวนการ phagocytosis เป็นหน้าที่สำคัญของเม็ดเลือดในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่มีชีวิต และไม่มีชีวิตที่เข้ามาในร่างกาย (McKay and Jenkin, 1970) โดยเมื่อสิ่งแปลกปลอมเข้าเกาะบน membrane เม็ดเลือด เม็ดเลือดจะทำการยื่น cytoplasm ล้อมรอบสิ่งแปลกปลอม นำไปสู่การเพิ่มการนำออกซิเจน (respiratory burst) เข้าสู่เซลล์ ซึ่งออกซิเจนเหล่านี้จะถูกรีดิวซ์เป็น O_2^- (กระบวนการ respiratory burst) ด้วย NADPH oxidase ต่อจากนั้น O_2^- จะถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยการเร่งปฏิกิริยาด้วย superoxide dismutase (SOD) (Pick and Keisari, 1980) ซึ่ง O_2^- และ H_2O_2 มีบทบาทมากที่สุดในการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการ phagocytosis (สมบัติ, 2542)

2.2 Nodule formation และ encapsulation

เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่มีมากนอกเหนือจากที่ถูกกำจัดด้วยกระบวนการ phagocytosis โดยทั้ง nodule formation และ encapsulation ต้องอาศัย haemocyte จำนวนมากมาล้อมสิ่งแปลกปลอมไว้ (Smith and Soderhall, 1986) หลังจากนั้นจะเกิดรงควัตถุสีดำ (melanin) บริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดกระบวนการ ซึ่ง Lightner and Redman (1977) กล่าวว่า การเกิด melanin นี้ถูกกระตุ้นโดย prophenoloxidase system (proPO)

nodule formation เกิดกับสิ่งแปลกปลอมจำนวนมากที่เกินความสามารถของ phagocytosis โดย haemocyte จะทำการเรียงตัวรอบสิ่งแปลกปลอม เกิดก้อน nodule เพื่อไม่ให้สิ่งแปลกปลอมกระจายลุกลามต่อไป (Ratcliffe *et al.*, 1985)

encapsulation เกิดเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมขนาดใหญ่มากกว่า 10 ไมครอน เช่น พยาธิ เชื้อรา และสัตว์เซลล์เดียวขนาดใหญ่ โดย haemocyte จะเข้ามาล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมไว้ ซึ่ง haemocyte ที่มีหน้าที่ในกระบวนการนี้คือ semi-granular cells และ granular cells (Ratcliffe *et al.*, 1985) Persson *et al.* (1987) รายงานว่า semi-granular cells เป็น haemocyte พวกแรกที่เข้ามาเรียงตัวล้อมรอบสิ่งแปลกปลอม

3. ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ (humoral defenses)

3.1 Hemolymph clotting

เป็นกระบวนการแรกที่เกิดขึ้นภายหลังเกิดบาดแผล เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือด และป้องกันเชื้อโรคผ่านบาดแผล โดยเป็นการทำงานของ hyaline cells ซึ่งมี granule อยู่ภายในและเมื่อ granule แตกออก สารเคมีที่ถูกปล่อยออกมาจะไปกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ coagulogen ที่เป็นองค์ประกอบในสารน้ำซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน (Ratcliffe *et al.*, 1985; Martin *et al.*, 1993) และ Johansson and Soderhall (1989) พบว่าการแข็งตัวของเลือดจะเกิดขึ้นพร้อมกับการสร้าง melanin ที่เกิดในระบบ prophenoloxidase

3.2 Prophenoloxidase activating system

เป็นกลไกการป้องกันสิ่งแปลกปลอมที่สำคัญอย่างยิ่งในกลุ่ม crustacea (Johansson and Soderhall, 1989) โดย semi-granular cells และ granular cells จะเป็นแหล่งสร้างและเก็บเอนไซม์ต่าง ๆ ในระบบนี้ไว้ใน granule (Smith and Soderhall, 1991) ซึ่งใน granule ประกอบไปด้วย prophenoloxidase enzyme (proPO) (ซึ่งเป็นรูป pro-enzyme ของ phenoloxidase enzyme, PO) และ serine protease (PPA) ส่วนการทำงานของระบบนี้เริ่มเมื่อเกิดการ degranulation ของ haemocyte แล้ว serine protease จะกระตุ้นการเปลี่ยน prophenoloxidase ไปเป็น phenoloxidase (Ratcliffe *et al.*, 1985; Johansson and Soderhall, 1989) ซึ่งเป็น enzyme ที่มีความสามารถในการจับเกาะกับผิวของแบคทีเรีย และสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ และช่วยเร่งปฏิกิริยาจนทำให้สารกลุ่ม phenol กลายเป็น quinone เกิด melanin ขึ้น (Hose *et al.*, 1987; Johansson and Soderhall, 1989)

3.3 Bactericidin

พบสารนี้ได้ในส่วนน้ำเลือดกุ้ง มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมลบ และแกรมบวก นอกจากนี้ยังพบว่า สารดังกล่าวสามารถคงทนอยู่ได้ในอุณหภูมิ - 20 °C แต่จะเสื่อมสภาพไปเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 60 °C (นันทริกา, 2538) และ ชัยชาญ (2545) พบว่า bactericidin สามารถถูกชักนำให้มีปริมาณสูงขึ้นได้เมื่อได้รับสารกระตุ้นและมีความจำเพาะต่อเชื้อบางชนิด

3.4 Agglutinin

พบสารนี้ได้ในส่วนน้ำเลือดของครัสเตเชียน นอกจากจะเป็นสารก่อให้เกิดการจับตัวของสิ่งแปลกปลอมแล้ว ยังมีหน้าที่เป็น opsonin กระตุ้นกระบวนการ phagocytosis ในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ด้วย (Vargas-Albores, 1995)

3.5 Cytokine-link factors

cytokine เป็นโปรตีนที่ไม่ใช่แอนติบอดี (antibody) สร้างในสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม มีหน้าที่ช่วยรักษาสมดุลย์ของเลือดในระบบภูมิคุ้มกัน และช่วยประสานงานระหว่างระบบภูมิคุ้มกันกับระบบอื่น ๆ ในร่างกาย โดยช่วยกระตุ้นกระบวนการ phagocytosis ซึ่งสารที่แสดงคุณสมบัติได้แก่

โปรตีนขนาด 76 kDa (Smith and Chisholm, 1992) นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมการทำงานของ Prophenoloxidase activating system โดยช่วยให้ semi-granular cells และ granular cells เกิดการ degranulation มากขึ้น (Johansson and Soderhall, 1989) นอกจากนี้ยังช่วยในการยึดติระหว่างสิ่งแปลกปลอมกับเม็ดเลือดในขณะเกิด encapsulation (Smith and Chisholm, 1992)



ภูมิคุ้มกันปลา

ปลาเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ด้อยพัฒนาที่สุดในสัตว์จำพวกมีกระดูกสันหลัง แต่สามารถมีวิวัฒนาการในการสร้างภูมิคุ้มกันป้องกันตัวเองจากเชื้อโรคและปรสิตต่าง ๆ ได้ (ชลอ, 2528) โดยการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immunity) ของปลาแบ่งออกได้เป็น 2 ระบบ (ประพันธ์ศักดิ์, 2547; Shoemaker *et al.*, 2005) คือ

1. ระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Innate Immunity)

เป็นระบบที่มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของปลา เนื่องจากปลาอาศัยอยู่ในน้ำซึ่งเป็นแหล่งแพร่กระจายของเชื้อโรคหลายชนิด ดังนั้นกลไกการป้องกันตัวทางกายภาพ (physical defenses) ซึ่งประกอบไปด้วยผิวหนัง (skin) ที่ทำหน้าที่เป็นด่านแรกที่ป้องกันเชื้อโรคไม่ให้เข้าสู่ร่างกาย, เมือก (mucus) ซึ่งมีคุณสมบัติเหนียวจึงสามารถดักจับเชื้อโรคอย่างไม่จำเพาะเจาะจง และ เกล็ด (Scales) ซึ่งถือเป็นโครงสร้างพิเศษที่ใช้ป้องกันอันตรายต่าง ๆ ทั้งที่เป็นของแข็งและเชื้อโรคต่าง ๆ จึงเป็นองค์ประกอบด่านแรกที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และยังมีกลไกการป้องกันตัวโดยเซลล์ (Cellular defenses) ซึ่งจะตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหลังจากผ่านกลไกทางกายภาพเข้ามา โดยเซลล์ที่ทำหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันนี้ได้แก่ phagocytes ซึ่งหลาย เช่น macrophage และ polymorphonuclei cells (PMN) โดยเซลล์กลุ่มนี้จะดักจับกิน (engulfment) สิ่งแปลกปลอมอย่างไม่จำเพาะเจาะจง นอกจากนี้ยังมีกลไกการป้องกันตัวโดยผ่านสารน้ำ (humoral defenses) เช่น complement, lytic enzymes, transferin และ lactin ซึ่งโดยทั่วไปในกระแสเลือดจะมีการหลั่งสารโปรตีนสำคัญออกมาเช่นเดียวกับสัตว์ชั้นสูงเพื่อย่อยสลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม โดยทำให้เกิดการแตกสลาย (lysis) ของเซลล์เชื้อโรคอย่างไม่จำเพาะเจาะจง

2. ระบบภูมิคุ้มกันภายหลังการกระตุ้น (Adaptive หรือ Acquired Immunity)

การตอบสนองนี้จะเกิดขึ้นต่อเมื่อมีการกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอม (antigen) และการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมตัวเดิมจะรุนแรงและรวดเร็วกว่าในการตอบสนองครั้งที่สอง เนื่องจากการเป็นการทำงานที่มีความสามารถในการจดจำและความจำเพาะเจาะจงสูงมากต่อการตอบสนอง โดยการตอบสนองในระบบนี้จะอาศัยการทำงานร่วมกันของกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวหลาย ๆ ชนิด และ อาศัยโปรตีนบนผิวเซลล์ (epitope) เพื่อจดจำเชื้อโรค

โดยระบบการตอบสนองมีทั้งการตอบสนองทางสารน้ำ (humoral immune response) ซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันของเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocytes) โดยผลของการตอบสนองทำให้มีการสร้างโปรตีนที่สามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมอย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งเรียกลำนี้ว่า antibody หรือ immunoglobulin (Ig) โดยพบว่าปลาคะดุกแข็งแรงมีการสร้าง Ig เพียง 2 ชนิดเท่านั้น คือ IgM และ IgG เซลล์เม็ดเลือดขาวที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองได้แก่ monocyte (macrophage), neutrophil, dendritic cell และ lymphocyte กลุ่ม B และ T lymphocytes (B หรือ T cells) นอกจากนี้ยังมีการตอบสนองโดยผ่านทางเซลล์ (cell - mediated immune response) โดยการตอบสนองนี้มีความสำคัญอย่างมากต่อการติดเชื้อภายในเซลล์โดยเฉพาะเชื้อไวรัส ซึ่งมี Cytotoxic T cell (T killer cell) และ อาสัย Histocompatibility complex class II (MHC II) เป็นตัวช่วยในการจดจำอย่างจำเพาะเจาะจง

ขมิ้นชัน

ขมิ้นชันมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* Linn. มีชื่อพ้อง *C. domestica* Valetton, *C. domestica* Loir จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ซึ่งเป็นพืชวงศ์ขิง สกุลกระเจียว (*Curcuma*) มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Turmeric (ภาณุพรรณ, 2544; สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544 ก; หน่วยบริการฐานข้อมูลพืชสมุนไพรเศรษฐกิจ, 2548) , *Curcuma*, Indian saffron และ Yellow root และชื่อไทยหลายชื่อนอกจากขมิ้นชัน คือ ขมิ้น ขมิ้นแกง ขมิ้นหยอก ขมิ้นหัว ขมิ้น หมิ้น ดายอ และ สะยอ (พรเกียรติ, 2544; ภาณุพรรณ, 2544; สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544 ก; หน่วยบริการฐานข้อมูลพืชสมุนไพรเศรษฐกิจ, 2548) ขมิ้นชันเป็นสมุนไพรที่ได้รับการยกย่องว่ามีสรรพคุณทางยาจนถูกบรรจุอยู่ในตำรายาของหลายประเทศในทวีปเอเชีย ทั้งเอเชียใต้ เช่น อินเดีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเอเชียตะวันออก เช่น จีน ญี่ปุ่นเกาหลี รวมทั้งในยุโรป เช่น เยอรมัน ซึ่งสรรพคุณของขมิ้นอาจแตกต่างกันในแต่ละประเทศ แต่สรรพคุณที่คล้ายคลึงกันในเกือบทุกประเทศ คือ ช่วยบรรเทาอาการอาหารไม่ย่อยซึ่งสรรพคุณนี้ได้รับการยืนยันประสิทธิภาพโดยการทดลองทางคลินิกแล้วโดยนักวิจัยไทย (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544 ก) นอกจากนั้นยังมีการใช้เพื่อรักษาโรคต่าง ๆ เช่น แก้ไข้เรื้อรัง โรคผิวหนัง แก้เสมหะ แก้ท้องร่วง และยังใช้เป็นยาสมานแผล เป็นต้น (รุทธ์, 2545) ทำให้สมุนไพรชนิดนี้ถูกคัดเลือกให้บรรจุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544 ก)

1. รูปร่างลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ขมิ้นชันเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี ลำต้นเป็นเหง้าใต้ดินมีทั้งเหง้าหลักที่เจริญชูตั้ง รูปไข่หรือรูปไข่แกมรี บางครั้งเรียกเหง้าหลักว่า ส่วนหัว ด้านข้างของเหง้าหลักแตกแขนงในแนวราบ แต่ละแขนงมักแตกย่อยได้ต่อไปได้อีก 1 - 2 ครั้ง เหง้าแขนงรูปคล้ายทรงกระบอก หรือคล้ายนิ้วมือ บางครั้งเรียกว่า แง่ง เนื้อเหง้าสีส้มมีกลิ่นเฉพาะ ลำต้นเหนือดินเป็นลำต้นเทียมที่มีกาบใบเรียงซ้อนกันอัดแน่น สูงได้ถึง 1 เมตรหรือมากกว่า มีใบ 6 - 10 ใบต่อต้น ใบเดี่ยวสลับถี่ กาบใบยาว 40-60 เซนติเมตร แผ่นใบรูปรีหรือรีแกมขอบขนาน กว้าง 10 - 20 เซนติเมตร ยาว 30 - 70 เซนติเมตร โคนใบสอบแคบหรือมน ปลายใบแหลมมาก ช่อดอกรูปทรงกระบอก กว้าง 5 - 9 เซนติเมตร ยาว 10 - 20 เซนติเมตร มีใบประดับจำนวนมาก รูปรีแกมขอบขนาน เรียงเวียนถี่รอบแกนช่อดอก ใบประดับที่อยู่บริเวณโคนช่อดอกมีสีเขียวอ่อนหรือสีขาวแกมเขียว ยาว 5 - 6 เซนติเมตร กว้าง 2 - 3 เซนติเมตร ขอบโคนใบประดับประกบติดกับใบประดับที่อยู่ใกล้เคียงและติดกับแกนช่อดอกเกิดเป็นชอกคล้ายกระเปาะ ใบประดับที่อยู่บริเวณปลายช่อดอกมีสีขาวแกมเขียวอ่อน ปลายใบประดับ

มีแถบสีเขียวอ่อนหรือแถบสีชมพูอ่อน โคนใบประดับไม่ประกบติดกันเป็นกระเปาะ ดอกออกในช่อกระเปาะใบประดับ 3 - 5 ดอกต่อช่อ และทยอยบาน ดอกยาวประมาณ 5 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงสีขาวติดกันเป็นหลอดสั้น ปลายหยักไม่เท่ากัน กลีบดอกสีขาว โคนติดกันเป็นหลอดยาว ปลายผายและแยกออกเป็น 3 กลีบ กลีบกลางรูปไข่กลับ สีเหลืองอ่อนและมีแถบสีเหลืองเข้มบริเวณกลางกลีบ สองกลีบข้างรูปรีแกมขอบขนานสีเหลืองอ่อน เกสรตัวผู้ที่สมบูรณ์มีก้านสั้น อับเรณูเล็กเรียวและมีงอ ย โอบรอบก้านชูยอดเกสรตัวเมีย รังไข่ 3 ห้อง ผลกลมหรือรี แต่มักไม่ติดผล (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544 ก)

2. องค์ประกอบทางเคมี

ขมิ้นชันประกอบด้วยสารสำคัญประเภท เคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) ซึ่งเป็นสารให้สีเหลืองมีประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง (พรเกียรติ, 2544) โดยเป็นสารประกอบพวก diarylmethane (Mayer, 1943) ประกอบด้วยสาร 3 ชนิด คือ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin โดยมี curcumin เป็นองค์ประกอบหลัก (เรวดี, 2538; พรเกียรติ, 2544; สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544 ก) นอกจากนี้ Ciamician and Siber (1897) ได้เสนอสูตรโมเลกุลของ curcumin คือ $C_{21}H_{20}O_6$ ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยหมู่ orthomethoxylated phenol 2 หมู่มาเชื่อมกันด้วย β -diketone (Toshiya *et al.*, 2002) และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กำหนดมาตรฐานขมิ้นชันที่นำมาใช้ประโยชน์ต้องมี curcuminoids ไม่ต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ W/W (เรวดี, 2538)

นอกจาก curcuminoids ขมิ้นชันยังประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย (volatile oil) ที่มีสีเหลืองอ่อนมีประมาณ 3 - 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง (พรเกียรติ, 2544) ซึ่งมีสารสำคัญหลักคือ turmerone และ zingiberene นอกจากนี้ยังมีสารกลุ่ม sesquiterpenes และ monoterpenes อื่น ๆ อีกหลายชนิด (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544 ก) ซึ่ง Jackson and Menke (1882) ได้ทำการแยกองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยในขมิ้นชันพบ turmerone ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ที่มีสูตรโมเลกุล $C_{13}H_{18}O$ หรือ $C_{14}H_{20}O$ และต่อมาพบว่า turmerone เป็นสารผสมของ sesquiterpenes ketone โดยมี turmerone และ ar - turmerone (dehydroturmerone) เป็นองค์ประกอบ

3. ฤทธิ์ทางคลินิกและทางเภสัชศาสตร์

3.1 ฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

สารสกัดขมิ้น และน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด ทั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเน่าเน่า จุก เสียด หรือท้องเสีย (Lutomoski *et al.*, 1974; Bhavanishankar and Murthy, 1986) ขมิ้นสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้โดยยับยั้งการสร้างกรดและการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus acidophilus* และ *L. plantarum* แต่ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Streptococcus lactic* และ *S. faecalis* (Shankar and Murthy, 1978) แต่ยับยั้งการสร้างก๊าซจากเชื้อ *Escherichia coli* (Bhavanishankar and Murthy, 1986) ในสารสกัดแอลกอฮอล์ของขมิ้นและน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นก่อให้เกิดการเหนี่ยวนำเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ *Streptococci*, *Lactobacillus* และ *Staphylococcus* (Bhavani and Murthy, 1979) นอกจากนี้ monoterpene และ sesquiterpene ในน้ำมันหอมระเหยจากใบ และ sesquiterpene ketone ในน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าสามารถยับยั้ง *Escherichia coli* MTCC 433 ได้ที่ความเข้มข้น 15.62 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Uechi *et al.*, 2000) ในส่วนของ curcumin มีฤทธิ์ควบคุมเชื้อ *E. coli*, *Streptococcus* spp. และ *Staphylococcus* spp. แต่ไม่มีฤทธิ์ควบคุมเชื้อ *Proteus* spp. และ *Klebsiella* spp. ในจานเพาะเชื้อ (Wongseri and Siripong, 1995 ; Commandeur and Vermuenlen, 1996) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ควบคุมเชื้อ *S. aureus* แต่ไม่มีฤทธิ์ควบคุมเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* และ *Salmonella typhosa* ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ (Dahl *et al.*, 1989)

3.2 ฤทธิ์ลดการอักเสบ

มีผู้รายงานผลการทดลองว่าพบฤทธิ์ลดการอักเสบของผงขมิ้น น้ำคั้น สารสกัดขมิ้นด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ สารสกัดขมิ้นด้วยแอลกอฮอล์ และน้ำ (Arora *et al.*, 1971; Yegnanarayan *et al.*, 1976) สารสำคัญในการออกฤทธิ์ลดการอักเสบ คือ curcumin และอนุพันธ์ ซึ่งลดการอักเสบได้ดี (Arora *et al.*, 1971; Srimal and Dhawan, 1973; Yegnanarayan *et al.*, 1976; Rao *et al.*, 1982) และเมื่อเปรียบเทียบกับ phenylbutaxone พบว่ามีฤทธิ์พอ ๆ กันในกรณีการอักเสบเฉียบพลัน (Srimal and Dhawan, 1973) แต่ในกรณีการอักเสบเรื้อรังมีฤทธิ์เพียงครึ่งเดียวเท่านั้น โดยการที่ขมิ้นชันมีฤทธิ์ลดการอักเสบเฉียบพลันได้ดีกว่าการอักเสบเรื้อรังนั้น เนื่องจากความสามารถใน

การลดฮิสตามีน (histamine) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการอักเสบในระยะแรก โดยผ่านกระบวนการยับยั้ง trypsin หรือ hyaluronidase (Tripathi and Gupta, 1973; มัลลิกา, 2547)

การทดสอบฤทธิ์ของ curcumin และอนุพันธ์ที่สกัดจากขมิ้น พบว่า desoxycurcumin ออกฤทธิ์แรงที่สุด curcumin จะมีฤทธิ์ลดการอักเสบ เป็นสัดส่วนกับขนาดที่ใช้จนถึงขนาด 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อให้สูงกว่านี้ฤทธิ์จะลดลง (Rao *et al.*, 1982) นอกจากนี้ Mukhopadhyay *et al.* (1982) รายงานว่า sodium curcuminate และ tetrahydrocurcumin ออกฤทธิ์ลดการอักเสบดีกว่า curcumin โดยอาจเป็นผลมาจากความสามารถในการละลายน้ำ ต่อมา มีรายงานที่ curcumin ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ leukotrine B₄ ซึ่งทำให้เกิดการอักเสบได้ (Ammon *et al.*, 1992)

3.3 ฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา

สารสกัดขมิ้นที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ และ สกัดด้วย chloroform มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง (Sambainah *et al.*, 1982; Satoskar and Shenoy, 1986) นอกจากนี้มีผู้นำน้ำมันขมิ้นชันไปทดลองฆ่าเชื้อราหลายชนิด พบว่าส่วนของน้ำมันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Curvularia oryzae*, *gypseum*, *Penicillium corybiferum*, *P. javanicum*, *P. lilacinum*, *Trichoderma viride* และ *Trichophyton mentagrophytes* (Banetjee and Nigam, 1978) นอกจากนี้ Apisariyukul *et al.* (1995) รายงานว่าน้ำมันขมิ้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราพวก dermatophytes ในหนู guinea pig ที่ระดับ dilution 1 : 40-1 : 320 เชื้อราพวก pathogenic fungi ถูกยับยั้งที่ dilution 1 : 40-1 : 80 ได้แต่ไม่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของยีสต์ได้ ส่วน curcumin ไม่มีผลยับยั้งเลย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hermann and Martin (1991)

3.4 ฤทธิ์ต้านปรสิต

Dhar *et al.* (1968) พบว่าสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์และน้ำ (1 : 1) ที่ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มีผลฆ่าเชื้ออะมีบา (*Entamoeba histolytica*) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคบิด

3.5 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ขมิ้นชันเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณด้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant) ช่วยลดการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation (Reddy and Lokesh, 1994) โดย Miquel *et al.* (1992) พบว่า curcumin มีสรรพคุณต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน โดยป้องกันการเกิด peroxidation ของไขมันและโคเลสเตอรอล

3.6 ฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน

Liu (1996) พบว่าขมิ้นชันช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยทำให้มีกระบวนการของ macrophage (macrophage rate) และ การพัฒนาของเซลล์ lymphoblastoid (lymphoblastoid transformation) เพิ่มขึ้น Jagetia and Aggarwal (2007) รายงานว่า curcumin มีผลกระตุ้นการทำงานของ T-cells, B-cells, macrophages, neutrophils, natural killer cells และ dendritic cells และควบคุมการทำงานของ proinflammatory cytokines บางตัวที่สร้างจาก leukocyte นอกจากนี้ Allam (2009) รายงานว่า หนูที่ได้รับ curcumin มีระดับ interleukin (IL)-12 และ tumor necrosis factor alpha (TNF- α) ลดลง แต่มีการตอบสนองต่อ soluble worm antigen (SWAP) และ soluble egg antigen (SEA) ดีขึ้น

ฟ้าทะลายโจร

ฟ้าทะลายโจรมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Andrographis paniculata* Wall. Ex Nees (เต็ม, 2523) มีชื่อพ้อง *Jasticia paniculata* (ครุณี และคณะ, 2533) จัดอยู่ในวงศ์ Acanthaceae ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกับตีนเป็ด โดยเมื่อฝีกแก่จะแตก (ณพพร, 2530) มีชื่อภาษาอังกฤษว่า creat (พยอม, 2521) halviva, kariyat, krent, green chiretta, creyat root, the creat, green chiretta kreat และ creyat root (เกษตรกลางกรุง, 2539 ; พเยาว์, 2529) มีชื่อไทยหลายชื่อเรียกแตกต่างกัน เช่น ภาคกลาง เรียก ฟ้าทะลายโจร และ น้ำลายพังพอน ภาคเหนือ เรียก ต้นตามยาม จังหวัดสงขลา เรียก หล้าตามงู จังหวัดร้อยเอ็ด เรียก ต้นสามสิบคี เป็นต้น เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยา และมีรสขมมากจนมีการขนานนามพืชชนิดนี้ว่าเป็นจ้าวแห่งความขม หรือ King of the bitterness (เกษตรกลางกรุง, 2539) ฟ้าทะลายโจรมีการใช้เป็นยาอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ เช่น ในประเทศอินเดียใช้เป็นยาสามัญประจำบ้านสำหรับเด็กที่มีอาการผิดปกติของทางเดินอาหาร (นิจศิริ และ พยอม , 2534) นอกจากนี้ยังใช้เป็นยาขมเจริญอาหาร ใช้รากและใบแก้ไข้ แก้ปวดท้อง ประเทศอินโดนีเซีย ใช้ใบแก้ไข้และโรคผิวหนัง (ชาติริ และ ครุณี, 2531) ส่วนประเทศจีนได้จัดฟ้าทะลายโจรเข้าไว้ในยาดำราหลวง โดยใช้เป็นยารักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (ถัดดาวัลย์, 2535) หรือแม้ประเทศไทยเองก็จัดทำให้สมุนไพรชนิดนี้บรรจุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติเนื่องจากสรรพคุณทางยานั่นเอง (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544 ข)

1. รูปร่างลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ฟ้าทะลายโจรเป็นพืชล้มลุก สูง 30 - 100 เซนติเมตร ลำต้นมักเป็นสี่เหลี่ยม ใบเดี่ยวออกตรงข้าม และมักสลับตั้งฉากกับลำต้น ก้านใบยาว 3 - 10 มิลลิเมตร แผ่นใบรูปไข่หรือรี กว้าง 1 - 4 เซนติเมตร ยาว 2 - 12 เซนติเมตร โคนใบแหลม ปลายใบแหลมมาก ขอบใบหยักตื้นหรือเรียบ ใบใกล้ปลายยอดมักมีขนาดเล็กลง ผิวด้านบนสีเข้มกว่าด้านล่าง เส้นใบมีข้างละ 5 - 7 เส้น ช่อดอกออกที่ยอดหรือที่ง่ามใบใกล้ยอด ช่อโปร่งยาว 5 - 30 เซนติเมตร ดอกสีขาวแกมม่วง มีขน กลีบเลี้ยงโคนติดกัน ปลายแยกเป็น 5 กลีบ ยาว 3 - 4 เซนติเมตร ปลายเรียวแหลม มีขน กลีบดอกส่วนล่างติดกันเป็นหลอดยาว 5 - 7 มิลลิเมตร ส่วนบนแยกเป็นรูปปากเปิด ด้านนอกมีขน ด้านในเกลี้ยง กลีบปากบนยาว 5 - 7 เซนติเมตร ปลายหยักเว้าแหลม 3 แฉก สีขาวมีแต้มสีม่วงเข้ม กลีบปากล่างยาวไล่เลี่ยกัน ปลายหยักแหลม 2 แฉกสีขาว เกสรตัวผู้ 2 อัน ติดที่บริเวณปากหลอดกลีบดอก ก้านชูอับเรณูยาว 6 - 8 มิลลิเมตร มีขน อับเรณูมีสีม่วงเข้ม มี 2 ห้อง รังไข่อยู่

เหนือวงกลีบดอก ก้านช่อดอกเสี้ยวเมียวโค้งแนบชิดกับก้านชูอับเรณู ยอดเกสรตัวเมียเรียวยาว ผลหรือฝักรูปขอบขนานค่อนข้างแบน กว้าง 2 - 4 มิลลิเมตร ปลายและโคนแหลม เมื่อแก่ผลแตกสองซีก มีเมล็ด 8 - 14 เมล็ด ขนาดเล็กสีน้ำตาลแดง รูปคล้ายสี่เหลี่ยม ผิวขรุขระ (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544 ข)

2. องค์ประกอบทางเคมี

ฟ้าทะลายโจรมีสารเคมีหลายประเภท แต่สารออกฤทธิ์สำคัญมี 2 กลุ่ม คือ สารกลุ่ม lactone ที่สำคัญ ได้แก่ andrographolide, neoandrographolide และ deoxyandrographolide และสาร flavone ได้แก่ andrographin และ paniculin ฟ้าทะลายโจรสามารถยับยั้งแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุของการเป็นหนองได้ (กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร, 2533) นอกจากนี้ยังพบสารประเภท lactone อื่น ๆ แต่มีปริมาณน้อย เช่น deoxy - oroxylin, wogonin และ andrographidine A เป็นต้น (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544 ข)

มีผู้ทำการแยกสารในฟ้าทะลายโจรได้ผลึกสารไม่มีสี ซึ่งมีสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{30}O_5$ และมีชื่อว่า andrographide และ Gorter (1911) ได้ทำการพิสูจน์โครงสร้างที่แยกได้นั้น พบว่าเป็นส่วนประกอบของ lactone ชนิดหนึ่ง และเปลี่ยนชื่อเป็น andrographolide ต่อมา Allison *et al.* (1968) ทำการแยกสารได้ 3 ชนิด คือ paniculide A, B และ C จาก tissue culture ของฟ้าทะลายโจร

นอกจากนี้ นันทวัน (2529) ได้รวบรวมชื่อสารเคมีที่มีผู้วิจัยพบในส่วนต่าง ๆ ของฟ้าทะลายโจรดังนี้

1. ส่วนราก - andrographolide
andrographin
apigenin-4, 7- dimethylether
apigenin-4, 7- di-o-methylether
5-Hydroxy-2, 3, 7, 8-tetramethy flavone
5-Hydroxy-7, 8-tetramethy flavone
panicolin
sitosterol

mono-o methylwightin

2. ส่วนลำต้น - andrographoside

andrographiside

dioxyandrographolide

3, 4-dioxyandrographolide

14-deoxyandrographolide

andrographolide

3. ส่วนทั้งต้น - andrographolide

11, 12-didehydro-14-deoxyandrographolide

14-deoxyandrographolide

14- deoxy-11-oxyandrographolide

neo-andrographolide

2-cis-6-trans farnesol

2-trans-6-trans farnesol

4. ส่วนใบ - paniculide A

paniculide B

paniculide C

andrographolide

neoandrographolide

deoxyandrographolide-19-B-D-glucopyranoside

deoxyandrographolide

caffeic acid (3, 4- dihydroxy-cinnamicacid)

chlorogenic acid

3, 5-dicaffeoyl-d-quinic acid

Ninandrographolide

นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบสารต่อไปนีที่ไม่ระบุว่าจะศึกษามาจากส่วนใดของพืช

2, 5-dihydroxy-7, 8 dimethoxy flavone

5-hydroxy-7, 8- dimethoxy flavone

5-hydroxy-2, 7, 8- trimethoxy flavone

dioxyandrographolide

paniculide

paniculide A

paniculide B

paniculide C

andrographolide

neoandrographolide

andrographolide

14-deoxyandrographolide

bisabolone

diterpenoides

farnesol

kalmegin

3.ฤทธิ์ทางคลินิกและทางเภสัชศาสตร์

3.1 ฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

สุรชันี และคณะ (2533) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของฟ้าทะลายโจรในการต้านเชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลองพบว่า สารสกัดฟ้าทะลายโจร, crude lactone และ deoxyandrographolide มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งเชื้ออันเป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงและเชื้อหนองได้ ส่วน andrographolide และ neoandrographolide ไม่มีผล นอกจากนี้ ธีรารัตน์ (2534) ได้ทำการศึกษาถึงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ใบฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 70 และ 85 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิด สามารถรักษาโรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* , *Salmonella krefeld*, *S. typhi* และ *อหิวาต์* ได้เท่ากัน แต่ถ้าจะใช้รักษาโรคบิดไม่มีตัว (*Shigella dysenteriae*) ควรใช้สารที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 85 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์ทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแกรมบวก นันทวัน (2529) ได้รวบรวมผลการศึกษาพบว่า ส่วนรากที่สกัดด้วยน้ำ

จะมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง ส่วนทั้งต้นที่สกัดด้วยเมธานอล 50 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Proteus vulgaris* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแทรกซ้อน ส่วนใบที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง (*Staphylococcus aureus*) และแบคทีเรียในลำไส้ (*E. coli*)

นวลตา และคณะ (2538) ทำการทดลองสารสกัดและสารสำคัญจากฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วย 95 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ จากส่วนใบ กิ่ง และก้าน ได้สารสกัดประเภท lactone 4 ชนิด ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม laddan ประกอบไปด้วย andrographolide, 14 - deoxyandrographolide, 14 - deoxy - 11, 12 - didehydroandrographolide และ neoandrographolide เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *Streptococcus* Gr. A, *Streptococcus* Gr. B และ *Staphylococcus aureus* พบว่าสารสกัดบางชนิดมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้เล็กน้อย โดยเฉพาะ *Streptococcus* Gr. A แต่สารบริสุทธิ์ทั้ง 4 ชนิดที่ได้ไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับจริยา (2536) ที่พบว่าสารบริสุทธิ์ทั้ง andrographolide, deoxyandrographolide และ neoandrographolide ที่ความเข้มข้น 1-4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* gr. A, B, C, D และ E, *Shigella* spp., *Strephylococcus aureus* ATTC 25923 และ *E. coli* ATTC 25922 ได้ วิษณุ และ สุรภี (2533) รายงานว่าสารบริสุทธิ์ neoandrographolide ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* เลย ในขณะที่สารบริสุทธิ์ andrographolide และ dehydroandrographolide ขนาด 20 - 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อดังกล่าวอย่างมาก

3.2 ฤทธิ์ลดการอักเสบ

Madav *et al.* (1996) ได้ทดลองใช้สารสกัด andrographolide ในการลดการอักเสบของข้อต่อในหนูขาว (rats) ด้วยการให้กินในขนาด 30, 100 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าขนาดของ granuloma ที่เหนี่ยวนำให้เกิดไว้ก่อนสามารถลดขนาดลงได้ ส่วนในคุณสมบัติด้านการแพ้ (allergy) นั้น พบว่า andrographolide สามารถลด degranulation ของ mast cells ของหนูขาว จึงทำให้ลดปริมาณการหลั่งของสาร histamine ทำให้อาการแพ้ลดลง (Madav *et al.*, 1998)

3.3ฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน

Puri *et al.* (1993) ทดสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของฟ้าทะลายโจรในหนูทดลอง พบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ทั้งในลักษณะ antigen specific และ nonspecific โดยในการทดสอบยังพบอีกว่า ฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์มีประสิทธิภาพดีกว่า นอกจากนี้ andrographolide, 14 – deoxyandrographolide และ 14 - deoxy - 11, 12 – didehydroandrographolide สามารถต้านทานเซลล์มะเร็งในคนได้หลายแบบ และโมเลกุลทั้ง 3 ยังทำให้มีการเพิ่มของ interleukin (IL)-2 ที่ก่อให้เกิด peripheral blood lymphocytes (HPBLs) (Kumar *et al.*, 2004)

3.4 ฤทธิ์ด้านอื่น ๆ

ศิริมา และคณะ (2532) ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดฟ้าทะลายโจรในการยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร โดยวิธีทำให้เกิดความเครียดในหนูถีบจักรพบว่า การให้ใบสมุนไพรฟ้าทะลายโจรจะช่วยลดขนาดของแผลที่เกิดจากความเครียดได้ นอกจากนี้ Madav *et al.* (1995) ทดลองให้สัตว์ได้รับสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 100 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าสามารถลดไข้ และลดรอยแผลของโรคในระบบทางเดินอาหาร

เพ็ญญา (2539) ได้ทำการศึกษาผลของการใช้สารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ผลิตในรูปแบบแคปซูลเพื่อใช้ในการรักษาอาการเจ็บคอในเด็กและผู้ใหญ่ โดยเปรียบเทียบกับเพนนิซิลิน พบว่าหลังได้รับยาพบว่าทั้งอาการไข้และสภาพภายในคอไม่แตกต่างกัน เกินร้อยละ 75 ที่หายป่วยและอาการดีขึ้น และกว่าร้อยละ 15 พบว่ามีอาการดีขึ้น

Choudhury and Poddar (1985) ได้รายงานว่า andrographolide จาก *Andrographis paniculata* กระตุ้นให้เกิดการย่อยในลำไส้ (intestinal digestion) และ การดูดซึมของ carbohydrate ดีขึ้น

การใช้สมุนไพรในสัตว์

ปัจจุบันได้มีการนำสมุนไพรมาทดลองใช้กับสัตว์ทั้งสัตว์บกและสัตว์น้ำเพื่อเป็นการเสริมสุขภาพในลักษณะการป้องกันโรค และการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย เช่น

1. ขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรในสัตว์บกและสัตว์น้ำ

ยุทธนา และคณะ (2545) ทำการทดลองพบว่าฟ้าทะลายโจร 250 มิลลิกรัม/โหล/วัน สามารถรักษาโรคท้องร่วงในสุกรได้โดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม

ชัยวัฒน์ และคณะ (2547) ศึกษาการใช้ขมิ้นชันเป็นสารต้านออกซิเดชันต่อสภาพภูมิคุ้มกัน และสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อซึ่งอยู่ในสภาวะเครียด พบว่า ไก่กลุ่มที่ได้รับการเสริมขมิ้นชันในอาหารปริมาณ 2 กิโลกรัมต่ออาหาร 1 ตัน หรือ คิดเป็นปริมาณสาร curcuminoid 100 ส่วนในล้านส่วน มีแนวโน้มให้คุณลักษณะการเจริญเติบโต และ ค่าสัดส่วนของอวัยวะน้ำเหลือง ต่อน้ำหนักตัวที่สูงกว่า นอกจากนี้ยังให้ค่า H/L ratio และ TBARS ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เสริมขมิ้นชันในอาหาร

มะลิ และคณะ (2547) ได้ทำการศึกษาผลของสมุนไพรไทย 3 ชนิดต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค การเจริญเติบโต อัตรารอด สุขภาพกุ้ง และความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ พบว่าสารสกัดขมิ้นชัน และฟ้าทะลายโจรเข้มข้น 250 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp. 15 ไอโซเลตได้ในหลอดทดลอง ขณะที่สารสกัดพญาปล้องทองมีประสิทธิภาพน้อยมากในการยับยั้งแบคทีเรียในสกุลเดียวกัน ส่วนในการศึกษาผลของสมุนไพรในอาหารต่อภูมิคุ้มกันกุ้งกุลาดำนั้น พบว่าสารสกัดจากพญาปล้องทอง 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดี นอกจากนี้กุ้งที่ได้รับอาหารผสมขมิ้นชันไม่เกิน 25 มก./กก. นาน 7 - 14 วันสามารถต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้มากขึ้น ขณะที่กุ้งชุดที่ได้รับฟ้าทะลายโจรในระดับ 25 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นาน 14 วัน มีความต้านทานต่อเชื้อ White Spot Syndrome Virus (WSSV) สูงขึ้น

มัลลิกา (2547) พบว่าลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่ได้รับสารสกัดจากขมิ้นชันผสมอาหารสำเร็จรูปที่ระดับ 5 และ 10 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและน้ำหนักที่

เพิ่มขึ้นต่อตัวสูงกว่าชุดควบคุม และชุดทดลองที่ผสมสารสกัดจากขมิ้นชันที่ระดับ 3 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

2. สมุนไพรชนิดอื่น ๆ ในสัตว์น้ำ

สุเมตต์ (2534) พบว่าสารสกัดฮอร์โมนลอกคราบจากพืช 8 ชนิด คือ หญ้าพันงูขาว (*Achyranthes aspera*) หญ้าพันงูแดง (*Cyathula prostrata*) บานไม่รู้โรยป่า (*Gomphrena celosioides*) ผักโขมหิน (*Trianthema portulacastrum*) ผักเบี้ยทะเล (*Sesuvium portulacastrum*) หม่อน (*Morus alba*) ตีนนก (*Vitex pinnata*) และ ฟ่ำเลี่ยน (*Vitex canescens*) มีค่า LD_{50} ที่ 96 ชั่วโมง อยู่ระหว่าง 0.347 - 3.7 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักกุ้ง ส่วนในการทดสอบการลอกคราบของกุ้งกุลาดำพบว่าสารสกัดฮอร์โมนลอกคราบจากพืชสามารถร่นระยะเวลาการลอกคราบทั้งในระยะ premoult และ intermoult โดยที่ความเข้มข้นต่ำ (LD_0) ร่นระยะเวลาลอกคราบโดยเฉลี่ย 1.957 วัน (27.71 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นปานกลาง (LD_{25}) ร่นระยะเวลาลอกคราบโดยเฉลี่ย 2.29 วัน (26.53 เปอร์เซ็นต์) และที่ความเข้มข้นสูง (LD_{50}) ร่นระยะเวลาลอกคราบโดยเฉลี่ย 1.17 วัน (30.18 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

สถาพร และ อุษณีย์ (2535) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งกับเชื้อไวรัสโอทีแบคที่ได้จากกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค จำนวน 23 สายพันธุ์ คือ *Vibrio harveyi* 9 สายพันธุ์, *V. splendidus* 7 สายพันธุ์, *V. parahaemolyticus* 2 สายพันธุ์, *V. minicus* 1 สายพันธุ์, *V. vulnificus* 1 สายพันธุ์, *V. fluvaris* 1 สายพันธุ์, *V. cholerae* 1 สายพันธุ์ และ *V. alginolyticus* 1 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อแบคทีเรีย 21 สายพันธุ์จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตด้วยสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เชื้อ *V. splendidus* 1 สายพันธุ์ และ *V. minicus* 1 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ และพบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัด 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ทุกสายพันธุ์

สถาพร และคณะ (2536) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบพญาขอต่อเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากใบพญาขอมีฤทธิ์ในการทำลายไวรัสหัวเหลือง (Yellow head baculovirus) (Inactivation) โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายไวรัสหัวเหลือง มีค่าเท่ากับ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ค่า LD_{50} ของสารสกัดต่อกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 15 มีค่าสูงถึง 2468 ± 7.8 ppm ซึ่งแสดงว่าสารนี้มีพิษต่อกุ้งกุลาดำน้อยมาก

นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากใบพญาขอมมีผลกระตุ้นให้ขบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) ในกึ่งกลาดำเพิ่มขึ้นด้วย

สถาพร และคณะ (2539 ก) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการทำลายเชื้อไวรัส Yellow Head Baculo Virus (YHV) ที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลืองในกึ่งกลาดำของสารสกัดจากสมุนไพรไทย 9 ชนิด คือ กะเพรา (*Ocimum sanctum*) กะเม็ง (*Eclipta alba*) ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata*) ชิงช้าชาลี (*Tinospora cordifolia*) บอระเพ็ด (*T. crispata*) มะยม (*Phyllanthus acidus*) มะขามป้อม (*P. emblica*) ฟาทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) และสารภีทะเล (*Calophyllum inphyllum*) พบว่าสารสกัดจากสมุนไพร 5 ชนิด คือ กะเพรา, ชุมเห็ดเทศ, บอระเพ็ด, มะยมและสารภีทะเลที่ฉีดเข้าไปในกึ่งกลาดำสามารถยับยั้งไวรัส YHV ได้ โดยกึ่งมีอัตราการรอดตายถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชิงช้าชาลีให้ผลในการยับยั้งเพียง 80 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนกึ่งที่ทดสอบ และปริมาณต่ำสุดของสารสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดที่สามารถยับยั้งไวรัส YHV คือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สมุนไพรทั้ง 5 ชนิดนี้มีความเป็นพิษต่อลูกกึ่งกลาดำระยะโพสลาวา 15 น้อยที่สุดหากใช้ในปริมาณนี้ โดยมีค่า LD₅₀ ที่ 24 ชั่วโมง ปริมาณสูงถึง 1,987 - 3,548 ส่วนในล้าน

สถาพร และคณะ (2539 ข) ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยบางชนิดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่ทำให้เกิดโรคในกึ่งกลาดำ พบว่าจากสมุนไพรที่ศึกษาทั้งหมดมีที่น่าสนใจอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ ใบฝรั่งและมะระขี้นก เนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อได้แม้จะใช้สารสกัดในระดับความเข้มข้นต่ำเพียง 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับระดับความเข้มข้นเดียวกันพบว่า มะระขี้นกมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ได้ดีกว่าใบฝรั่ง

ชลิดา และคณะ (2540) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและเชื้อตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลาดำ โดยผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ละลายใน K-199 ให้มีความเข้มข้น 10,000, 7,500, 5,000, 2,500, 1,000, 100, 10 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กับเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เจือจาง 1: 1,000,000 และ 1: 1,000,000 ตามลำดับ นำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อกึ่งกลาดำขนาด 7.09-15.68 กรัม แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 7 วัน พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดได้ โดยกึ่งมีอัตราการรอด 50 เปอร์เซ็นต์แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนความเข้มข้นที่ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด โดยกึ่งมีอัตรา

รอด 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่า การให้กุ้งกุลาดำน้ำหนักเฉลี่ย 14.60 กรัม กินอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยในระดับความเข้มข้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป วันละ 2 ครั้ง นาน 7 วัน สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งโดยให้ค่า phenoloxidase activity ในเลือดเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สถาพร และคณะ (2540) ทำการศึกษาฤทธิ์การทำลายเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว (SEMBV) ของสารสกัดจากสมุนไพรไทย 8 ชนิด คือ พญาขอ (*Clinacanthus nutans*), ฝรั่ง (*Psidium guajava*), ก้างปลาเครือ (*Phyllanthus reticulatus*), มะยม (*Phyllanthus acutus*), ธรณีสาร (*Phyllanthus pulcher*), ลูกใต้ใบ 2 ชนิด ได้แก่ *Phyllanthus amarus*, *Phyllanthus debelis* และหญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria*) พบว่าสมุนไพรทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ให้ผลในการยับยั้งเชื้อไวรัส SEMBV โดยสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ ไวรัส SEMBV ได้ดีที่สุด คือ หญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria*) โดยทำให้กุ้งที่ใช้ทดสอบมีอัตราการรอดตายถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อัตราการรอดตายของกุ้งที่ฉีดด้วยสมุนไพรชนิดอื่นอยู่ระหว่าง 58 - 85 เปอร์เซ็นต์

สถาพร และคณะ (2541) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของใบฝรั่งและออกซีเตตราซัยคลินในการกำจัดแบคทีเรียเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ โดยฉีดสารสกัดจากใบฝรั่งเข้มข้น 10 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และออกซีเตตราซัยคลินเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เข้ากล้ามเนื้อปล้องที่ 6 ของกุ้งตัวละ 0.2 มล. แล้วฉีดแบคทีเรียเรืองแสง (*V. harveyi*) ที่มีความเข้มข้น 1.4×10^{10} CFU/มล เข้ากล้ามเนื้อกุ้งตัวละ 0.2 มล. หลังจากนั้น 30 นาที ทำการเจาะเลือดกุ้งที่บริเวณโคนขาที่ 3 แล้วนำมาตรวจหาปริมาณแบคทีเรียในเลือดกุ้งโดยวิธีการกระจายเชื้อ พบว่าปริมาณของแบคทีเรียเรืองแสงในน้ำเลือดกุ้งจะลดลงอย่างรวดเร็วในทุกชุดทดลอง และประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรียเรืองแสงของกุ้งกุลาดำที่ได้รับสารสกัดจากใบฝรั่งดีกว่าในกลุ่มที่ได้รับออกซีเตตราซัยคลิน โดยเปอร์เซ็นต์การลดลงของแบคทีเรียในชุดที่ได้รับสารสกัดจากใบฝรั่งเข้มข้น 10 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 68.05, 62.99 ส่วนในกลุ่มที่ได้รับออกซีเตตราซัยคลินมีค่าเพียง 51.4 เปอร์เซ็นต์

ชลิดา และคณะ (2542) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ พบว่าการให้กุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 14.60 กรัม ได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้น 2,500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร วันละ 2 ครั้ง นาน 7 วัน สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งโดยมีค่า phenoloxidase

activity ในน้ำเลือดเพิ่มมากกว่าในกุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับ 1,000 และ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่เป็นพิษต่อกุ้งกุลาดำ โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์รอดของกุ้งกุลาดำหลังได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับต่าง ๆ

ภัสสร และคณะ (2543) ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบ *Phyllanthus amarus* Linn. ในการต้านแบคทีเรีย (Bactericidin) ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) โดยการป้อนและฉีดตามความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากฉีด 1 และ 6 ชั่วโมง ทำการคูนน้ำเลือดกุ้ง (Hemolymph) เพื่อนำมาหาค่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย พบว่าเปอร์เซ็นต์ในการต้านแบคทีเรียของสารที่ผลิตในตัวกุ้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกชุดการทดลอง

ลิลลา และคณะ (2543) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพและผลข้างเคียงของการใช้พญาขอ (*Clinacanthus nutans*) ในการป้องกันโรคหัวเหลือง ซึ่งเกิดจาก Yellow Head Virus (YHV) และโรคจุดขาวซึ่งเกิดจาก Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV) ในกุ้งกุลาดำ พบว่าจากวันที่ 1 ถึงวันที่ 7 หลังจากเติมเชื้อลงในสารละลายพญาขอเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำทะเลความเค็มตั้งแต่ 10-30 ppt พญาขอมีประสิทธิภาพทำลาย YHV ได้เฉลี่ย 100, 78.3, 78.3, 66.7, 63.3 และ 50 เปอร์เซ็นต์ และทำลาย WSSV ได้เฉลี่ย 80, 75, 63.7, 60.0, 53.3 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการใช้พญาขอผสมอาหารให้กุ้งกินอัตราที่เหมาะสมอยู่ที่ 0.1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการป้องกัน YHV ได้เฉลี่ย 50, 72.2, 55.6 และ 94.4 เปอร์เซ็นต์ หลังจากกุ้งได้รับพญาขอที่ผสมอาหารโดยการกินติดต่อกัน 7, 14, 21 และ 28 วันตามลำดับ และประสิทธิภาพในการป้องกัน SEMBV ได้สูงสุดที่ 33.36 เปอร์เซ็นต์ และ YHV ที่ 36.36 เปอร์เซ็นต์หลังจากกุ้งได้รับอาหารผสมพญาขอติดต่อกันเป็นเวลา 14 และ 28 วันตามลำดับ และเมื่อทดลองใช้พญาขอในอัตราที่สูงกว่า 10 เท่าของปริมาณที่ใช้ข้างต้น ก็ไม่เกิดผลข้างเคียงต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกันและสุขภาพกุ้งในแง่ของชนิด และปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ เลือด ตับ และตับอ่อน ตลอดจนพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในทางเดินอาหารของกุ้ง

หยาดรุ้ง (2544) ศึกษาผลของสารสกัดพืชสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ในการเก็บรักษากุ้งกุลาดำแช่แข็ง พบว่าสารสกัดหยาบจากกระเทียมสดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยตัวอย่างที่แช่สารสกัดกระเทียมสดมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลงจาก 2.33×10^4 โคโลนีต่อกรัม เป็น 3.10×10 โคโลนีต่อกรัม เมื่อเวลาผ่านไป 90 วัน ($P < 0.05$) ส่วนตัวอย่างที่ไม่ได้แช่สารสกัดมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดจาก 7.10×10^4 โคโลนีต่อกรัม เป็น

7.90 x 10² โคโลนีต่อกรัม เมื่อเวลาผ่านไป 90 วัน ($P < 0.05$) นอกจากนี้ตัวอย่างที่แช่กระเทียมสด มีจำนวน *Salmonella* spp. ลดลงจาก 1.50 x 10² โคโลนีต่อกรัม และตรวจไม่พบ *Salmonella* spp. เมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน ($P < 0.05$) ส่วนกึ่งกลาดำสดที่ไม่ได้แช่ด้วยสารสกัดกระเทียมสดมีจำนวน *Salmonella* spp. ลดลงจาก 3.63 x 10² โคโลนีต่อกรัม และตรวจไม่พบ *Salmonella* spp. เมื่อเวลาผ่านไป 20 วัน ($P < 0.05$) สำหรับตัวอย่างกึ่งกลาดำตากและเติมด้วยเบคทีเรียที่เรี่ยที่นำมาทดสอบ 8 สายพันธุ์ พบว่าตัวอย่างที่แช่สารสกัดหยาบจากกระเทียมสด และที่ไม่ได้แช่ด้วยสารสกัดกระเทียมสดให้ผลใกล้เคียงกัน คือมีจำนวนเบคทีเรียทั้งหมดลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 90 วัน ($P < 0.05$)

วิเศษฐ์ (2546) ได้ทำการศึกษาการใช้พืชสมุนไพร Family Cucurbitaceae ในการป้องกันและกำจัดเชื้อไวรัสในการเพาะเลี้ยงกึ่งกลาดำ พบว่าสารสกัดจากเมล็ดสุกของมะระขี้นก (*Momordica charantia*) ขนาด 12 มิลลิกรัมต่อกึ่งหนึ่งกิโลกรัมที่ให้โดยการฉีด หรือ ให้กึ่งกินโดยผสมอาหารที่ความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักนั้น มีประสิทธิภาพเพิ่มอัตราการรอดของกึ่งกลาดำที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยกรณีการให้สารสกัดทางปาก (ผสมอาหาร) เพิ่มอัตราการรอดของกึ่งกลาดำที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มซึ่งไม่ได้รับสารสกัดมีอัตราการรอดเพียง 25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรณีที่ให้ยาโดยการฉีดแม้ว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดมีอัตราการรอดสูงขึ้นแบบไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อัตราการตายลดลงอย่างชัดเจนหลังจาก 8 วันที่กึ่งได้รับเชื้อไวรัส หลังจาก 10 วัน พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดมีอัตราการรอดสูงถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มไม่ได้รับสารสกัดนั้นตายหมด

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

การทดลองที่ 1 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสัตว์น้ำ

1.1 อุปกรณ์

1.1.1 สารสกัดขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ในลักษณะ crude extract ซึ่งได้จากการสกัดเหง้าขมิ้นด้วยแอลกอฮอล์ 95 % แล้วทำการ evaporation เอาตัวทำละลายออก และนำไปวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ด้วย High performance liquid chromatography (HPLC) พบสาร curcuminoids 25.726 % (w/w) จากการวิเคราะห์ของหน่วยปฏิบัติการวิจัยผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติและเคมีอินทรีย์วิเคราะห์ (NPOS) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.1.2 สารสกัดฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) ในลักษณะ crude extract ซึ่งได้จากการสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยแอลกอฮอล์ 95 % แล้วทำการ evaporation เอาตัวทำละลายออก และนำไปวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ด้วย High performance liquid chromatography (HPLC) พบสาร andrographolide 10.654 % (w/w) จากการวิเคราะห์ของหน่วยปฏิบัติการวิจัยผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติและเคมีอินทรีย์วิเคราะห์ (NPOS) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.1.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer ยี่ห้อ Milton Roy รุ่น 401)

1.1.4 เครื่องนึ่งความดันสูง (Autoclave)

1.1.5 เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)

1.1.6 อุปกรณ์เครื่องแก้ว เช่น ขวดรูปชมพู่ (Flask), หลอดทดลอง (Test tube), บีกเกอร์ (Beaker) และ ปิเปต (Pipette) เป็นต้น

1.1.7 เครื่องซั่งสารทศนิยม 3 ตำแหน่ง

1.1.8 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

1.1.9 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow)

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2.1 Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS)

1.2.2 Tryptic Soy Agar (TSA)

1.2.3 Mueller Hinton Broth (MHB)

1.2.4 Nutrient Agar (NA)

1.2.5 Plate Count Agar (PCA)

1.3 สารเคมี

1.3.1 น้ำกลั่น

1.3.2 Sodium chloride 0.85 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (0.85 และ 1.5% NaCl)

1.3.3 แอลกอฮอล์

1.4 แบคทีเรียทดลอง

1.4.1 *Vibrio harveyi* แยกจากกุ้งป่วย (stock จากห้องปฏิบัติการ)

1.4.2 *Streptococcus agalactiae* แยกจากปลานิลป่วย (stock จากห้องปฏิบัติการ)

การทดลองที่ 2 การศึกษาการใช้สารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรเพื่อเสริมสุขภาพในสัตว์น้ำ

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 กุ้งกุลาดำและกุ้งขาวน้ำหนักระมาณ 10-12 กรัม และ ปลานิลน้ำหนักระมาณ 60-70 กรัม

2.1.2 Loop เขี่ยเชื้อ

2.1.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์

2.1.4 เครื่องชั่งน้ำหนักและเครื่องชั่งตวงวัด 3 ตำแหน่ง

2.1.5 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

2.1.6 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow)

2.1.7 กระบอกฉีดขนาด 1 และ 3 มิลลิลิตร และ เข็มฉีดขนาด 24 G และ 26 G x 1 นิ้ว

2.1.8 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

2.1.9 Microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตร

2.1.10 สไลด์นับเม็ดเลือด (Haemocytometer)

2.1.11 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge ยี่ห้อ Hettich รุ่น mikro 200 R)

2.1.12 Hot plate

2.1.13 โกร่งบด (Homogenizer)

2.1.14 เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)

2.1.15 ถังจุ่มความร้อนกำลังขยายสูง

2.1.16 เครื่องนึ่งความดันสูง (Autoclave)

2.1.17 กระดาษกรอง 0.22 ไมครอน

2.1.18 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer ยี่ห้อ Milton Roy รุ่น 401)

2.1.19 เครื่องแก้ว เช่น จานแก้ว (Petri-dish), หลอดทดลอง (Test tube), แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Triangle), ปิเปต (Pipette) และ แผ่นปิดสไลด์ (Cover slide) เป็นต้น

2.1.20 Cornical centrifuge tube 15 มิลลิลิตร

2.1.21 ยีสต์ (Heat – killed yeast)

2.1.22 เครื่อง Semi – automated microcell counter machine model F - 820

2.1.23 หลอดแก้วขนาดเล็ก (microcapillary tube)

2.1.24 96 wellplate

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2.1 Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS)

2.2.2 Tryptic Soy Broth (TSB) + 1.5 % NaCl

2.2.3 Tryptic Soy Agar (TSA) + 1.5 % NaCl

2.2.4 Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI - 1640 medium)

2.3 สารเคมี

2.3.1 Medium-199

2.3.2 1.5 % NaCl และ 2.6 % NaCl

2.3.3 Potassium chloride (KCl)

2.3.4 Magnesium chloride ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

2.3.5 Magnesium sulphate hydrated ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

2.3.6 Sodium dihydrogen orthophosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

2.3.7 Sodium chloride (NaCl)

2.3.8 Calcium chloride dehydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

2.3.9 L-glutamic (L-glutamic acid-5-amide, $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$)

2.3.10 Hepes (4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulonic acid, $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$)

2.3.11 Trisodium citrate

2.3.12 Cacodylate buffer pH 7.4 (sodium cacodylate trihydrate, $\text{Na}(\text{CH}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)

2.3.13 Trypsin 0.1 เปอร์เซ็นต์ (0.1 % Trypsin)

2.3.14 L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine, $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_4$)

2.3.15 Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3)

2.3.16 Disodium carbonate 2 เปอร์เซ็นต์ (2 % Na_2CO_3)

2.3.17 Copper sulphate 0.5 เปอร์เซ็นต์ (0.5 % CuSO_4)

2.3.18 Potassium tartrate 1 เปอร์เซ็นต์ (di-potassium tartrate hemihydrate ($\text{C}_4\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_6 \cdot$

$\text{O} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 1 % $\text{C}_4\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_6 \cdot \text{O} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

2.3.19 Folin (Ciocalteu's phenol reagent)

2.3.20 Glucose

2.3.21 Heparin

2.3.22 Histopaque - 1077

2.3.23 Methanol

2.3.24 Nitroblue tetrazolium

2.3.25 Potassium hydroxide (KOH)

2.3.26 Dimethyl sulphoxide (DMSO)

2.4 แบคทีเรียทดลอง

2.4.1 *Vibrio harveyi* แยกจากกุ้งป่วย (stock จากห้องปฏิบัติการ)

2.4.2 *Streptococcus agalactiae* แยกจากปลาฉลามป่วย (stock จากห้องปฏิบัติการ)

การทดลองที่ 3 การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของสัตว์น้ำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นและฟัทะลายโจร

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 โกร่งบด (Homogenizer)

3.1.2 เครื่องมือผ่าตัด เช่น กรรไกร, มีดผ่าตัด และปากคีบ เป็นต้น

3.1.3 Automatic pipette ขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

3.1.4 เครื่องแก้ว เช่น จานแก้ว (Petridish), หลอดทดลอง (Test tube) และ แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Triangle) เป็นต้น

3.1.5 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

3.1.6 ตู้เขยเชื้อ (Laminar air flow)

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Ager (TCBS)

3.2.2 Plate Count Agar (PCA) + 1.5 % NaCl

3.3 สารเคมี

3.3.1 น้ำกลั่น

3.3.2 1.5 % NaCl

3.3.3 แอลกอฮอล์

วิธีการ

การทดลองที่ 1 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสัตว์น้ำ

1.1 การศึกษาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Streptococcus agalactiae* (in vitro) ของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร

1.1.1 การศึกษาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Streptococcus agalactiae* (in vitro) ของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร (ดัดแปลงตาม Sahm and Washington II, 1991)

1.1.1.1 การเตรียมสารละลายเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Streptococcus agalactiae*

นำเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ผสม 1.5 เปอร์เซ็นต์ NaCl บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว (single colony) นำโคโลนีที่ได้ละลายในสารละลาย 1.5 % NaCl และเจือจางเชื้อให้ได้จำนวน 1.0×10^6 CFU/ml โดยทำการนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี Total Plate Count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS

นำเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ single colony นำโคโลนีที่ได้ละลายในสารละลาย 0.85 % NaCl และเจือจางเชื้อให้ได้จำนวน 1.0×10^6 CFU/ml โดยทำการนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี Total Plate Count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

1.1.1.2 การเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร

เตรียม stock solution ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ให้มีความเข้มข้นเป็น 5,120, 512, 64 และ 8 ppm ตามลำดับ ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้แอลกอฮอล์

95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำลายสารสกัดสมุนไพร หลังจากนั้นเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB) เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 4,096, 2,048, 1,024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 และ 1 ppm ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นขั้นต้นที่ใช้ในการทดลอง เพื่อหาความเข้มข้นยับยั้งต่อไป

1.1.1.3 การดำเนินการทดลอง

ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร คูดสารละลาย stock solution ของสารสกัดสมุนไพรลงในหลอดทดลองความเข้มข้นละ 1 หลอด หลังจากนั้นคูดสารละลายเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Streptococcus agalactiae* ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (แยกทดลองตามชนิดของเชื้อ) ลงในหลอดทดลองร่วมกับสารสกัดสมุนไพรในแต่ละความเข้มข้น ส่งผลให้สารละลายแบคทีเรียมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5×10^5 CFU/ml และ ระดับความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรลดลงครึ่งหนึ่ง (two-fold dilution) โดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำในแต่ละชนิดของสมุนไพร และให้มีหลอดควบคุม (control) เพื่อใช้ประกอบการอ่านผล ซึ่งประกอบไปด้วย หลอดผลบวก (positive control) โดยเติม MHB 1 มิลลิลิตรผสมกับ stock solution ของสารสกัดสมุนไพรในแต่ละความเข้มข้น 1 มิลลิลิตร และ หลอดผลลบ (negative control) โดยเติม MHB 1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายแบคทีเรีย 1 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายต่าง ๆ ในแต่ละหลอดทดลองให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

1.1.1.4 การอ่านผลการทดลอง

ภายหลังจากบ่มเชื้อได้ 18 - 24 ชั่วโมงแล้ว จึงนำมาอ่านผลโดยถ้าพบว่า สารละลายหลอดใดขึ้นแสดงว่าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตในอาหาร MHB ได้ ซึ่งแสดงว่าความเข้มข้นของสารละลายสมุนไพรระดับนั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ ส่วนสารละลายหลอดใดไม่แสดงว่าแบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้ พิจารณาได้ว่าความเข้มข้นของสารละลายสมุนไพรระดับนั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ โดยค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารทดลอง

1.1.2 การศึกษาค่า Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Streptococcus agalactiae* (In vitro) ของสารสกัดสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร (ดัดแปลงตาม Stratton and Cooksey, 1991)

1.1.2.1 การดำเนินการทดลอง

เมื่อได้ค่า MIC แล้ว เขย่าหลอดแต่ละหลอดด้วยเครื่อง Vortex mixer แล้วใช้ micropipette คูดสารละลายแบคทีเรียจากหลอดความเข้มข้นสูงสุดที่ขึ้น (มีการเจริญเติบโตของเชื้อ) และ หลอดใสทุกหลอดทดลองปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร (100 μ l) หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS แล้วทำการ spread plate นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง สำหรับการทดสอบเชื้อ *V. harveyi* และจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่ผสม 1.5 % NaCl สำหรับการทดสอบเชื้อ *S. agalactiae*

1.1.2.1 การอ่านผลการทดลอง

ภายหลังจากบ่มเชื้อได้ 18 - 24 ชั่วโมงแล้ว ทำการตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. harveyi* และ *S. agalactiae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และถ้าพบว่าแบคทีเรียในสารละลายความเข้มข้นใดสามารถเจริญได้ โดยมีโคโลนีปรากฏให้เห็น พิจารณาได้ว่าความเข้มข้นของสารละลายสมุนไพรระดับนั้นไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ และความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายสมุนไพรระดับใดสามารถทำให้ไม่เกิดการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พิจารณาได้ว่าที่ความเข้มข้นของสมุนไพรระดับนั้นสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นได้ (ค่า MBC)

1.2 การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Streptococcus agalactiae* ของสัตว์น้ำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร

1.2.1 เตรียมสัตว์ทดลอง

1.2.1.1 กุ้งกุลาดำและกุ้งขาว

นำกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวน้ำหนักประมาณ 10-12 กรัม (แยกทดลองตามชนิดของกุ้งทดลอง) มาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาดความจุ้น้ำ 1.5 ลูกบาศก์เมตรเป็นเวลา 7 วันก่อนการทดลองเพื่อปรับสภาพสัตว์ทดลอง โดยเลี้ยงในน้ำที่มีระดับความเค็ม 20 ppt และให้อาหารสำเร็จรูปปกติ 4 มื้อ คือที่เวลา 8.00 น., 13.00 น., 18.00 น. และ 23.00 น. เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 2 วัน ให้อากาศตลอดเวลา หลังจากนั้นนำกุ้งแยกใส่บ่อทดลองซึ่งเป็นบ่อซีเมนต์ขนาดความจุ้น้ำ 1.5 ลูกบาศก์เมตรจำนวน 12 บ่อโดยใส่กุ้งบ่อละ 20 ตัว ใช้ดาข่ายพรางแสงคลุมเพื่อลดปริมาณแสง มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 2 วัน และให้อากาศตลอดการทดลอง

1.2.1.2 ปลานิล

นำปลานิลแปลงเพศน้ำหนักประมาณ 60-70 กรัม มาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาดความจุ้น้ำ 1.5 ลูกบาศก์เมตร เป็นเวลา 7 วันก่อนการทดลองเพื่อปรับสภาพสัตว์ทดลอง และให้อาหาร 2 มื้อ คือที่เวลา 8.00 น. และ 16.00 น. มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 2 วัน ให้อากาศตลอดเวลา หลังจากนั้นนำปลานิลแยกใส่บ่อซีเมนต์ขนาดความจุ้น้ำ 1.5 ลูกบาศก์เมตรจำนวน 12 บ่อ โดยใส่ปลาบ่อละ 15 ตัว ใช้ดาข่ายพรางแสงคลุมเพื่อลดปริมาณแสง มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 2 วัน และให้อากาศตลอดการทดลอง

1.2.2 อาหารและการให้อาหาร

นำผลที่ได้ของค่า MIC และ MBC มากำหนดความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรที่ใช้ผสมในอาหารสำเร็จรูป โดยแต่ละชนิดของสารสกัดสมุนไพรใช้ความเข้มข้นอย่างน้อย 3 ระดับชุดทดลอง และ 1 ชุดควบคุม (อาหารปกติ) รวมเป็นอย่างน้อย 4 กลุ่มทดลอง ซึ่งแต่ละชุดทดลองจะมี 3 ซ้ำ (แยกทดลองตามชนิดของสมุนไพรและสัตว์ทดลอง)

1.2.2.1 กุ้งกุลาดำและกุ้งขาว

กุ้งกุลาดำและกุ้งขาวทดลองจะได้รับอาหารสำเร็จรูปที่ผสมสารสกัดสมุนไพรตามระดับความเข้มข้นที่กำหนด โดยการละลายสารสกัดสมุนไพรด้วยแอลกอฮอล์ก่อนนำไปผสมในอาหารแล้วเคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึกแล้วผึ่งให้แห้ง ส่วนกลุ่มควบคุมใช้อาหารสำเร็จรูปเคลือบน้ำมันปลาหมึกเท่านั้น และผึ่งให้แห้งเช่นกัน โดยกุ้งจะได้รับให้อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดสมุนไพรในแต่ละชุดทดลองเพียง 1 มื้อ ที่เวลา 8.00 น. เท่านั้น ส่วนอีก 3 มื้อที่เหลือจะให้อาหารปกติเหมือนชุดควบคุม กุ้งทุกชุดในการทดลองจะให้อาหาร 4 มื้อ ที่เวลา 8.00 น., 13.00 น., 18.00 น. และ 23.00 น. โดยให้อาหารที่อัตรา 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักกุ้งทุกวัน

1.2.2.2 ปลานิล

ปลานิลทดลองจะได้รับอาหารสำเร็จรูปที่ผสมสารสกัดสมุนไพรตามระดับความเข้มข้นที่กำหนด ส่วนกลุ่มควบคุมใช้อาหารปกติ โดยปลานิลจะได้รับให้อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดสมุนไพรในแต่ละชุดทดลองเพียง 1 มื้อ ที่เวลา 8.00 น. เท่านั้น ส่วนมื้อที่เหลือจะให้อาหารในชุดทดลองทุกชุดแบบเดียวกับชุดควบคุม ซึ่งปลานิลทุกชุดจะให้อาหาร 2 มื้อ ที่เวลา 8.00 น. และ 16.00 น. โดยให้อาหารที่อัตรา 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักปลาทุกวัน

1.2.3 การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ

1.2.3.1 กุ้งกุลาดำและกุ้งขาว

เมื่อให้อาหารผสมสารสกัดสมุนไพร (แยกทดลองตามชนิดของสมุนไพร) ระดับต่าง ๆ จนครบ 2 สัปดาห์ นิดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ในปริมาณที่ทำให้กุ้งกุลาดำและกุ้งขาวตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (ทำการทดสอบก่อนว่าควรใช้เชื้อปริมาณเท่าไร) โดยฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว ระหว่างทำการทดลองความต้านทานต่อเชื้อและหลังจากการฉีดเชื้อยังคงให้อาหารสำเร็จรูปทุกชุดการทดลองเช่นเดียวกับชุดควบคุมจนสิ้นสุดการทดลอง ประเมินผลการทดลองโดยเปรียบเทียบอัตราการตายของกุ้งชุดทดลองและชุดควบคุมภายในระยะเวลา 7 วัน ทำการแยกเชื้อจาก hepatopancreas ของกุ้งที่มีอาการติดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS เพื่อยืนยันว่ากุ้งกุลาดำและกุ้งขาวตายโดยแบคทีเรียชนิดนี้

1.2.3.2 ปลานิล

เมื่อให้อาหารผสมสารสกัดสมุนไพร (แยกทดลองตามชนิดของสมุนไพร) ระดับต่าง ๆ จนครบ 2 สัปดาห์ นีคลานิลด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปริมาณที่ทำให้ปลานิลตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (ทำการทดสอบก่อนว่าควรใช้เชื้อปริมาณเท่าไร) โดยหลังจากการฉีดเชื้อจะให้อาหารสำเร็จรูปทุกชุดการทดลองเช่นเดียวกับชุดควบคุม ประเมินผลการทดลองโดยเปรียบเทียบจากอัตราการตายของปลานิลชุดทดลองและชุดควบคุม ภายในระยะเวลา 7 วัน และแยกเชื้อจากตับของปลาที่มีการติดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เพื่อยืนยันว่าปลานิลตายโดยแบคทีเรียชนิดนี้

1.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของชุดการทดลองของข้อมูล โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (อนันต์ชัย, 2542)

การทดลองที่ 2 การศึกษาการใช้สารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรเพื่อเสริมสุขภาพในสัตว์น้ำ

2.1 เตรียมสัตว์ทดลอง

2.1.1 กุ้งกุลาดำและกุ้งขาว

นำกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวน้ำหนักประมาณ 10-12 กรัม (แยกทดลองตามชนิดของกุ้งทดลอง) มาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพในบ่อซีเมนต์ขนาดความจุ้น้ำ 1.5 ลูกบาศก์เมตรเป็นเวลา 7 วันก่อนการทดลอง โดยเลี้ยงในน้ำที่มีระดับความเค็ม 20 ppt และให้อาหารสำเร็จรูปปกติ 4 มื้อ คือที่เวลา 8.00 น., 13.00 น., 18.00 น. และ 23.00 น. เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 2 วัน ให้อากาศตลอดเวลา หลังจากนั้นนำกุ้งแยกใส่บ่อทดลองซึ่งเป็นบ่อซีเมนต์ขนาดความจุ้น้ำ 1.5 ลูกบาศก์เมตรจำนวน 12 บ่อโดยใส่กุ้งบ่อละ 20 ตัว ใช้ตาข่ายพรางแสงคลุมเพื่อลดปริมาณแสง มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 2 วัน และให้อาากาสตลอดการทดลอง

2.1.2 ปลานิล

นำปลานิลแปลงเพศน้ำหนักประมาณ 60-70 กรัม มาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพในบ่อซีเมนต์ขนาดความจุ 1.5 ลูกบาศก์เมตร เป็นเวลา 7 วันก่อนการทดลอง และให้อาหาร 2 มื้อ คือที่เวลา 8.00 น. และ 16.00 น. มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 2 วัน ให้อากาศตลอดเวลา หลังจากนั้นนำปลานิลแยกใส่บ่อซีเมนต์ขนาดความจุ 1.5 ลูกบาศก์เมตรจำนวน 12 บ่อ โดยใส่ปลาบ่อละ 15 ตัว ใช้ตาข่ายพรางแสงคลุมเพื่อลดปริมาณแสง มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 2 วัน และให้อากาศตลอดการทดลอง

2.2 อาหารและการให้อาหาร

กำหนดความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรที่ใช้ผสมในอาหารสำเร็จรูปตาม 1.2.2 โดยแต่ละชนิดของสารสกัดสมุนไพรใช้ความเข้มข้นอย่างน้อย 3 ระดับ ชุดทดลอง และ 1 ชุดควบคุม (อาหารปกติ) รวมเป็นอย่างน้อย 4 กลุ่มทดลอง ซึ่งแต่ละชุดทดลองจะมี 3 ซ้ำ (แยกทดลองตามชนิดของสมุนไพรและสัตว์ทดลอง)

2.2.1 กุ้งกุลาดำและกุ้งขาว

กุ้งกุลาดำและกุ้งขาวทดลองจะได้รับอาหารสำเร็จรูปที่ผสมสารสกัดสมุนไพรตามระดับความเข้มข้นที่กำหนด โดยละลายสารสกัดสมุนไพรด้วยแอลกอฮอล์ก่อนนำไปผสมในอาหารแล้วเคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึกแล้วผึ่งให้แห้ง ส่วนกลุ่มควบคุมให้อาหารสำเร็จรูปเคลือบน้ำมันปลาหมึกเท่านั้น และผึ่งให้แห้งเช่นกัน โดยกุ้งจะได้รับให้อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดสมุนไพรในแต่ละชุดทดลองเพียง 1 มื้อ ที่เวลา 8.00 น. เท่านั้น ส่วนอีก 3 มื้อที่เหลือจะให้อาหารปกติเหมือนชุดควบคุม กุ้งทุกชุดในการทดลองจะให้อาหาร 4 มื้อ ที่เวลา 8.00 น., 13.00 น., 18.00 น. และ 23.00 น. โดยให้อาหารที่อัตรา 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักกุ้งทุกวัน

2.2.2 ปลานิล

ปลานิลทดลองจะได้รับอาหารสำเร็จรูปที่ผสมสารสกัดสมุนไพรตามระดับความเข้มข้นที่กำหนด ส่วนกลุ่มควบคุมให้อาหารปกติ โดยปลานิลจะได้รับให้อาหารสำเร็จรูปผสมสาร

สกัดสมุนไพรในแต่ละชุดทดลองเพียง 1 มื้อ ที่เวลา 8.00 น. เท่านั้น ส่วนมื้อที่เหลือจะให้อาหารในชุดทดลองทุกชุดแบบเดียวกับชุดควบคุม ซึ่งปลานิลทุกชุดในการทดลองจะให้อาหาร 2 มื้อ ที่เวลา 8.00 น. และ 16.00 น. โดยให้อาหารที่อัตรา 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักปลาทุกวัน

2.3 การศึกษาระดับภูมิคุ้มกัน

2.3.1 กุ้งกุลาดำและกุ้งขาว

เมื่อให้อาหารผสมสารสกัดสมุนไพร (แยกทดลองตามชนิดของสมุนไพรและสัตว์ทดลอง) ระดับต่าง ๆ แล้ว จะทำการสุ่มกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวมาทำการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันทุก ๆ 10 วัน จนครบ 1 เดือน (3 ครั้ง) หลังจากนั้นจะเลี้ยงกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวโดยให้อาหารสำเร็จรูปปกติทุกชุดการทดลองเช่นเดียวกับชุดควบคุม และทำการสุ่มกุ้งกุลาดำและกุ้งขาว ทุก ๆ 10 วันจนครบ 20 วัน (2 ครั้ง)

ทำการสุ่มกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวจำนวน 5 ตัวในแต่ละซ้ำ เพื่อนำมาเจาะเลือดจาก ventral sinus ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 26 G และหลอดฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร ซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัว (anticoagulant) ของเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร (อัตราส่วนเลือดต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 1:2) นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count) กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอกซิออกซิเดส (phenoloxidase activity) กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (phagocytic activity) และกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด (bactericidal activity) ตามขั้นตอนดังนี้ (ดัดแปลงตามวิธีของกิจการ, 2543 ข)

2.3.1.1 การศึกษาปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count)

นำเลือดที่เจาะได้ตามปริมาณที่ต้องการ มาตรวจนับจำนวน haemocytes รวม โดยหยดน้ำเลือด 10 ไมโครลิตร บนสไลด์นับเม็ดเลือด (hemacytometer) และคำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็นจำนวนเซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร

2.3.1.2 การศึกษา phenoloxidase activity

1) การเตรียมตัวอย่างเลือดและเตรียม Haemocyte Lysate (HLS)

นำเลือดที่เจาะได้มาแยกเซลล์เม็ดเลือด โดยนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมการทำลายแบคทีเรีย (bactericidal activity) ของน้ำเลือดตามวิธีข้อ 2.3.1.4 ส่วนตะกอนที่ได้นำมาล้างใน K-199 และละลายในสารละลาย cacodylate buffer pH 7.4 ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตกและตกตะกอนโดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกส่วนใสซึ่งเป็น hemocyte lysate (HLS) ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ดัดแปลงวิธีจากรายงานของ Soderhall and Hall (1984)

2) การศึกษา phenoloxidase activity

2.1) นำ HLS มา 500 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลายทริปซิน (0.1 ทริปซิน ใน cacodylate buffer) 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 30 นาที

2.2) เติมสารละลาย L – dihydroxyphenylalanine (L- DOPA) 500 ไมโครลิตร ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง

2.3) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร 2 นาที โดยเปรียบเทียบกับสารละลายควบคุม (blank) ซึ่งใช้ทริปซินผสมกับ L- DOPA และ cacodylate buffer แทน HLS

2.4) วิเคราะห์โปรตีนใน HLS ตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951) ตามวิธี ข้อ 3) นำค่าที่ได้มาคำนวณหน่วย (Unit) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ตามนี้

ค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลง 0.001 = 1 unit

phenoloxidase activity = unit/min/ mg Protein

3) การวิเคราะห์โปรตีนใน HLS ตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951)

3.1) นำ HLS มา 10 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 90 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.2) เติม reagent c 1 มิลลิลิตร (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก) เขย่าแล้วทิ้งไว้ 10 นาที

3.3) เติม reagent d 100 ไมโครลิตร (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก) เขย่าแล้วทิ้งไว้ 10 นาที

3.4) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายมาตรฐานของ albumin โดย blank จะใช้ สารละลายบัฟเฟอร์ 10 ไมโครลิตร ผสมในน้ำกลั่น 90 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม reagent c และ d ตามปริมาณที่กำหนดข้างต้น

2.3.1.3 กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (phagocytic activity) คัดแปลงตามวิธีของ Itami *et al.* (1994)

1) นำสารละลายเซลล์ใน 2.3.1.2 จำนวน 200 ไมโครลิตร มา spread ให้ทั่วบน cover slip ทิ้งไว้ 20 นาที

2) ล้างด้วย shrimp saline 3 ครั้ง

3) เติม heat-killed yeast ที่มีเซลล์ประมาณ 5.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ให้ทั่ว cover slip ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4) ล้างด้วย shrimp saline 5 ครั้ง

5) fix ด้วย แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยทิ้งไว้ 10 นาที

6) ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

7) ย้อมสีด้วย Wright & Giemsa stain 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

8) ล้างด้วยน้ำกลั่น

9) ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งข้ามคืน

10) mount ด้วยน้ำยา Eukitt

11) นับจำนวนเม็ดเลือด โดยแยกออกเป็นจำนวนเม็ดเลือดที่จับกินยีสต์ จำนวนยีสต์ที่ถูกเม็ดเลือดกลืนกิน และ จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด เพื่อนำไปคำนวณหา percent phagocytosis ต่อไป

$$\text{Percent phagocytosis} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่จับกินยีสต์} \times 100}{\text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด}}$$

2.3.1.4 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด (bactericidal activity)

- 1) นำซีรัม (ส่วนใส) ที่แยกได้จาก 2.3.1.2 ข้างต้น มาเจือจางด้วยสารละลาย 2.6 เปอร์เซ็นต์ NaCl ในระดับ 1:4 1:8 1:16 1:32 และ 1:64 โดยปรับปริมาตรการเจือจางให้ได้หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร
- 2) นำเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* บริสุทธิ์ที่เลี้ยงในอาหาร TSB ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 15 นาที 3 ครั้ง นำเชื้อที่ได้มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ปลอดเชื้อ และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่า O.D. ประมาณ 0.1 - 0.15 ซึ่งมีปริมาณเชื้อประมาณ 1×10^6 cells/ml นำเชื้อไปเติมในแต่ละหลอดที่เจือจางซีรัมไว้แล้วในปริมาตรที่เท่ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- 3) นำส่วนผสมแต่ละหลอดมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี spread plate ใน TCBS
- 4) บันทึกค่าของการเจือจางซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง

2.3.2 ปลานิล

เมื่อให้อาหารผสมสารสกัดสมุนไพร (แยกทดลองตามชนิดของสมุนไพร) ระดับต่าง ๆ แล้ว จะทำการสุ่มปลานิลมาทำการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันทุก ๆ 15 วัน จนครบ 1 เดือน (2 ครั้ง) หลังจากนั้นจะเลี้ยงปลานิลต่อโดยให้อาหารสำเร็จรูปปกติทุกชุดการทดลองเช่นเดียวกับชุดควบคุม และเมื่อครบ 15 วันทำการสุ่มปลานิลหลังจากหยุคให้อาหารสำเร็จรูป

ทำการสุ่มปลานิลจำนวน 5 ตัวต่อซ้ำ เพื่อนำมาเจาะเลือดจาก caudal vein ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 25 G และหลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ซึ่งภายในเคลือบสารป้องกันการแข็งตัว (heparin) หลังจากนั้นนำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cells) ค่า

hematocrit ปริมาณ hemoglobin ปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด (peripheral blood leukocytes) ปริมาณ respiratory burst และกิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (phagocytic activity) ตามขั้นตอนดังนี้ (ดัดแปลงตามนนทวิทย์, 2549; Christyapita *et al.*, 2007)

2.3.2.1 การศึกษาปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cells) ค่า hematocrit และ ปริมาณ hemoglobin

วิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cells) ค่า hematocrit และ ปริมาณ hemoglobin ด้วยเครื่อง Semi – automated microcell counter machine model F – 820

2.3.2.2 การศึกษาปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด (peripheral blood leukocytes)

1) การเตรียมตัวอย่างเลือด

1.1) เติม Histopaque - 1077 ลงใน conical centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาทีก่อนใช้

1.2) นำตัวอย่างเลือดปลามาเจือจางด้วย RPMI medium หรือ Phosphate buffer saline (PBS) ในอัตราส่วน 1:2

1.3) ใช้ไมโครปิเปตขนาด 1000 ไมโครลิตร ดูดเลือดที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงใน conical centrifuge tube ที่มี Histopaque - 1077 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในข้อ 1.1) อย่างระมัดระวัง

1.4) นำหลอดที่ได้ในข้อ 1.3) ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 400 x g ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

1.5) นำหลอดที่ได้ออกจากเครื่อง centrifuge อย่างระมัดระวัง แล้ว ใช้ไมโครปิเปตขนาด 1000 ไมโครลิตร หรือ Pasteur pipette ดูดส่วนที่เป็นแถบแบนสีขาวลงใน conical centrifuge tube อันใหม่

1.6) เติม 10 มิลลิลิตรของ PBS ลงไปเบา ๆ แล้วใช้ไมโครปิเปตผสมให้ เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 250 x g ที่ อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที

1.7) ทำการล้างเซลล์เม็ดเลือดที่ได้ซ้ำอีก 3 ครั้งเช่นเดียวกับข้อ 1.6) ปรับความหนาแน่นของเซลล์ด้วย RPMI medium ให้ได้ความหนาแน่นประมาณ 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2) การศึกษาปริมาณเม็ดเลือดขาว

นำเลือดที่ได้จาก 1.7) มาตรวจนับจำนวน Peripheral blood leukocytes รวม โดยหยดน้ำเลือด 10 ไมโครลิตร บนสไลด์นับเม็ดเลือด (hemacytometer) และคำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็นจำนวนเซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร

2.3.2.3 การวัดค่า respiratory burst จาก peripheral blood leukocytes

- 1) นำเซลล์เม็ดเลือดขาว (ความเข้มข้น 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ที่เตรียมไว้จากข้อ 1.7) 25 ไมโครลิตร เติมลงใน 96 well plate หลังจากนั้นเติม 25 ไมโครลิตร ของ Nitroblue tetrazolium (NBT) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 175 ไมโครลิตร ของ RPMI medium
- 2) บ่มที่อุณหภูมิ 25 - 28 °C เป็นเวลา 120 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายส่วนบนออก ล้างด้วย RPMI medium อีก 2 ครั้ง แล้วเติม 125 ไมโครลิตรของ 100 % methanol
- 3) เมื่อเวลาผ่านไป 5 นาที ทำการล้างอีก 2 ครั้ง ด้วย 125 ไมโครลิตรของ 70 % methanol แล้วตั้งทิ้งไว้จน 96 well plate แห้ง
- 4) เติม 125 ไมโครลิตรของ 2 N KOH และ 150 ไมโครลิตรของ DMSO ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายด้านบนไปวัดความสามารถในการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปประเมินค่า respiratory burst

2.3.2.4 การประเมินกระบวนการ phagocytosis

- 1) นำเซลล์เม็ดเลือดขาว (ความเข้มข้น 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ที่เตรียมจากข้อ 1.7) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร มา spread ให้ทั่วบน cover slip ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 2) ทำการล้างเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะจาก 1) กับภาชนะด้วย RPMI medium เบบี เป็นเวลา 3 ครั้ง

3) เติม heat-killed yeast ที่มีเซลล์ประมาณ 2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ให้ทั่ว cover slip ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งเตรียมโดยผสม heat-killed yeast 2×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร กับซีรัมของปลาอย่างละปริมาตร 70 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ $18-25^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม RPMI medium ปริมาตร 560 ไมโครลิตร

4) หลังจากนั้นทำการล้าง slide ด้วย RPMI medium 3 ครั้ง

5) ทำการย้อมเซลล์ด้วยชุดย้อมสี Diff-Quick staining ดังนี้

5.1) ตรึงเซลล์ด้วย absolute methanol 3 วินาที

5.2) ย้อมด้วยสี Wright's stain 3 วินาที

5.3) ย้อมด้วยสี Giemsa's stain 3 วินาที

5.4) ล้างสีย้อมส่วนเกินด้วย น้ำกลั่นเป็นเวลา 3 วินาที

6) ตั้งทิ้งไว้แห้งข้ามคืน

7) mount ด้วย Eukitt

8) นับจำนวนเม็ดเลือด โดยแยกออกเป็นจำนวนเม็ดเลือดที่จับกินยีสต์ จำนวนยีสต์ที่ถูกเม็ดเลือดกลืนกิน และ จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด เพื่อนำไปคำนวณหา percent phagocytosis ตามสูตร

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของชุดการทดลองของข้อมูล โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (อนันต์ชัย, 2542)

การทดลองที่ 3 การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของสัตว์น้ำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร

3.1 เตรียมสัตว์ทดลอง

3.1.1 กุ้งกุลาดำและกุ้งขาว

นำกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวน้ำหนักประมาณ 10-12 กรัม (แยกทดลองตามชนิดของกุ้งทดลอง) มาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพในบ่อซีเมนต์ขนาดความจุ้น้ำ 1.5 ลูกบาศก์เมตรเป็นเวลา 7 วัน ก่อนการทดลอง โดยเลี้ยงในน้ำที่มีระดับความเค็ม 20 ppt และให้อาหารสำเร็จรูปปกติ 4 มื้อ คือ ที่เวลา 8.00 น., 13.00 น., 18.00 น. และ 23.00 น. เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 2 วัน ให้อากาศตลอดเวลา หลังจากนั้นนำกุ้งแยกใส่บ่อทดลองซึ่งเป็นบ่อซีเมนต์ขนาดความจุ้น้ำ 1.5 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 12 บ่อ โดยใส่กุ้งบ่อละ 20 ตัว ใช้ตาข่ายพรางแสงคลุมเพื่อลดปริมาณแสง มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 2 วัน และให้อากาศตลอดการทดลอง

3.1.2 ปลานิล

นำปลานิลแปลงเพศน้ำหนักประมาณ 60 – 70 กรัมมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพในบ่อซีเมนต์ขนาดความจุ้น้ำ 1.5 ลูกบาศก์เมตร เป็นเวลา 7 วันก่อนการทดลองสัตว์ทดลอง และให้อาหาร 2 มื้อ คือที่เวลา 8.00 น. และ 16.00 น. มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 2 วัน ให้อากาศตลอดเวลา หลังจากนั้นนำปลานิลแยกใส่บ่อซีเมนต์ขนาดความจุ้น้ำ 1.5 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 12 บ่อ โดยใส่ปลาบ่อละ 15 ตัว ใช้ตาข่ายพรางแสงคลุมเพื่อลดปริมาณแสง มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 2 วัน และให้อากาศตลอดการทดลอง

3.2 อาหารและการให้อาหาร

กำหนดความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรที่ใช้ผสมในอาหารสำเร็จรูปตาม 1.2.2 โดยแต่ละชนิดของสารสกัดสมุนไพรใช้ความเข้มข้นอย่างน้อย 3 ระดับ ชุดทดลอง และ 1 ชุดควบคุม (อาหารปกติ) รวมเป็นอย่างน้อย 4 กลุ่มทดลอง ซึ่งแต่ละชุดทดลองจะมี 3 ซ้ำ (แยกทดลองตามชนิดของสมุนไพรและสัตว์ทดลอง)

3.2.1 กุ้งกุลาดำและกุ้งขาว

กุ้งกุลาดำและกุ้งขาวทดลองจะได้รับอาหารสำเร็จรูปที่ผสมสารสกัดสมุนไพรตามระดับความเข้มข้นที่กำหนด โดยละลายสารสกัดสมุนไพรด้วยแอลกอฮอล์ก่อนนำไปผสมในอาหารแล้วเคลือบด้วยน้ำมันปลาหมีแล้วผึ่งให้แห้ง ส่วนกลุ่มควบคุมใช้อาหารสำเร็จรูปเคลือบน้ำมันปลาหมีเท่านั้น และผึ่งให้แห้งเช่นกัน โดยกุ้งจะได้รับให้อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดสมุนไพรในแต่ละชุดทดลองเพียง 1 มื้อ ที่เวลา 8.00 น. เท่านั้น ส่วนอีก 3 มื้อที่เหลือจะให้อาหารปกติเหมือนชุดควบคุม กุ้งทุกชุดทดลองจะให้อาหาร 4 มื้อ ที่เวลา 8.00 น., 13.00 น., 18.00 น. และ 23.00 น. โดยให้อาหารที่อัตรา 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักกุ้งทุกวัน

3.2.2 ปลานิล

ปลานิลทดลองจะได้รับอาหารสำเร็จรูปที่ผสมสารสกัดสมุนไพรตามระดับความเข้มข้นที่กำหนด ส่วนกลุ่มควบคุมใช้อาหารปกติ โดยปลานิลจะได้รับให้อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดสมุนไพรในแต่ละชุดทดลองเพียง 1 มื้อ ที่เวลา 8.00 น. เท่านั้น ส่วนมื้อที่เหลือจะให้อาหารในชุดทดลองทุกชุดแบบเดียวกับชุดควบคุม ซึ่งปลานิลทุกชุดทดลองจะให้อาหาร 2 มื้อ ที่เวลา 8.00 น. และ 16.00 น. โดยให้อาหารที่อัตรา 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักปลาทุกวัน

3.3 การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้

เมื่อให้อาหารผสมสารสกัดสมุนไพร (แยกทดลองตามชนิดของสมุนไพรและสัตว์ทดลอง) ระดับต่าง ๆ จนครบ 1 เดือน จะทำการสุ่มกุ้งกุลาดำ 3 ตัวต่อซ้ำ มาผ่าหลังเพื่อนำลำไส้กุ้งไปวิเคราะห์หาจำนวน เชื้อแบคทีเรียในลำไส้

3.3.1 กุ้งกุลาดำและกุ้งขาว

3.3.1.1 ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้

- 1) ผ่ากุ้งเอาลำไส้มาชั่งน้ำหนัก
- 2) เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ในลำไส้ตัวอย่างแล้วบดด้วย Homogenizer

3) นำสารละลายที่บดได้มา 100 ไมโครลิตร มา spread หยดลงบน TCBS เพื่อนับจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดต่อไป

3.3.1.2 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้

- 1) ผ่ากึ่งเอาลำไส้มาชั่งน้ำหนัก
- 2) เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ในลำไส้ตัวอย่างแล้วบดด้วย Homogenizer
- 3) นำสารละลายที่บดได้มา 100 ไมโครลิตร มา spread หยดลงบน PCA ผสม 1.5 เปอร์เซนต์ NaCl เพื่อนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด

3.3.2 ปลาเนื้อ

3.3.2.1 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้

- 1) ผ่าปลา เอาลำไส้มาชั่งน้ำหนัก
- 2) เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ในลำไส้ตัวอย่างแล้วบดด้วย Homogenizer
- 3) นำสารละลายที่บดได้มา 100 ไมโครลิตร มา spread หยดลงบน PCA เพื่อนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของชุดการทดลองของข้อมูล โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (อนันต์ชัย, 2542)

สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาทำการทดลอง

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือน กรกฎาคม 2550 – เมษายน 2552



ผลและวิจารณ์

ผล

การทดลองที่ 1 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสัตว์น้ำ

1.1 การศึกษาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Streptococcus agalactiae* (in vitro) ของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร

1.1.1 การศึกษาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Streptococcus agalactiae* (in vitro) ของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร

การศึกษาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) หรือระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Streptococcus agalactiae* (in vitro) พบว่า สารสกัดขมิ้นชันมีค่า MIC ต่อเชื้อ *V. harveyi* และ *S. agalactiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB เท่ากับ 512 และ 853.33 ppm ตามลำดับ และส่วนสกัดฟ้าทะลายโจรมีค่า MIC ต่อเชื้อ *V. harveyi* และ *S. agalactiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB เท่ากับ 2,560 และ 853.33 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

1.1.2 การศึกษาค่า Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Streptococcus agalactiae* (In vitro) ของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร

พบว่า สารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรลักษณะ crude extract มีค่า MBC ต่อเชื้อ *V. harveyi* ที่ 2,275.55 และ 2,560 ppm ตามลำดับ โดยระดับความเข้มข้นดังกล่าวสามารถฆ่าเชื้อได้ โดยไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. harveyi* บนอาหาร TCBS

ส่วนการศึกษาค่า MBC ของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรลักษณะ crude extract กับเชื้อ *S. agalactiae* มีค่า $>4,452.17$ ppm และ $>4,452.17$ ppm ตามลำดับ โดยระดับความเข้มข้นดังกล่าวสามารถฆ่าเชื้อได้ โดยไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. agalactiae* บนอาหาร TSA ที่ผสม 1.5% NaCl (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *V. harveyi* และ *S. agalactiae* ของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร

	<i>V. harveyi</i>		<i>S. agalactiae</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC
สารสกัดขมิ้นชัน	512	2,275.55	853.33	>4,452.17
สารสกัดฟ้าทะลายโจร	2,560	2,560	853.33	>4,452.17

1.2 การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Streptococcus agalactiae* ของสัตว์น้ำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร

นำผลจากการทดลองค่า MIC และ MBC ของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อเชื้อ *V. harveyi* และ *S. agalactiae* ในข้อ 1.1 มาใช้ผสมในอาหารให้สัตว์ทดลอง พบว่าสัตว์ทดลองไม่สามารถกินอาหารดังกล่าว อาจเนื่องมาจากระดับความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรสูงเกินไป ทำให้อาหารมีรสขม ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการปรับลดความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรทุกชุดลงประมาณ 10 เท่า เพื่อทำการผสมอาหารทดลองการทดลอง

1.2.1 การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Streptococcus agalactiae* ของสัตว์น้ำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน

เลี้ยงกุ้งกุลาดำ และ กุ้งขาวด้วยอาหารทดลอง แบ่งออกเป็น 1 ชุดควบคุม (อาหารสำเร็จรูปปกติ) และ 3 ชุดทดลอง ซึ่งประกอบไปอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 12.5, 25 และ 50 ppm (มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) ตามลำดับ

ในปลานิล อาหารทดลองแบ่งออกเป็น 1 ชุดควบคุม (อาหารสำเร็จรูปปกติ) และ 5 ชุดทดลอง ซึ่งประกอบไปอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 5, 10, 20, 40 และ 80 ppm ตามลำดับ

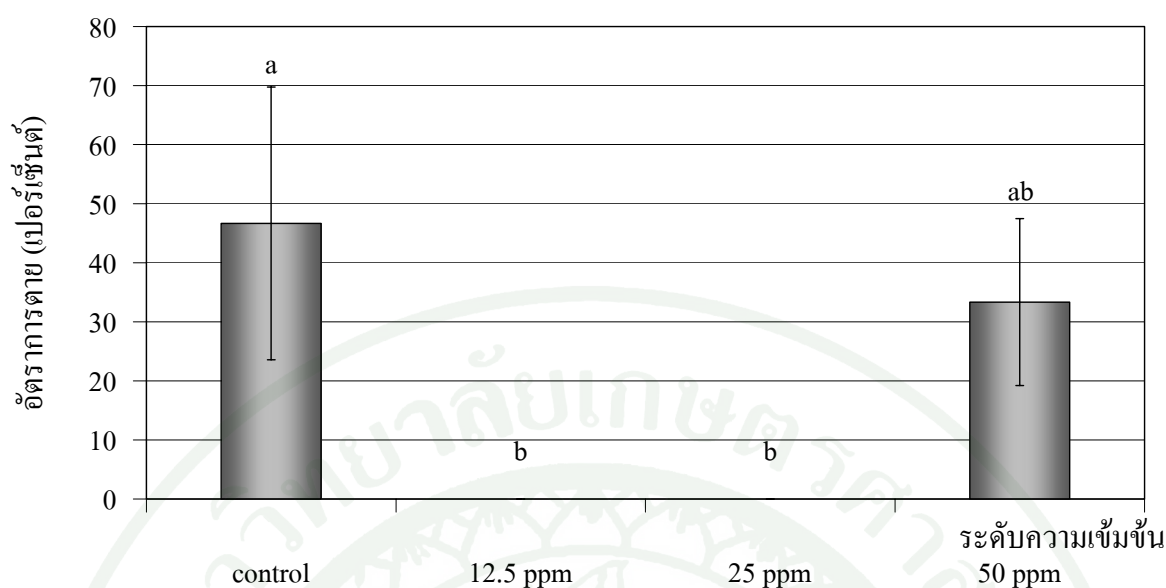
1.2.1.1 การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน

หลังจากกุ้งเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 12.5, 25 และ 50 ppm ตามลำดับ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหาร TSB ผสม 1.5% NaCl ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นล้างด้วยสารละลาย 1.5% NaCl ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 15 นาที 3 ครั้ง นำเชื้อที่ได้มาปรับด้วยสารละลาย 1.5% NaCl และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร เท่ากับ 0.107 ซึ่งมีเชื้อ *V. harveyi* ประมาณ 1×10^6 cfu/ml โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อกุ้งตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ทั้งชุดควบคุมและชุดการทดลอง บันทึกอัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) หลังจากฉีดเชื้อเข้าไปเป็นเวลา 7 วัน พบว่าอัตราการตายของกุ้งกุลาดำชุดควบคุมมีค่า 46.666 ± 23.094 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 12.5 และ 25 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่ไม่พบอัตราการตายทั้งสองชุดการทดลอง ส่วนกุ้งกุลาดำชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน 50 ppm มีค่าอัตราการตายที่ 33.333 ± 14.142 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) จากกุ้งชุดควบคุม และชุดทดลองอื่น ๆ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 1)

ตารางที่ 2 อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันและฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi*

Treatment	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์)
ชุดควบคุม	46.666 ± 23.094^a
อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน 12.5 ppm	0.000 ± 0.000^b
อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน 25 ppm	0.000 ± 0.000^b
อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน 50 ppm	33.333 ± 14.142^{ab}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 1 อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันและฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi*

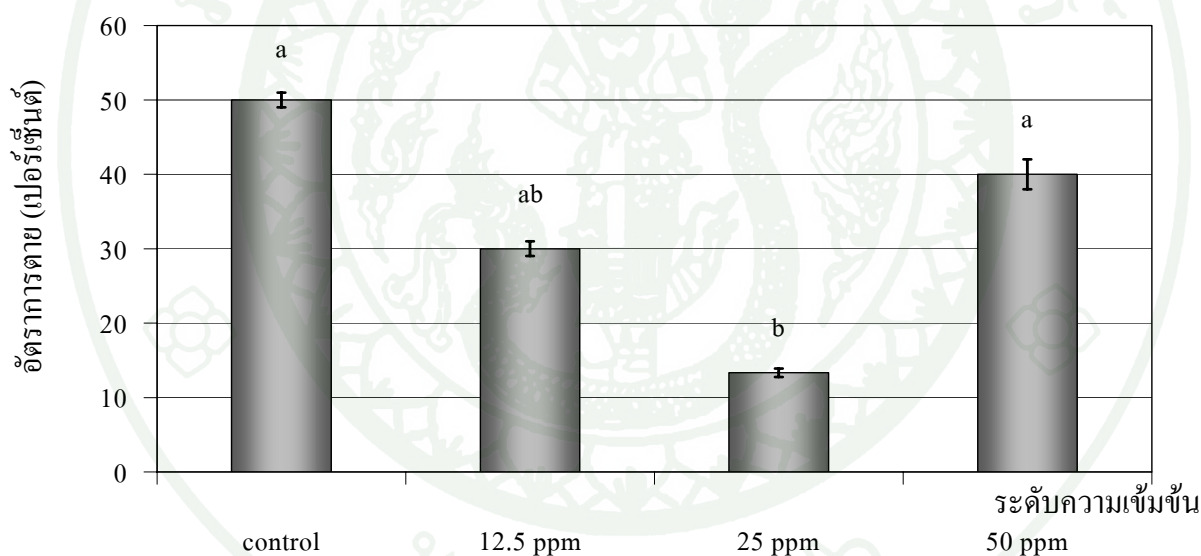
1.2.1.2 การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน

หลังจากกุ้งเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 12.5, 25 และ 50 ppm ตามลำดับ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหาร TCBS ผสม 1.5% NaCl ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นล้างด้วยสารละลาย 1.5% NaCl ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 15 นาที 3 ครั้ง นำเชื้อที่ได้มาปรับด้วยสารละลาย 1.5% NaCl และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร เท่ากับ 0.107 ซึ่งมีเชื้อ *V. harveyi* ประมาณ 1×10^6 cfu/ml ฉีดเข้ากล้ามเนื้อกุ้งตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ทั้งชุดควบคุม และชุดการทดลอง บันทึกอัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) หลังจากฉีดเชื้อเข้าไปเป็นเวลา 7 วัน พบว่า อัตราการตายของกุ้งขาวชุดควบคุมมีค่า 50.000 ± 1.000 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่ากุ้งขาวชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 25 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่มีอัตราการตายที่ 13.333 ± 0.577 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น แต่กุ้งขาวชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 12.5 และ 50 ppm ซึ่งมีอัตราการตายที่ 30.000 ± 1.000 และ 40.000 ± 2.000 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) กับกุ้งชุดควบคุม (ตารางที่ 3 และภาพที่ 2)

ตารางที่ 3 อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันและน้ดด้วยเชื้อ *V. harveyi*

Treatment	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์)
ชุดควบคุม	50.000±1.000 ^a
อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน 12.5 ppm	30.000±1.000 ^{ab}
อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน 25 ppm	13.333±0.577 ^b
อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน 50 ppm	40.000±2.000 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 2 อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันและน้ดด้วยเชื้อ *V. harveyi*

1.2.1.3 การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน

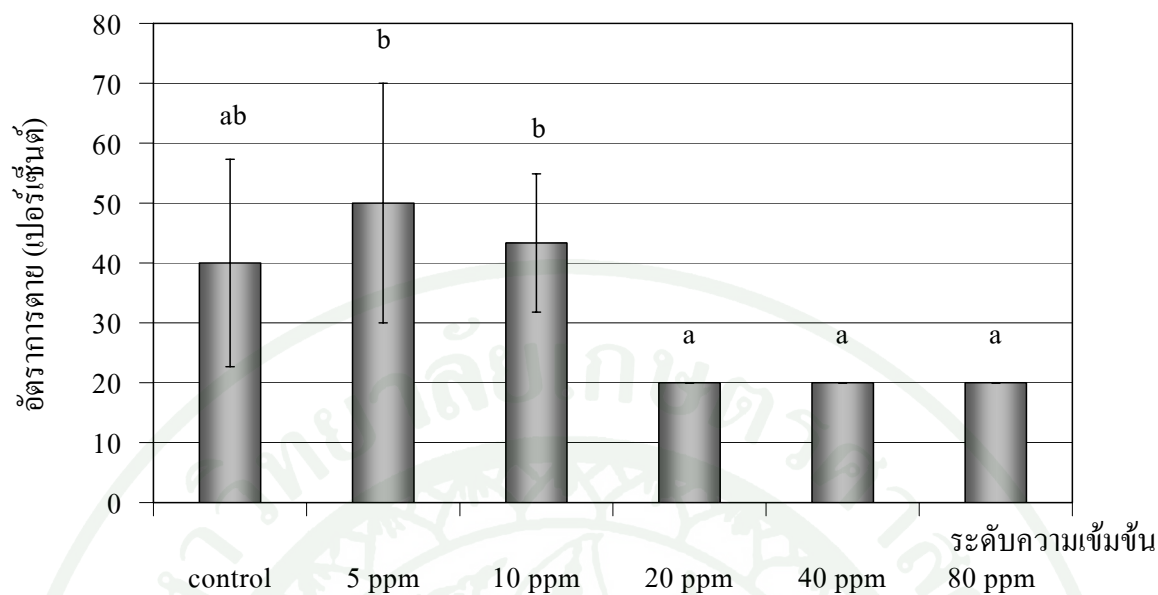
หลังจากปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 5, 10, 20, 40 และ 80 ppm ตามลำดับ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และน้ดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่เลี้ยงใน

อาหาร TSA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นล้างด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 15 นาที 3 ครั้ง นำเชื้อที่ได้มาปรับด้วยสารละลาย 0.85% NaCl และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เท่ากับ 0.100 ซึ่งมีเชื้อ *S. agalactiae* ประมาณ 1×10^6 cfu/ml ฉีดเข้ากล้ามเนื้อปลานิลตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ทั้งชุดควบคุมและชุดการทดลอง บันทึกอัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) หลังจากฉีดเชื้อเข้าไปเป็นเวลา 7 วัน พบว่าอัตราการตายของปลานิลชุดควบคุมมีค่า 40.000 ± 17.320 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) กับปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันทุก ซึ่งอัตราการตายที่ 50.000 ± 20.000 , 43.333 ± 11.547 , 20.000 ± 0.000 , 20.000 ± 0.000 และ 20.000 ± 0.000 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 20, 40 และ 80 ppm แสดงอัตราการตายน้อยกว่าปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 5 และ 10 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4 และ ภาพที่ 3)

ตารางที่ 4 อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันและฉีดด้วยเชื้อ *S. agalactiae*

Treatment	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์)
ชุดควบคุม	40.000 ± 17.320^{ab}
อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน 5 ppm	50.000 ± 20.000^b
อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน 10 ppm	43.333 ± 11.547^b
อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน 20 ppm	20.000 ± 0.000^a
อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน 40 ppm	20.000 ± 0.000^a
อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน 80 ppm	20.000 ± 0.000^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 3 อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันและฉีดด้วยเชื้อ *S. agalactiae*

1.2.2 การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Streptococcus agalactiae* ของสัตว์น้ำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร

อาหารทดลองในกึ่งกลูตาดี และ กุ้งขาวแบ่งออกเป็น 1 ชุดควบคุม (อาหารสำเร็จรูปปกติ) และ 4 ชุดทดลอง ประกอบไปอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30, 62.5, 125 และ 250 ppm ตามลำดับ

ส่วนในปลานิล อาหารทดลองแบ่งออกเป็น 1 ชุดควบคุม (อาหารสำเร็จรูปปกติ) และ 5 ชุดทดลอง ซึ่งประกอบไปอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร ที่ระดับ 5, 10, 20, 40 และ 80 ppm ตามลำดับ

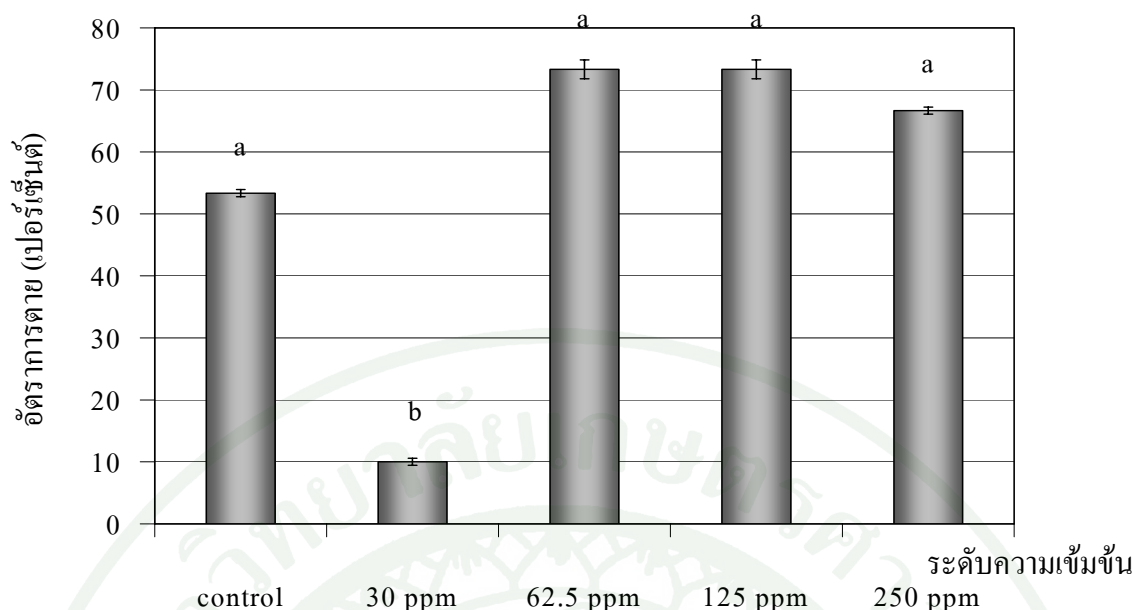
1.2.2.1 การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร

หลังจากกุ้งเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30, 62.5, 125 และ 250 ppm ตามลำดับ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหาร TSB 1.5% NaCl ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นล้างด้วยสารละลาย 1.5% NaCl ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 15 นาที 3 ครั้ง นำเชื้อที่ได้มาปรับด้วยสารละลาย 1.5% NaCl และ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร เท่ากับ 0.107 ซึ่งมีเชื้อ *V. harveyi* ประมาณ 1×10^6 cfu/ml ฉีดเข้ากล้ามเนื้อกุ้งตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ทั้งชุดควบคุม และ ชุดการทดลอง บันทึกอัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) หลังจากฉีดเชื้อเข้าไปเป็นเวลา 7 วัน พบว่า กุ้งกุลาดำชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30 ppm มีค่าอัตราการตายของกุ้งกุลาดำที่ 10.000 ± 11.547 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าชุดควบคุม และชุดทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และไม่พบความแตกต่างระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลองที่ 62.5, 125 และ 250 ppm ($P > 0.05$) (ตารางที่ 5 และ ภาพที่ 4)

ตารางที่ 5 อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร และฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi*

Treatment	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์)
ชุดควบคุม	53.333 ± 11.574^a
อาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 30 ppm	10.000 ± 11.547^b
อาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 62.5 ppm	73.333 ± 30.550^a
อาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 125 ppm	73.333 ± 30.550^a
อาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 250 ppm	66.667 ± 11.547^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 4 อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรและฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi*

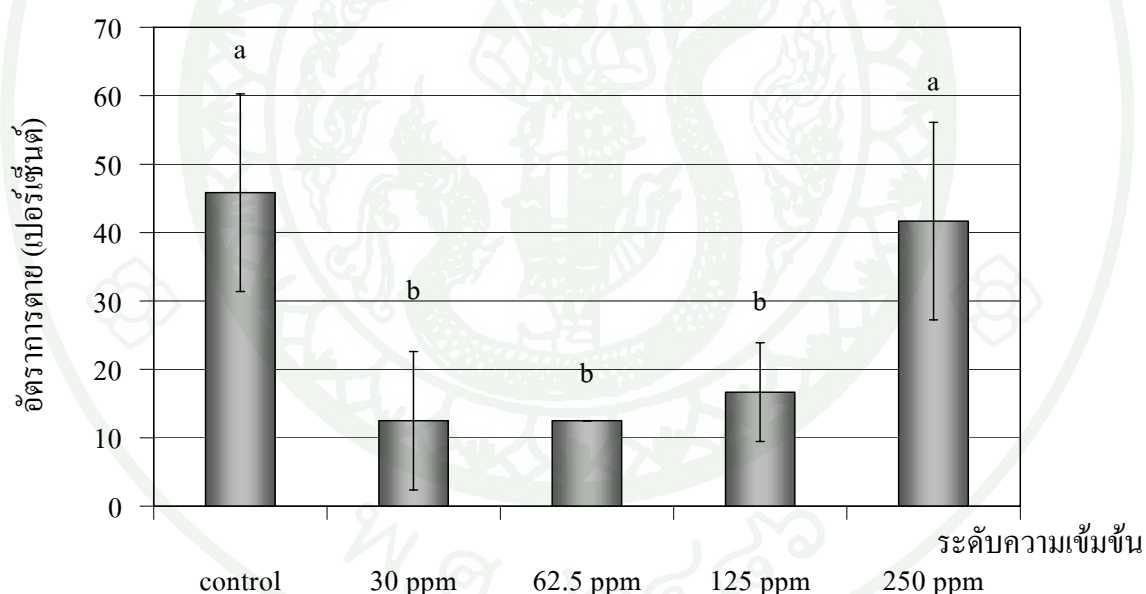
1.2.2.2 การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร

หลังจากกุ้งเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30, 62.5, 125 และ 250 ppm ตามลำดับ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหาร TSA ผสม 1.5% NaCl ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นล้างด้วยสารละลาย 1.5% NaCl ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 15 นาที 3 ครั้ง นำเชื้อที่ได้มาปรับด้วยสารละลาย 1.5% NaCl และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร เท่ากับ 0.107 ซึ่งมีเชื้อ *V. harveyi* ประมาณ 1×10^6 cfu/ml โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อกุ้งตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ทั้งชุดควบคุมและชุดการทดลอง บันทึกอัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) หลังจากฉีดเชื้อเข้าไปเป็นเวลา 7 วัน พบว่าอัตราการตายของกุ้งขาวชุดควบคุมมีค่า 45.833 ± 14.434 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่ากุ้งชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30, 62.5 และ 125 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่มีค่าอัตราการตายที่ 12.500 ± 10.128 , 12.500 ± 0.000 และ 16.667 ± 7.216 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนกุ้งขาวชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 250 ppm ซึ่งมีอัตราการตายที่ 41.667 ± 14.434 เปอร์เซ็นต์ แสดงความแตกต่างทางสถิติกับกุ้งชุดทดลองอื่น ๆ ($P < 0.05$) แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) กับกุ้งชุดควบคุม (ตารางที่ 6 และ ภาพที่ 5)

ตารางที่ 6 อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรและฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi*

Treatment	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์)
ชุดควบคุม	45.833 ± 14.434 ^a
อาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 30 ppm	12.500 ± 10.128 ^b
อาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 62.5 ppm	12.500 ± 0.000 ^b
อาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 125 ppm	16.667 ± 7.216 ^b
อาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 250 ppm	41.667 ± 14.434 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 5 อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรและฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi*

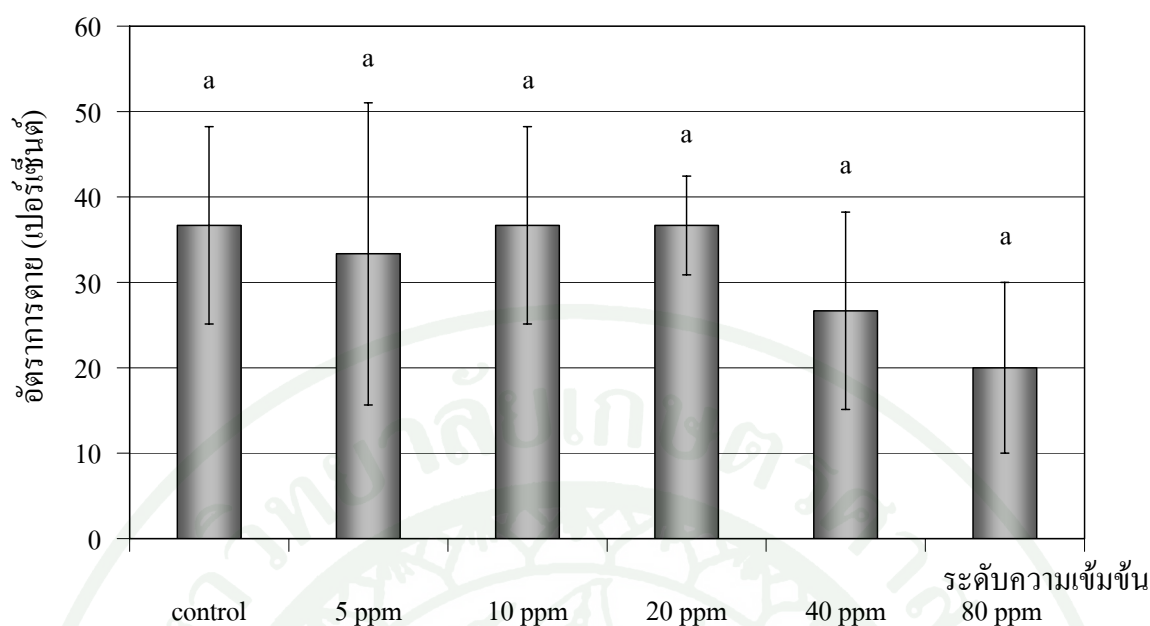
1.2.2.3 การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ของ ปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร

หลังจากปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 5, 10, 20, 40 และ 80 ppm ตามลำดับ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่เลี้ยงในอาหาร TSA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นล้างด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 15 นาที 3 ครั้ง นำเชื้อที่ได้มาปรับด้วยสารละลาย 0.85% NaCl และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เท่ากับ 0.100 ซึ่งมีเชื้อ *S. agalactiae* ประมาณ 1×10^6 cfu/ml ฉีดเข้ากล้ามเนื้อปลานิลตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ทั้งชุดควบคุม และ ชุดการทดลอง บันทึกอัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) หลังจากฉีดเชื้อเข้าไปเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ปลานิลชุดควบคุมมีอัตราการตายเท่ากับ 36.667 ± 11.547 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับปลานิลชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 5, 10, 20, 40 และ 80 ppm ที่มีอัตราการตายเท่ากับ 33.333 ± 17.678 , 36.667 ± 11.547 , 36.667 ± 5.773 , 26.667 ± 11.547 และ 20.000 ± 10.000 เปอร์เซ็นต์ ($P > 0.05$) แต่ปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 5, 40 และ 80 ppm แสดงอัตราการตายที่ลดลง (ตารางที่ 7 และ ภาพที่ 6)

ตารางที่ 7 อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรและฉีดด้วยเชื้อ *S. agalactiae*

Treatment	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์)
ชุดควบคุม	36.667 ± 11.547^a
อาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 5 ppm	33.333 ± 17.678^a
อาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 10 ppm	36.667 ± 11.547^a
อาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 20 ppm	36.667 ± 5.773^a
อาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 40 ppm	26.667 ± 11.547^a
อาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 80 ppm	20.000 ± 10.000^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 6 อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรและฉีดด้วยเชื้อ *S. agalactiae*

การทดลองที่ 2 การศึกษาการใช้สารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรเพื่อเสริมสุขภาพในสัตว์น้ำขมิ้นชัน

2.1 การศึกษาการใช้สารสกัดขมิ้นชันเพื่อเสริมสุขภาพในสัตว์น้ำ

2.1.1 การศึกษาการใช้สารสกัดขมิ้นชันเพื่อเสริมสุขภาพในกุ้งกุลาดำ

เมื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 ppm เป็นเวลา 1 เดือน และเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารปกติต่อเนื่องเป็นเวลา 20 วัน ทำการสุ่มกุ้งกุลาดำทุก ๆ 10 วัน เพื่อทำการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันตลอดการทดลอง ซึ่งผลการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันมีดังนี้

2.1.1.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count)

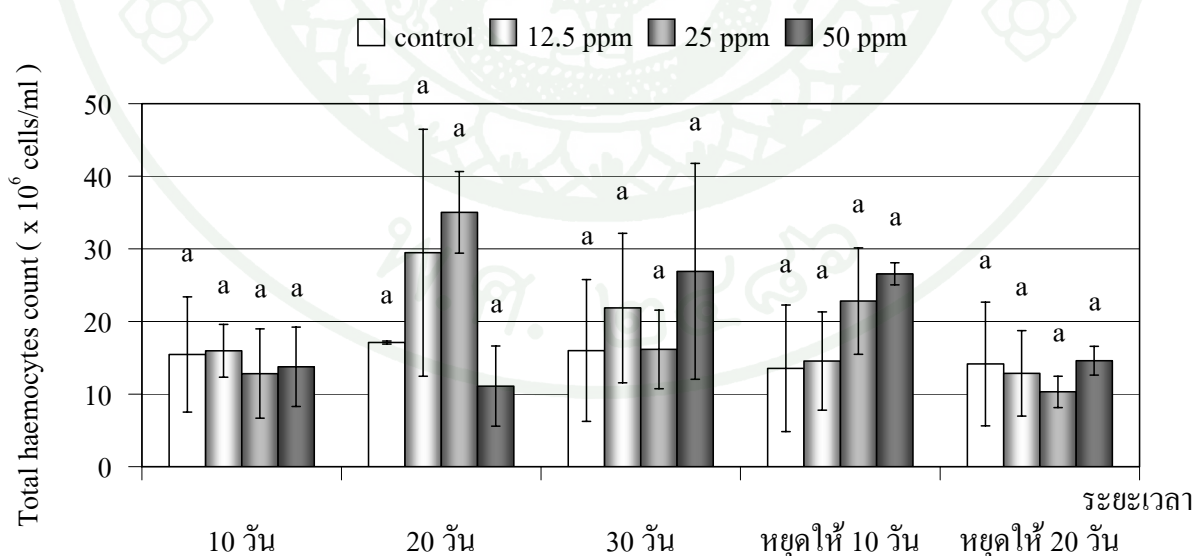
ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามกำหนด พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวมในทุกระยะเวลาการทดลองทั้งชุดควบคุมและชุดทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) นอกจากนี้ยังไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$)

ในระหว่างชุดทดลองในแต่ละช่วงเวลาอีกด้วย แต่พบว่ากุ้งชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 12.5 และ 25 ppm เป็นเวลา 20 และ 30 วัน มีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงกว่าในกุ้งชุดควบคุม (ตารางที่ 8 และภาพที่ 7)

ตารางที่ 8 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)

ระยะเวลา	Treatment			
	Control	12.5 ppm	25 ppm	50 ppm
10 วัน	15.450 $\pm$ 7.943 ^a	15.970 $\pm$ 3.640 ^a	12.825 $\pm$ 6.152 ^a	13.750 $\pm$ 5.470 ^a
20 วัน	17.100 $\pm$ 0.212 ^a	29.470 $\pm$ 17.013 ^a	35.025 $\pm$ 5.621 ^a	11.100 $\pm$ 5.515 ^a
30 วัน	16.000 $\pm$ 9.756 ^a	21.850 $\pm$ 10.294 ^a	16.150 $\pm$ 5.417 ^a	26.900 $\pm$ 14.856 ^a
หยุดให้ 10 วัน	13.550 $\pm$ 8.721 ^a	14.550 $\pm$ 6.762 ^a	22.800 $\pm$ 7.316 ^a	26.550 $\pm$ 1.522 ^a
หยุดให้ 20 วัน	14.150 $\pm$ 8.533 ^a	12.850 $\pm$ 5.887 ^a	10.300 $\pm$ 2.178 ^a	14.600 $\pm$ 1.997 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 7 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)

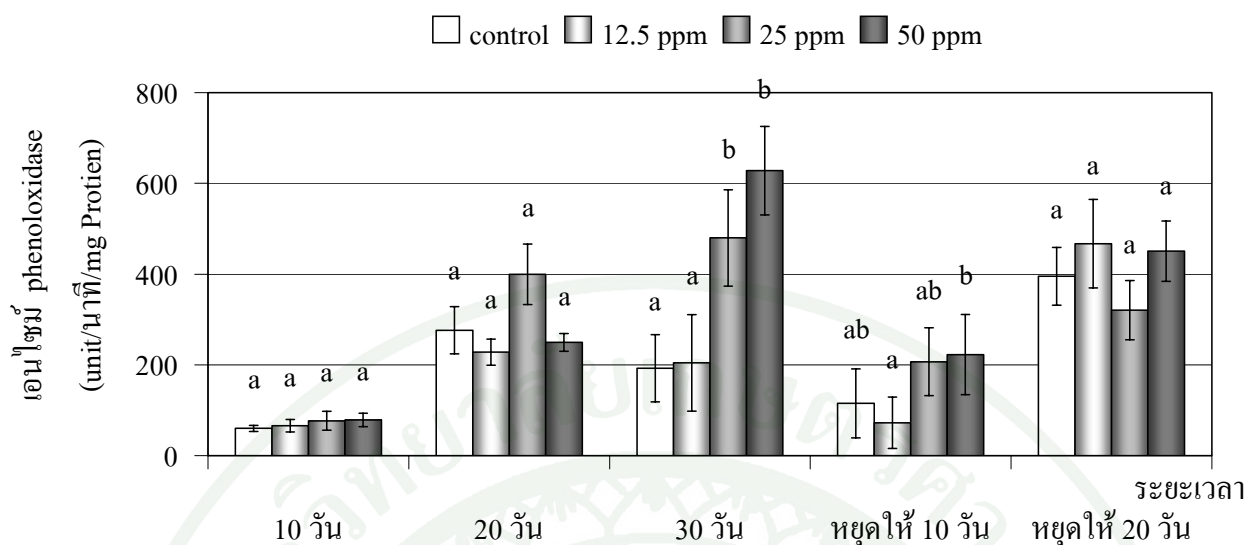
2.1.1.2 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (phenoloxidase activity)

ในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันส่วนใหญ่มีกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase สูงกว่ากุ้งกุลาดำชุดควบคุมอย่างไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) แต่กุ้งกุลาดำชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 25 และ 50 ppm เป็นเวลา 30 วัน มีกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase 479.726 ± 106.310 และ 627.982 ± 97.546 unit/นาฬิกา/mg Protein ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ากุ้งชุดควบคุม และชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 12.5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้เมื่อหยุดให้อาหารทดลองเป็นเวลา 10 วันแล้ว กุ้งกุลาดำชุดที่เคยเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 25 และ 50 ppm ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase สูงกว่ากุ้งกุลาดำชุดควบคุม และชุดที่เคยได้รับอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันระดับ 12.5 ppm อย่างไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 9 และ ภาพที่ 8)

ตารางที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับ และระยะเวลาที่กำหนด (unit/นาฬิกา/mg Protein)

ระยะเวลา	Treatment			
	Control	12.5 ppm	25 ppm	50 ppm
10 วัน	60.217 $\pm$ 6.767 ^a	65.878 $\pm$ 13.659 ^a	76.818 $\pm$ 20.858 ^a	78.659 $\pm$ 14.780 ^a
20 วัน	276.348 $\pm$ 51.770 ^a	228.222 $\pm$ 28.641 ^a	399.622 $\pm$ 66.615 ^a	249.760 $\pm$ 19.643 ^a
30 วัน	192.464 $\pm$ 74.070 ^a	204.445 $\pm$ 106.276 ^a	479.726 $\pm$ 106.310 ^b	627.982 $\pm$ 97.546 ^b
หยุดให้ 10 วัน	115.344 $\pm$ 76.067 ^{ab}	72.529 $\pm$ 56.756 ^a	206.970 $\pm$ 74.890 ^{ab}	222.753 $\pm$ 88.238 ^b
หยุดให้ 20 วัน	395.322 $\pm$ 63.457 ^a	467.186 $\pm$ 97.447 ^a	320.685 $\pm$ 65.297 ^a	450.491 $\pm$ 66.346 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (unit/นาที่/mg Protein)

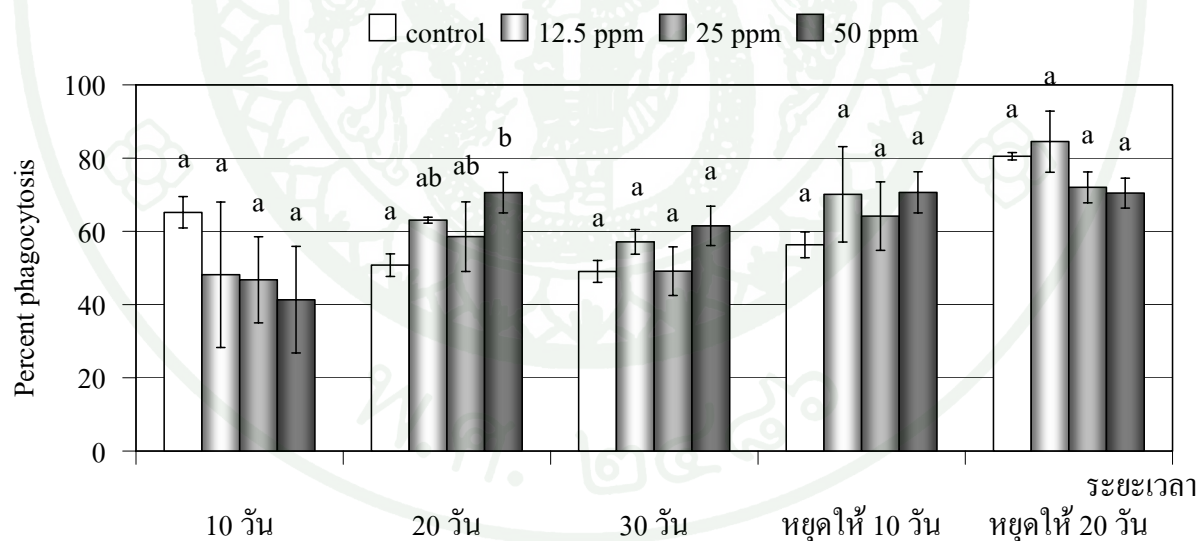
2.1.1.3 กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (phagocytic activity)

percent phagocytosis ของกุ้งกุลาดำชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันทุกชุดมีค่าสูงกว่าในชุดควบคุม แต่มีเพียงกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 50 ppm เป็นระยะเวลา 20 วัน ที่มีค่า percent phagocytosis 70.567 ± 5.516 ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 12.5 และ 25 ppm ซึ่งมีค่า percent phagocytosis 63.068 ± 0.803 และ 58.579 ± 9.514 ตามลำดับ ส่วนกุ้งกุลาดำชุดควบคุม และชุดทดลองอื่นๆ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 10 และ ภาพที่ 9)

ตารางที่ 10 percent phagocytosis ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับ
และระยะเวลาที่กำหนด

ระยะเวลา	Treatment			
	Control	12.5 ppm	25 ppm	50 ppm
10 วัน	65.205±4.288 ^a	48.156±19.840 ^a	46.786±11.753 ^a	41.348±14.571 ^a
20 วัน	50.756±3.090 ^a	63.068±0.803 ^{ab}	58.579±9.514 ^{ab}	70.567±5.516 ^b
30 วัน	49.066±2.964 ^a	57.115±3.363 ^a	49.145±6.648 ^a	61.499±5.384 ^a
หยุดให้ 10 วัน	56.335±3.519 ^a	70.090±13.040 ^a	64.172±9.329 ^a	70.657±5.643 ^a
หยุดให้ 20 วัน	80.519±1.034 ^a	84.491±8.372 ^a	72.024±4.208 ^a	70.450±4.077 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
($P<0.05$)



ภาพที่ 9 percent phagocytosis ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและ
ระยะเวลาดที่กำหนด

2.1.1.4 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด (bactericidal activity)

ในการศึกษาค่า bactericidal activity ของกึ่งกลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน พบว่า กึ่งกลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 12.5 และ 25 ppm เป็นระยะเวลา 10 วัน มีค่า bactericidal activity เท่ากับกึ่งกลาดำในชุดควบคุม คือ 1:8-1:16 แต่ในกึ่งกลาดำชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดที่ระดับ 50 ppm มีค่า bactericidal activity ต่ำกว่าชุดควบคุม ส่วนค่า bactericidal activity ของกึ่งกลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 12.5 และ 25 ppm เป็นเวลา 20 และ 30 วัน มีค่าสูงกว่ากึ่งกลาดำชุดควบคุมเช่นเดียวกันกับช่วงหยุดให้อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันเป็นระยะเวลา 10 และ 20 วัน นอกจากนี้กึ่งกลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันระดับ 12.5 ppm เป็นเวลา 30 วัน มีค่า bactericidal activity เท่ากับ 1:128 ซึ่งสูงกว่ากึ่งกลาดำชุดควบคุม และชุดทดลองอื่นอย่างชัดเจน (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ค่า bactericidal activity ของกึ่งกลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับ และระยะเวลาที่กำหนด

ระยะเวลา	Treatment			
	Control	12.5 ppm	25 ppm	50 ppm
10 วัน	1:8-1:16 (1:16)	1:8-1:16 (1:16)	1:8-1:16 (1:16)	1:2-1:4 (1:4)
20 วัน	1:8	1:8-1:16 (1:16)	1:8-1:16 (1:16)	1:8
30 วัน	1:32-1:64 (1:32)	1:128	1:64	1:64
หยุดให้ 10 วัน	1:8-1:16 (1:16)	1:32	1:32	1:8-1:16 (1:16)
หยุดให้ 20 วัน	1:16	1:64	1:64	1:64

หมายเหตุ ค่า median ของข้อมูลแสดงในวงเล็บ

2.1.2 การศึกษาการใช้สารสกัดขมิ้นชันเพื่อเสริมสุขภาพในกึ่งขาว

เมื่อเลี้ยงกึ่งขาวด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 ppm เป็นเวลา 1 เดือน และเลี้ยงกึ่งขาวต่อด้วยอาหารปกติเป็นระยะเวลา 20 วัน ทำการสุ่มกึ่งขาวทุก ๆ 10 วัน เพื่อทำการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันตลอดการทดลอง ซึ่งผลการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันมีดังนี้

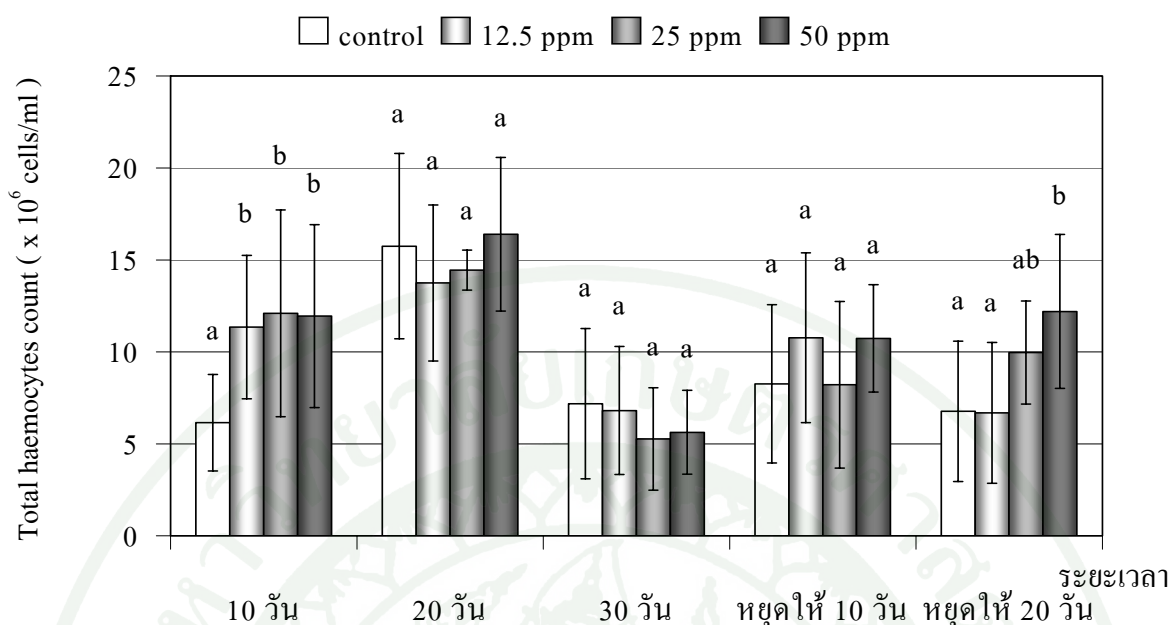
2.1.2.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count)

กุ้งขาวชดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 12.5, 25 และ 50 ppm เป็นเวลา 10 วัน มีค่าปริมาณเม็ดเลือดที่ระดับ $11.350 \pm 3.896 \times 10^6$, $12.100 \pm 5.617 \times 10^6$ และ $11.950 \pm 4.974 \times 10^6$ cells/ml ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่ากุ้งขาวชดควบคุมที่มีปริมาณเม็ดเลือด $6.150 \pm 2.626 \times 10^6$ cells/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าหลังหยุดให้อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันเป็นเวลา 20 วัน ปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 50 ppm มีค่า $12.200 \pm 4.188 \times 10^6$ cells/ml มีค่าสูงกว่ากุ้งชดควบคุม ซึ่งมีค่าปริมาณเม็ดเลือดที่ระดับ $6.767 \pm 3.818 \times 10^6$ cells/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกุ้งขาวชดควบคุม และชดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับต่าง ๆ ในช่วงระยะเวลาอื่น ๆ และ หลังจากหยุดให้อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันนั้น ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณเม็ดเลือด ($P > 0.05$) (ตารางที่ 12 และ ภาพที่ 10)

ตารางที่ 12 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)

ระยะเวลา	Treatment			
	Control	12.5 ppm	25 ppm	50 ppm
10 วัน	6.150 ± 2.626^a	11.350 ± 3.896^b	12.100 ± 5.617^b	11.950 ± 4.974^b
20 วัน	15.750 ± 5.037^a	13.750 ± 4.240^a	14.45 ± 1.087^a	16.400 ± 4.178^a
30 วัน	7.183 ± 4.082^a	6.817 ± 3.480^a	5.267 ± 2.786^a	5.633 ± 2.275^a
หยุดให้ 10 วัน	8.267 ± 4.301^a	10.767 ± 4.619^a	8.217 ± 4.523^a	10.733 ± 2.919^a
หยุดให้ 20 วัน	6.767 ± 3.818^a	6.683 ± 3.826^a	9.967 ± 2.807^{ab}	12.200 ± 4.188^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 10 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)

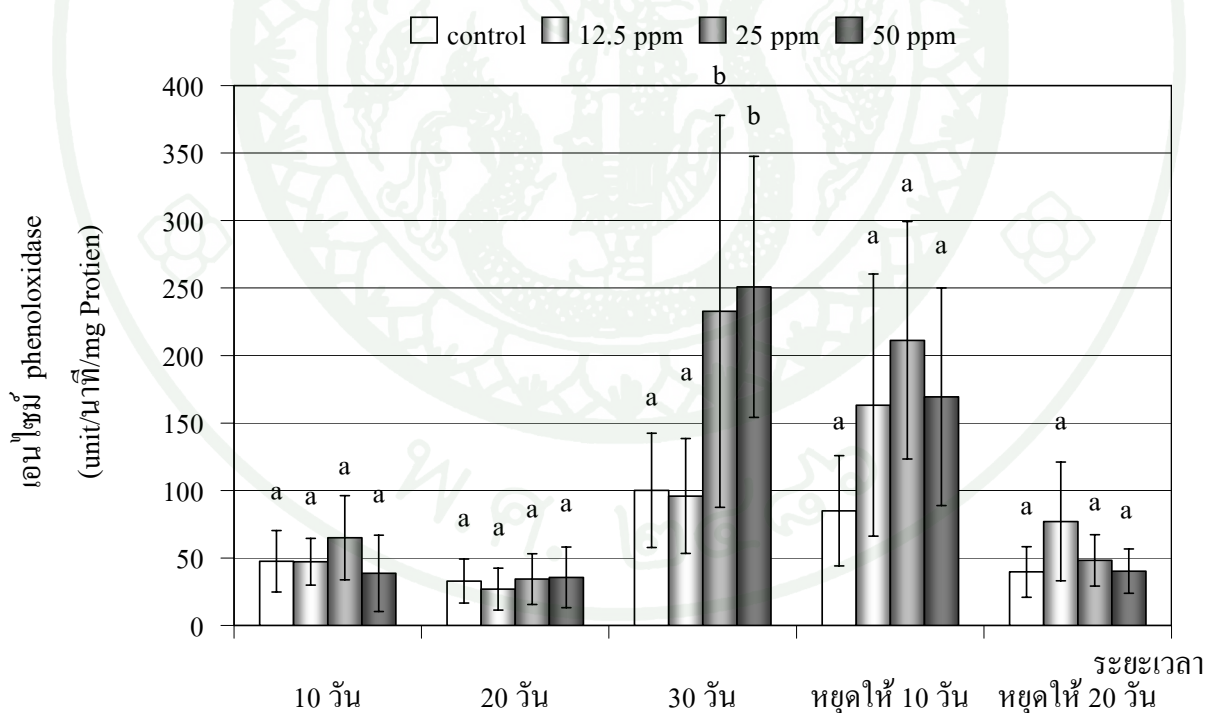
2.1.2.2 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (phenoloxidase activity)

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase พบว่า มีเพียงกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 25 และ 50 ppm เป็นเวลา 30 วัน มีกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase 232.759 ± 145.223 และ 250.863 ± 96.713 unit/นาที่/mg Protein ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่ากุ้งขาวชุดควบคุมและชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 12.5 ppm ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase 100.119 ± 42.345 และ 95.889 ± 42.569 unit/นาที่/mg Protein ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกุ้งขาวชุดควบคุมและชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับต่าง ๆ ในช่วงระยะเวลาอื่น ๆ และ หลังจากหยุดให้อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันนั้นไม่พบความแตกต่างทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ($P > 0.05$) (ตารางที่ 13 และ ภาพที่ 11)

ตารางที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด
ขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (unit/นาฬิกา/mg Protein)

ระยะเวลา	Treatment			
	Control	12.5 ppm	25 ppm	50 ppm
10 วัน	47.579±22.745 ^a	47.240±17.270 ^a	64.926±31.154 ^a	38.677±28.244 ^a
20 วัน	32.925±16.236 ^a	26.959±15.501 ^a	34.329±18.790 ^a	35.576±22.448 ^a
30 วัน	100.119±42.345 ^a	95.889±42.569 ^a	232.759±145.223 ^b	250.863±96.713 ^b
หยุดให้ 10 วัน	84.985±40.755 ^a	163.280±97.130 ^a	211.256±87.970 ^a	169.409±80.659 ^a
หยุดให้ 20 วัน	39.692±34.525 ^a	77.085±43.990 ^a	48.247±19.015 ^a	40.262±16.414 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง
สถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน
ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (unit/นาฬิกา/mg Protein)

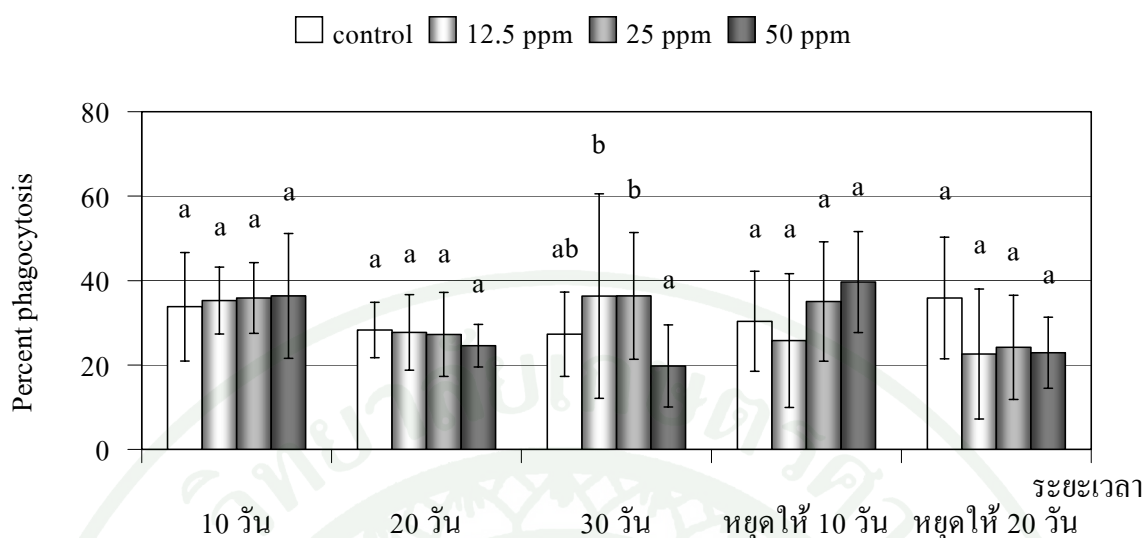
2.1.2.3 กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (phagocytic activity)

ค่า percent phagocytosis ของกุ้งขาวชดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นที่ระดับ 12.5, 25 และ 50 ppm เป็นระยะเวลา 10 และ 20 วัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกุ้งชดควบคุม ($P>0.05$) และระหว่างชุดทดลอง ส่วนกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยสารสกัดไขมันชั้นเป็นเวลา 30 วัน ที่ระดับ 12.5 และ 25 ppm มีค่า percent phagocytosis เท่ากับ 36.319 ± 24.210 และ 36.364 ± 15.025 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าในกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นที่ระดับ 50 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) กุ้งขาวชดควบคุม ส่วนกุ้งขาวชดควบคุมและชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นที่ระดับต่าง ๆ ในช่วงเวลาอื่น ๆ และในช่วงเวลาหลังจากหยุดให้อาหารทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติของ percent phagocytosis (ตารางที่ 14 และ ภาพที่ 12)

ตารางที่ 14 percent phagocytosis ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด

ระยะเวลา	Treatment			
	Control	12.5 ppm	25 ppm	50 ppm
10 วัน	33.796 ± 12.847^a	35.267 ± 7.921^a	35.889 ± 8.362^a	36.368 ± 14.791^a
20 วัน	28.291 ± 6.556^a	27.710 ± 8.950^a	27.254 ± 9.949^a	24.584 ± 5.038^a
30 วัน	27.294 ± 9.986^{ab}	36.319 ± 24.210^b	36.364 ± 15.025^b	19.768 ± 9.738^a
หยุดให้ 10 วัน	30.328 ± 11.834^a	25.817 ± 15.846^a	35.013 ± 14.140^a	39.648 ± 11.939^a
หยุดให้ 20 วัน	35.882 ± 14.406^a	22.605 ± 15.384^a	24.177 ± 12.334^a	22.919 ± 8.420^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 12 percent phagocytosis ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด

2.1.2.4 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด (bactericidal activity)

ค่า bactericidal activity ของกุ้งขาวชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันทุกระดับ และทุกช่วงเวลาตลอดการทดลองมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 25 และ 50 ppm เป็นเวลา 20 วัน มีค่า bactericidal activity เท่ากับ 1:512 และ 1:256 ซึ่งสูงกว่ากุ้งขาวชุดควบคุม และ ชุดที่เลี้ยงด้วยสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 12.5 ppm ที่มีค่า bactericidal activity 1:128 และ 1:128 ตามลำดับ ส่วนกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 12.5, 25 และ 50 ppm เป็นเวลา 30 วัน มีค่า bactericidal activity สูงกว่ากุ้งขาวชุดควบคุมซึ่งมีค่า bactericidal activity 1:64-1:128 เช่นกัน นอกจากนี้หลังจากหยุดให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 10 และ 20 วัน พบว่า กุ้งขาวชุดที่เคยเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันทุกชุดยังคงมีค่า bactericidal activity สูงกว่ากุ้งขาวชุดควบคุม ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ค่า bactericidal activity ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับ และระยะเวลาที่กำหนด

ระยะเวลา	Treatment			
	Control	12.5 ppm	25 ppm	50 ppm
10 วัน	1:64	1:64-1:128 (1:128)	1:64-1:128 (1:128)	1:64-1:128 (1:128)
20 วัน	1:128	1:128	1:512	1:256
30 วัน	1:64-1:128 (1:64)	1:128-1:256 (1:128)	1:256-1:512 (1:256)	1:128-1:256 (1:128)
หยุดให้ 10 วัน	1:64	1:64-1:128 (1:128)	1:64-1:128 (1:128)	1:64-1:128 (1:128)
หยุดให้ 20 วัน	1:64	1:64-1:128 (1:128)	1:64-1:128 (1:128)	1:64-1:128 (1:128)

หมายเหตุ ค่า median ของข้อมูลแสดงในวงเล็บ

2.1.3 การศึกษาการใช้สารสกัดขมิ้นชันเพื่อเสริมสุขภาพในปลานิล

เมื่อเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 20, 40 และ 80 ppm นาน 1 เดือน และเลี้ยงต่อด้วยอาหารปกติเป็นระยะเวลา 15 วัน ทำการสุ่มปลานิล ทุก ๆ 15 วัน เพื่อทำการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันตลอดการทดลอง ซึ่งผลการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันมี ดังนี้

2.1.3.1 ปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cells)

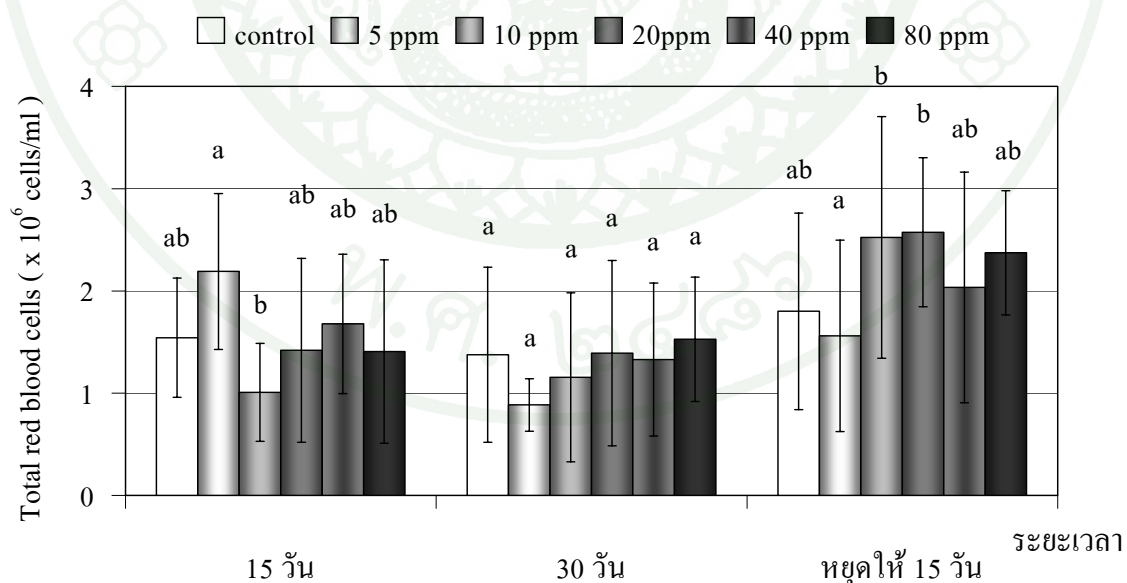
ปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 40 ppm เป็นเวลา 15 วัน มีค่าปริมาณเม็ดเลือดแดง $2.190 \pm 0.763 \times 10^6$ และ $1.677 \pm 0.682 \times 10^6$ cells/ml ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าในปลานิลชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น ๆ แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่ปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันระดับ 10 ppm มีค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงน้อยกว่าปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 5 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนการศึกษาปริมาณเม็ดเลือดแดงของปลานิลที่ 30 วัน ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น และหลังจากหยุดให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดแดงของปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองที่ระดับ 10, 20, 40 และ 80 ppm มีค่า $2.523 \pm 1.182 \times 10^6$, $2.574 \pm 0.728 \times 10^6$, $2.034 \pm 1.127 \times 10^6$ และ

$2.373 \pm 0.607 \times 10^6$ cells/ml ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 16 และ ภาพที่ 13)

ตารางที่ 16 ปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cells) ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด
ขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)

Treatment	ระยะเวลา		
	15 วัน	30 วัน	หยุดให้ 15 วัน
Control	1.542 ± 0.584^{ab}	1.376 ± 0.856^a	1.800 ± 0.961^{ab}
5 ppm	2.190 ± 0.763^a	0.885 ± 0.256^a	1.560 ± 0.936^a
10 ppm	1.008 ± 0.480^b	1.155 ± 0.826^a	2.523 ± 1.182^b
20 ppm	1.419 ± 0.900^{ab}	1.392 ± 0.907^a	2.574 ± 0.728^b
40 ppm	1.677 ± 0.682^{ab}	1.329 ± 0.748^a	2.034 ± 1.127^{ab}
80 ppm	1.407 ± 0.897^{ab}	1.527 ± 0.608^a	2.373 ± 0.607^{ab}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 13 ปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cells) ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด
ขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)

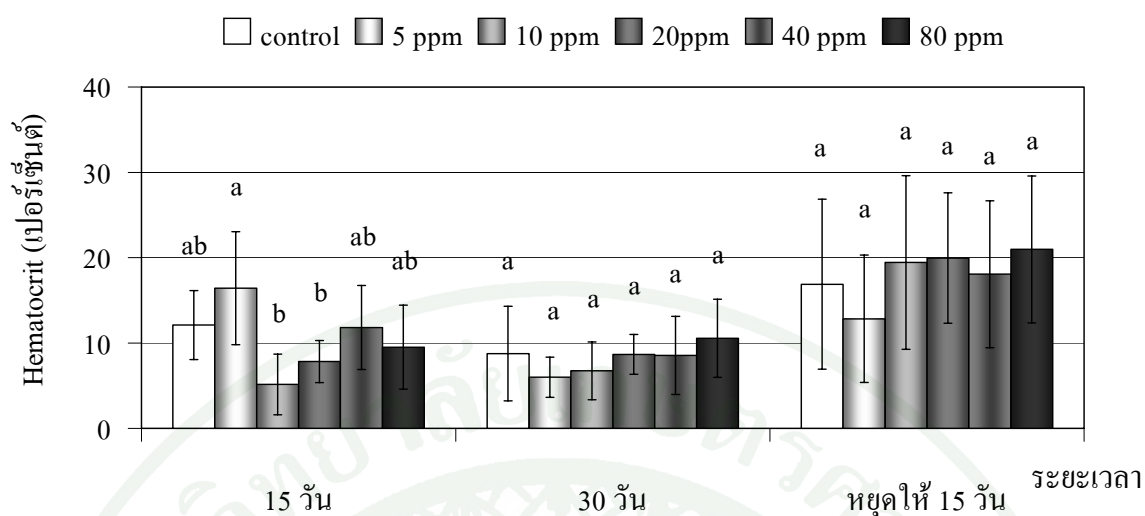
2.1.3.2 ค่า hematocrit

ปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 5 ppm เป็นระยะเวลา 15 วัน มีค่า hematocrit 16.425 ± 6.623 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าในปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมขมิ้นชันที่ 10 และ 20 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) กับปลานิลชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น ๆ ส่วนการศึกษาค่า hematocrit ที่ระยะเวลา 30 วัน และหลังจากหยุดให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของปลานิลชุดควบคุม และ ชุดทดลองอื่น ๆ (ตารางที่ 17 และ ภาพที่ 14)

ตารางที่ 17 ค่า hematocrit ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (เปอร์เซ็นต์)

Treatment	ระยะเวลา		
	15 วัน	30 วัน	หยุดให้ 15 วัน
Control	12.100 ± 4.034^{ab}	8.760 ± 5.546^a	16.890 ± 9.956^a
5 ppm	16.425 ± 6.623^a	6.000 ± 2.356^a	12.840 ± 7.467^a
10 ppm	5.143 ± 3.553^b	6.750 ± 3.386^a	19.440 ± 10.178^a
20 ppm	7.830 ± 2.468^b	8.670 ± 2.335^a	19.950 ± 7.644^a
40 ppm	11.820 ± 6.580^{ab}	8.550 ± 4.581^a	18.060 ± 8.606^a
80 ppm	9.510 ± 4.925^{ab}	10.560 ± 5.340^a	20.970 ± 7.432^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 14 ค่า hematocrit ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นตามระดับ และ ระยะเวลาที่กำหนด (เปอร์เซ็นต์)

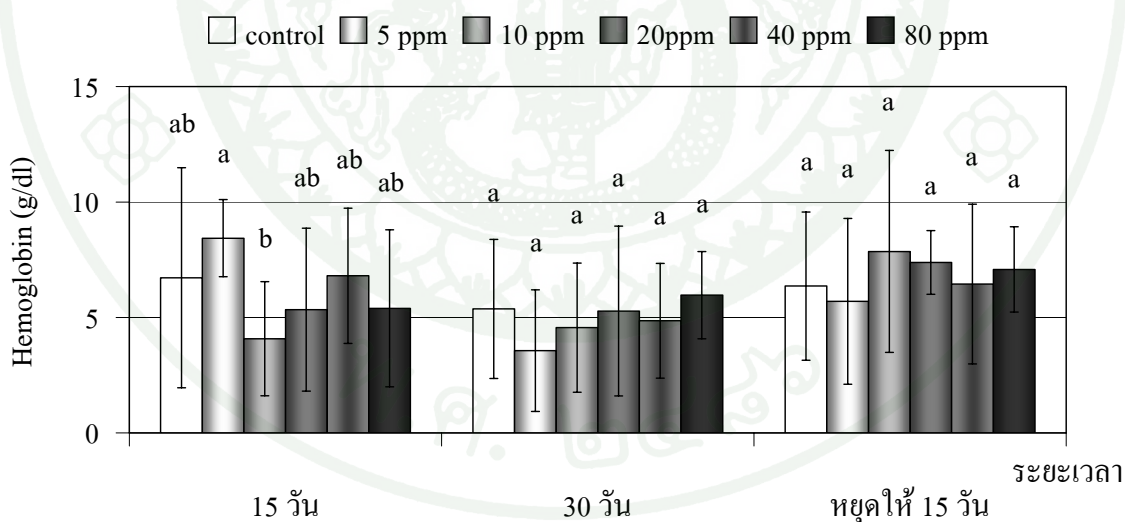
2.1.3.3 ปริมาณ hemoglobin

ปริมาณ hemoglobin ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นที่ระดับ 5 ppm ที่ระยะเวลา 15 วัน มีค่าเท่ากับ 8.437 ± 1.670 g/dl ซึ่งสูงกว่าปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นที่ระดับ 10 ppm ซึ่งมีปริมาณ hemoglobin เท่ากับ 4.080 ± 2.468 g/dl อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) กับปลานิลชุดควบคุมและชุดทดลองอื่นๆ ส่วนการศึกษาที่ระยะเวลา 30 วัน และหลังจากหยุดให้เป็นระยะเวลา 15 วัน ไม่พบความแตกต่างของปริมาณ hemoglobin ในชุดควบคุมและชุดทดลองอื่นๆ (ตารางที่ 18 และ ภาพที่ 15)

ตารางที่ 18 ปริมาณ hemoglobin ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (g/dl)

Treatment	ระยะเวลา		
	15 วัน	30 วัน	หยุดให้ 15 วัน
Control	6.720 ± 4.765 ^{ab}	5.370 ± 3.011 ^a	6.360 ± 3.215 ^a
5 ppm	8.437 ± 1.670 ^a	3.570 ± 2.633 ^a	5.700 ± 3.589 ^a
10 ppm	4.080 ± 2.468 ^b	4.560 ± 2.796 ^a	7.860 ± 4.372 ^a
20 ppm	5.340 ± 3.529 ^{ab}	5.280 ± 3.677 ^a	7.380 ± 2.277 ^a
40 ppm	6.810 ± 2.929 ^{ab}	4.860 ± 2.481 ^a	6.450 ± 3.456 ^a
80 ppm	5.400 ± 3.400 ^{ab}	5.970 ± 1.889 ^a	7.080 ± 1.850 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 15 ปริมาณ hemoglobin ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (g/dl)

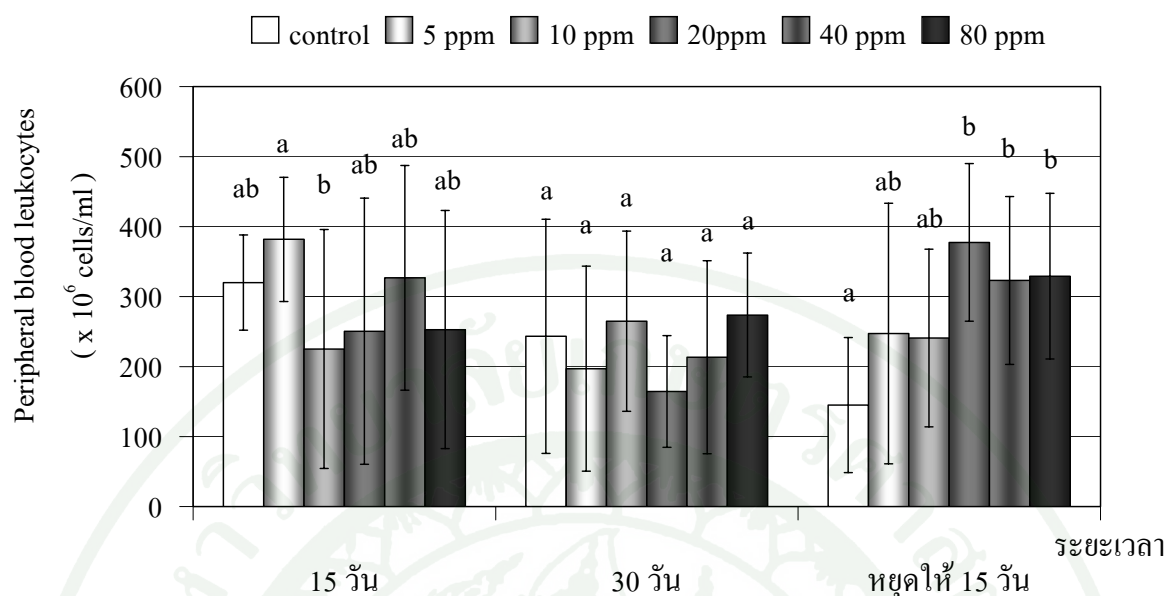
2.1.3.4 จำนวนเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด (peripheral blood leukocytes)

จำนวนเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 5 ppm เป็นระยะเวลา 15 วัน มีค่าเท่ากับ $381.712 \pm 88.637 \times 10^6$ cells/ml ซึ่งสูงกว่าในปลานิลชุดควบคุม และชุดทดลองอื่น ๆ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 10 ppm เพียงชุดเดียว สำหรับในช่วงเวลา 30 วัน ไม่พบความแตกต่างของจำนวนเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของปลานิลชุดควบคุม และระหว่างชุดทดลองอื่น ๆ ($P > 0.05$) และ หลังจากหยุดให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน จำนวนเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของปลานิลชุดควบคุมมีค่า $145.125 \pm 96.579 \times 10^6$ cells/ml ซึ่งต่ำกว่าในชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 20 , 40 และ 80 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับปลานิลชุดทดลองอื่น ๆ (ตารางที่ 19 และ ภาพที่ 16)

ตารางที่ 19 จำนวน peripheral blood leukocytes ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)

Treatment	ระยะเวลา		
	15 วัน	30 วัน	หยุดให้ 15 วัน
Control	320.100 ± 68.105^{ab}	243.360 ± 167.234^a	145.125 ± 96.579^a
5 ppm	381.712 ± 88.637^a	197.014 ± 146.522^a	247.303 ± 186.071^{ab}
10 ppm	225.214 ± 170.612^b	264.729 ± 128.754^a	240.783 ± 126.937^{ab}
20 ppm	250.567 ± 190.083^{ab}	164.550 ± 79.758^a	377.400 ± 112.614^b
40 ppm	326.820 ± 160.601^{ab}	213.467 ± 137.936^a	323.070 ± 120.025^b
80 ppm	252.900 ± 170.032^{ab}	273.767 ± 88.427^a	329.160 ± 118.293^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 16 จำนวน peripheral blood leukocytes ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)

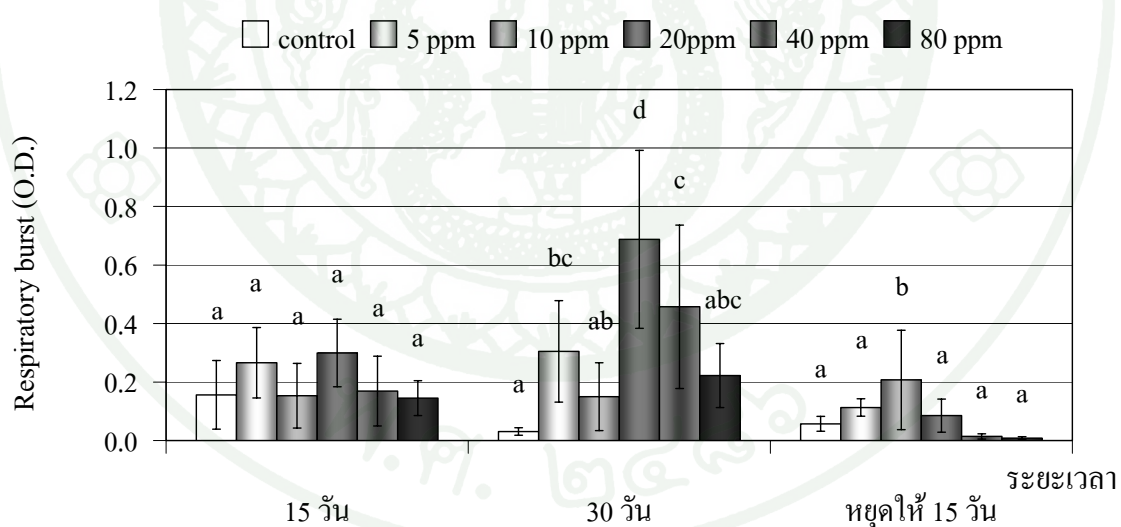
2.1.3.5 ค่า respiratory burst activity

ปลานิลชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันเป็นระยะเวลา 15 วัน มีค่า respiratory burst ไม่แตกต่างทางสถิติกับปลานิลชุดควบคุมและระหว่างชุดทดลอง ($P>0.05$) และหลังจากให้อาหารทดลอง 30 วัน ปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองผสมสารสกัดขมิ้นชันทุกระดับมีค่า respiratory burst สูงกว่าชุดควบคุม แต่มีเพียงปลานิลชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 5, 20 และ 40 ppm ซึ่งมีค่า respiratory burst เท่ากับ 0.305 ± 0.173 , 0.688 ± 0.304 และ 0.457 ± 0.280 ตามลำดับ เท่านั้นที่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุม และนอกจากนี้ปลานิลชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 20 ppm มีค่า respiratory burst แตกต่างกับปลานิลชุดทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนปลานิลชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 40 ppm นั้นยังมีค่า respiratory burst สูงกว่าปลานิลชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยสารสกัดขมิ้นชันที่ 10 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และหลังจากหยุดให้อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันเป็นระยะเวลา 15 วัน ปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 10 ppm มีค่า respiratory burst เท่ากับ 0.207 ± 0.170 ซึ่งสูงกว่าในชุดควบคุม และชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 20 และ ภาพที่ 17)

ตารางที่ 20 ค่า respiratory burst ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (O.D.)

Treatment	ระยะเวลา		
	15 วัน	30 วัน	หยุดให้ 15 วัน
Control	0.156 ± 0.117^a	0.031 ± 0.013^a	0.057 ± 0.025^a
5 ppm	0.266 ± 0.120^a	0.305 ± 0.173^{bc}	0.113 ± 0.029^a
10 ppm	0.153 ± 0.110^a	0.150 ± 0.116^{ab}	0.207 ± 0.170^b
20 ppm	0.299 ± 0.115^a	0.688 ± 0.304^d	0.085 ± 0.057^a
40 ppm	0.169 ± 0.119^a	0.457 ± 0.280^c	0.014 ± 0.009^a
80 ppm	0.145 ± 0.060^a	0.222 ± 0.109^{abc}	0.008 ± 0.005^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 17 ค่า respiratory burst ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (O.D.)

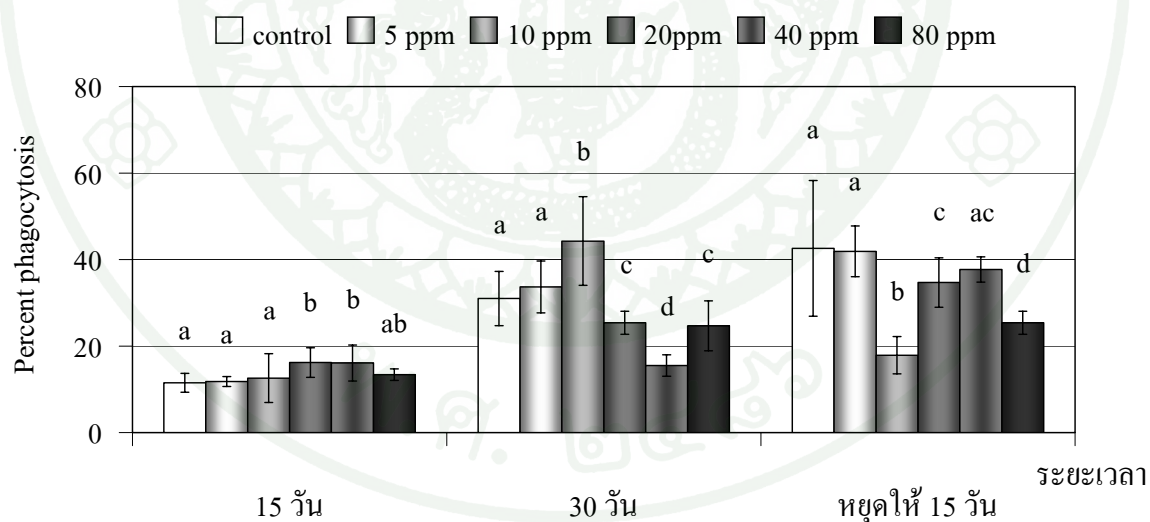
2.1.3.6 กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (phagocytic activity)

ค่า percent phagocytosis ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันทุกชุดทดลอง เป็นระยะเวลา 15 วัน มีค่าสูงสุดควบคุม โดยปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 20 และ 40 ppm มีค่านี้สูงกว่าปลานิลชุดควบคุม และชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 5 และ 10 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 80 ppm ซึ่งมีค่า percent phagocytosis เท่ากับ 13.400 ± 1.323 ไม่พบความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น ๆ ($P > 0.05$) ส่วนที่ระยะเวลา 30 วัน พบว่า ปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 5 และ 10 ppm มีค่า percent phagocytosis สูงกว่าในปลานิลชุดควบคุม แต่พบเพียงปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 10 ppm ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับปลานิลชุดควบคุมและปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับอื่น ๆ นอกจากนั้นปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 20, 40 และ 80 ppm มีค่า percent phagocytosis เท่ากับ 25.400 ± 2.646 , 15.500 ± 2.500 และ 24.700 ± 5.783 ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าปลานิลชุดควบคุมและชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 5 และ 10 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และหลังจากหยุดให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่า ปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันทุกระดับมีค่า percent phagocytosis ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับในปลานิลชุดควบคุมและปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับที่ระดับ 10, 20 และ 80 ppm มีค่า percent phagocytosis ต่ำกว่า ชุดควบคุม และชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 5 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 40 ppm ซึ่งมีค่า percent phagocytosis เท่ากับ 37.700 ± 2.906 ไม่พบความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม ($P > 0.05$) และปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 20 ppm (ตารางที่ 21 และ ภาพที่ 18)

ตารางที่ 21 percent phagocytosis ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด

Treatment	ระยะเวลา		
	15 วัน	30 วัน	หยุดให้ 15 วัน
Control	11.500 $\pm$ 2.186 ^a	31.000 $\pm$ 6.265 ^a	42.600 $\pm$ 15.684 ^a
5 ppm	11.800 $\pm$ 1.167 ^a	33.700 $\pm$ 5.988 ^a	41.900 $\pm$ 5.855 ^a
10 ppm	12.600 $\pm$ 5.674 ^a	44.300 $\pm$ 10.265 ^b	17.900 $\pm$ 4.301 ^b
20 ppm	16.200 $\pm$ 3.444 ^b	25.400 $\pm$ 2.646 ^c	34.700 $\pm$ 5.732 ^c
40 ppm	16.100 $\pm$ 4.167 ^b	15.500 $\pm$ 2.500 ^d	37.700 $\pm$ 2.906 ^{ac}
80 ppm	13.400 $\pm$ 1.323 ^{ab}	24.700 $\pm$ 5.783 ^c	25.400 $\pm$ 2.646 ^d

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวดิ่ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 18 percent phagocytosis ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด

2.2 การศึกษาการใช้สารสกัดฟ้าทะลายโจรเพื่อเสริมสุขภาพในสัตว์น้ำ

2.2.1 การศึกษาการใช้สารสกัดฟ้าทะลายโจรเพื่อเสริมสุขภาพในกึ่งกุลาดำ

เมื่อเลี้ยงกึ่งกุลาดำด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30, 62.5, 125 และ 250 ppm เป็นเวลา 1 เดือน และเลี้ยงต่อด้วยอาหารปกติเป็นระยะเวลา 20 วัน ทำการสุ่มกึ่งกุลาดำทุก ๆ 10 วัน เพื่อทำการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันตลอดการทดลอง ซึ่งผลการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันมีดังนี้

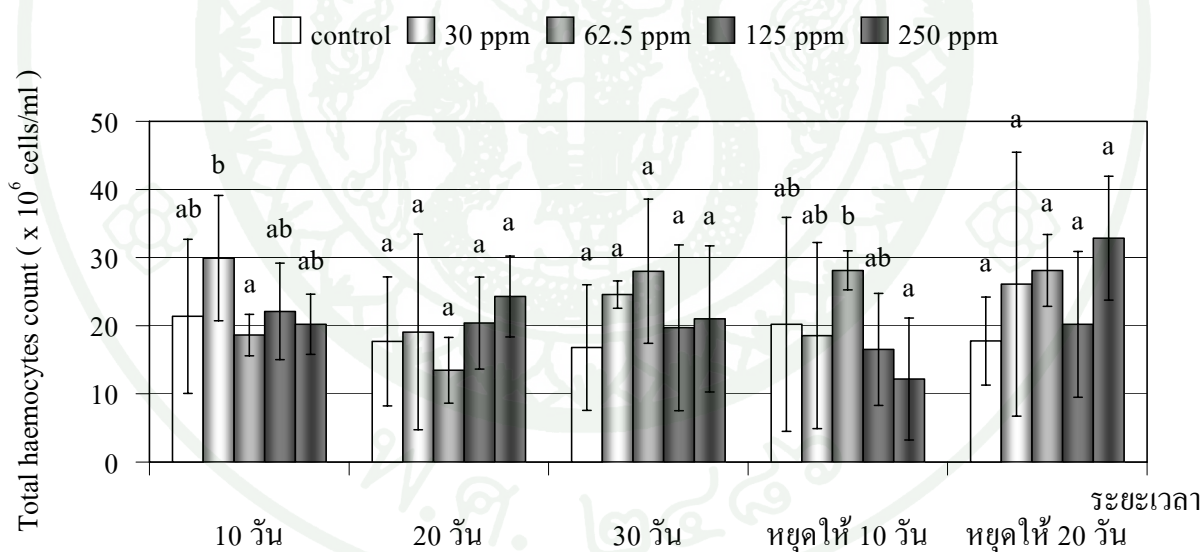
2.2.1.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count)

กึ่งกุลาดำชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30 ppm นาน 10 วัน มีปริมาณเม็ดเลือดเท่ากับ 29.925 ± 9.199 cells/ml ซึ่งสูงกว่าชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 62.5 ppm ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดเท่ากับ 18.625 ± 3.039 cells/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) กับปริมาณเม็ดเลือดรวมในกึ่งชุดควบคุม และชุดทดลองอื่น ๆ ส่วนปริมาณเม็ดเลือดรวมของกึ่งกุลาดำชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 20 และ 30 วัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับปลานิลในชุดควบคุม และระหว่างชุดทดลอง ($P > 0.05$) นอกจากนี้หลังจากหยุดให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 10 วัน กึ่งกุลาดำชุดที่ได้เคยรับอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 62.5 ppm ที่มีปริมาณเม็ดเลือดเท่ากับ 28.125 ± 2.875 cells/ml ซึ่งสูงกว่าในกึ่งชุดที่เคยเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 250 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม และระหว่างชุดทดลองอื่น ๆ สำหรับเวลาหลังจากหยุดให้อาหารทดลอง 20 วัน ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ของปริมาณเม็ดเลือดรวมระหว่างกึ่งกุลาดำชุดทดลอง และชุดควบคุม (ตารางที่ 22 และ ภาพที่ 19)

ตารางที่ 22 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)

Treatment	ระยะเวลา				
	10 วัน	20 วัน	30 วัน	หยุดให้ 10 วัน	หยุดให้ 20 วัน
Control	21.375 $\pm$ 11.311 ^{ab}	17.700 $\pm$ 9.476 ^a	16.800 $\pm$ 9.225 ^a	20.213 $\pm$ 15.703 ^{ab}	17.750 $\pm$ 6.455 ^a
30 ppm	29.925 $\pm$ 9.199 ^b	19.075 $\pm$ 14.349 ^a	24.575 $\pm$ 2.016 ^a	18.550 $\pm$ 13.671 ^{ab}	26.100 $\pm$ 19.375 ^a
62.5 ppm	18.625 $\pm$ 3.039 ^a	13.450 $\pm$ 4.836 ^a	28.000 $\pm$ 10.586 ^a	28.125 $\pm$ 2.875 ^b	28.125 $\pm$ 5.285 ^a
125 ppm	22.100 $\pm$ 7.092 ^{ab}	20.400 $\pm$ 6.761 ^a	19.700 $\pm$ 12.181 ^a	16.525 $\pm$ 8.218 ^{ab}	20.213 $\pm$ 10.710 ^a
250 ppm	20.225 $\pm$ 4.416 ^{ab}	24.300 $\pm$ 5.935 ^a	21.000 $\pm$ 10.743 ^a	12.175 $\pm$ 8.962 ^a	32.850 $\pm$ 9.084 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวนิ่ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 19 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)

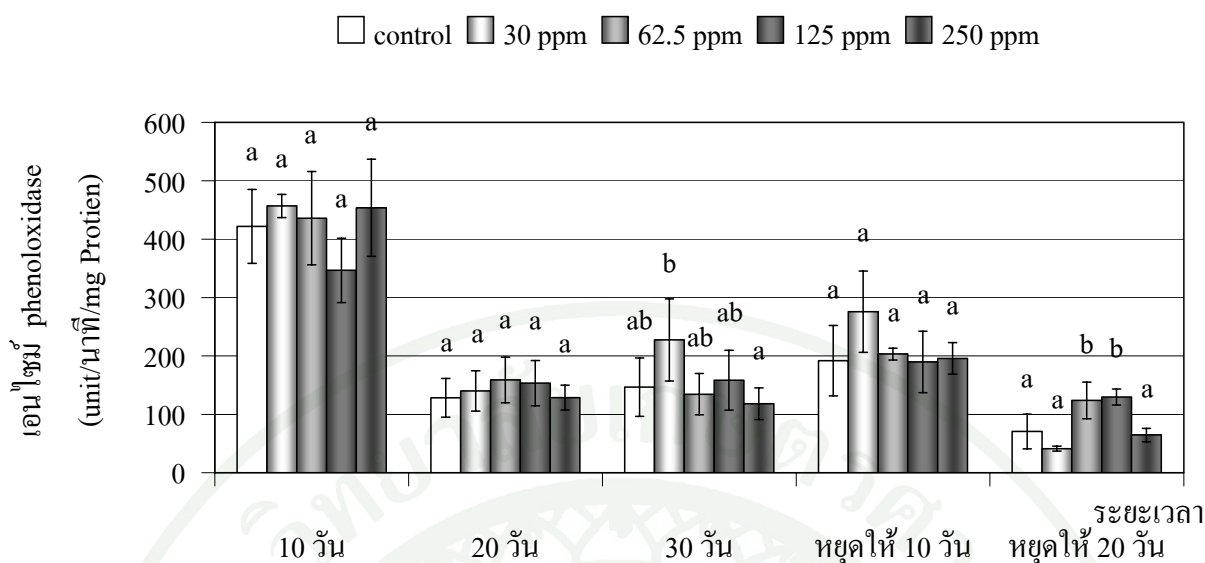
2.2.1.2 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (phenoloxidase activity)

กึ่งกลาดำทั้งชุดควบคุม และชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร เป็นเวลา 10 และ 20 วัน ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ของเอนไซม์ phenoloxidase ระหว่างชุดทดลอง ส่วนกึ่งกลาดำชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30 ppm เป็นเวลา 30 วัน มีกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase สูงกว่าปลานิลชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรระดับ 250 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) กับชุดควบคุม และระหว่างชุดทดลองอื่น ๆ นอกจากนั้น หลังจากหยุดให้อาหารทดลองเป็นเวลา 20 วัน กึ่งกลาดำชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน ที่ระดับ 62.5 และ 125 ppm มีกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase 123.815 ± 31.253 และ 129.760 ± 13.775 unit/นาฬิกา/mg Protein ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม และชุดทดลองที่เคยเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างชุดทดลองอื่น (ตารางที่ 23 และ ภาพที่ 20)

ตารางที่ 23 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกึ่งกลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (unit/นาฬิกา/mg Protein)

Treatment	ระยะเวลา				
	10 วัน	20 วัน	30 วัน	หยุดให้ 10 วัน	หยุดให้ 20 วัน
Control	421.707 ± 63.250^a	128.237 ± 33.138^a	146.575 ± 50.048^{ab}	191.923 ± 60.315^a	70.757 ± 29.857^a
30 ppm	456.806 ± 19.903^a	140.161 ± 34.504^a	227.620 ± 70.352^b	275.627 ± 69.728^a	41.302 ± 4.163^a
62.5 ppm	435.970 ± 79.831^a	158.991 ± 39.050^a	134.398 ± 35.401^{ab}	203.190 ± 10.060^a	123.815 ± 31.253^b
125 ppm	346.576 ± 55.162^a	153.550 ± 38.851^a	158.519 ± 51.184^{ab}	189.752 ± 52.618^a	129.760 ± 13.775^b
250 ppm	453.700 ± 83.276^a	128.700 ± 21.287^a	118.311 ± 27.124^a	195.724 ± 26.985^a	64.551 ± 11.600^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวดิ่ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 20 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (unit/นาที/mg Protein)

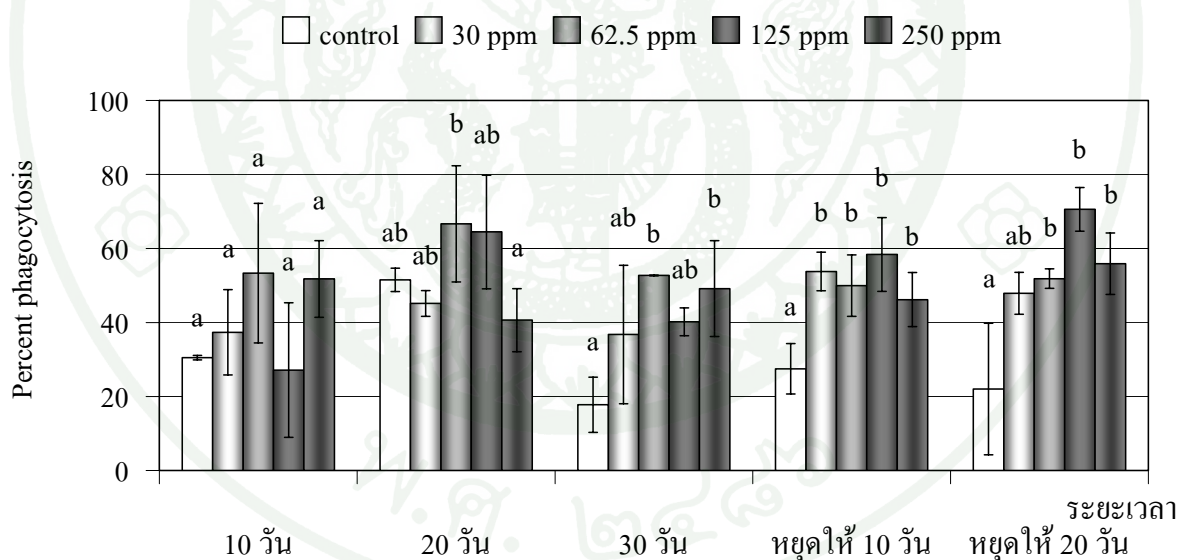
2.2.1.3 กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (phagocytic activity)

percent phagocytosis ของกุ้งกุลาดำชุดควบคุม และชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรทุกระดับ เป็นระยะเวลา 10 วัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนกุ้งชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 62.5 ppm เป็นระยะเวลา 20 วัน มี percent phagocytosis เท่ากับ 66.667 ± 15.713 สูงกว่าชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 250 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) กับชุดควบคุมและชุดทดลองอื่นในเวลาเดียวกัน สำหรับกุ้งกุลาดำชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรทุกระดับ เป็นระยะเวลา 30 วัน มีค่าสูงกว่าในกุ้งกุลาดำชุดควบคุม แต่มีเพียงชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 62.5 และ 250 ppm ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากชุดควบคุม แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) กับชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30 และ 125 ppm และ เมื่อหยุดให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 10 วัน ค่า percent phagocytosis ของกุ้งชุดทดลองยังคงมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนกุ้งกุลาดำที่หยุดให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 20 วันนั้นพบว่า กุ้งกุลาดำชุดที่เคยเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 62.5, 125 และ 250 ppm เท่านั้น ที่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) จากกุ้งกุลาดำชุดควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างกุ้งชุดทดลองทั้ง 3 ชุด (ตารางที่ 24 และ ภาพที่ 21)

ตารางที่ 24 percent phagocytosis ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด

Treatment	ระยะเวลา				
	10 วัน	20 วัน	30 วัน	หยุดให้ 10 วัน	หยุดให้ 20 วัน
Control	30.488±0.604 ^a	51.518±3.149 ^{ab}	17.779±7.477 ^a	27.491±6.842 ^a	22.042±17.782 ^a
30 ppm	37.656±11.543 ^a	45.151±3.490 ^{ab}	36.765±18.717 ^{ab}	53.800±5.236 ^b	47.901±5.654 ^{ab}
62.5 ppm	53.333±18.856 ^a	66.667±15.713 ^b	52.705±0.103 ^b	58.400±9.966 ^b	51.859±2.630 ^b
125 ppm	27.143±18.183 ^a	64.461±15.340 ^{ab}	40.178±3.788 ^{ab}	61.842±9.967 ^b	70.833±5.892 ^b
250 ppm	51.768±10.357 ^a	40.641±8.521 ^a	49.167±12.964 ^b	46.188±7.301 ^b	55.882±8.319 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวนั่ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 21 percent phagocytosis ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด

2.2.1.4 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด (bactericidal activity)

กึ่งกลาดำชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30 ppm เป็นเวลา 10 และ 20 วัน มีค่า bactericidal activity สูงกว่าชุดควบคุม และชุดทดลองอื่น ๆ ส่วนที่ 30 วัน พบว่าค่า bactericidal activity ของชุดควบคุมและชุดทดลองใกล้เคียงกัน และหลังจากหยุคให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 10 วัน ค่า bactericidal activity ของชุดควบคุมและชุดทดลองยังคงใกล้เคียงกัน ส่วนหลังจากหยุคให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 20 วัน กึ่งกลาดำชุดที่เคยเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรทุกระดับมีค่า bactericidal activity สูงกว่าชุดควบคุม (ตารางที่ 25)

ตารางที่ 25 ค่า bactericidal activity ของกึ่งกลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด

Treatment	ระยะเวลา				
	10 วัน	20 วัน	30 วัน	หยุคให้ 10 วัน	หยุคให้ 20 วัน
Control	1:8	1:8-1:16 (1:8)	1:16-1:32 (1:32)	1:4-1:8 (1:8)	1:4
30 ppm	1:8-1:16 (1:16)	1:8-1:16 (1:16)	1:32	1:4-1:8 (1:8)	1:16
62.5 ppm	1:8	1:8	1:32	1:8	1:8
125 ppm	1:8	1:8	1:16-1:32 (1:32)	1:4-1:8 (1:8)	1:4-1:8 (1:8)
250 ppm	1:8	1:8-1:16 (1:8)	1:16-1:32 (1:32)	1:4-1:8 (1:8)	1:8

หมายเหตุ ค่า median ของข้อมูลแสดงในวงเล็บ

2.2.2 การศึกษาการใช้สารสกัดฟ้าทะลายโจรเพื่อเสริมสุขภาพในกุ้งขาว

เมื่อเลี้ยงกุ้งขาวด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30, 62.5, 125 และ 250 ppm เป็นเวลา 1 เดือนและเลี้ยงกุ้งขาวต่อด้านอาหารปกติเป็นระยะเวลา 20 วัน ทำการสุ่มกุ้งขาวทุก ๆ 10 วัน เพื่อทำการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันตลอดการทดลอง ซึ่งผลการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันมีดังนี้

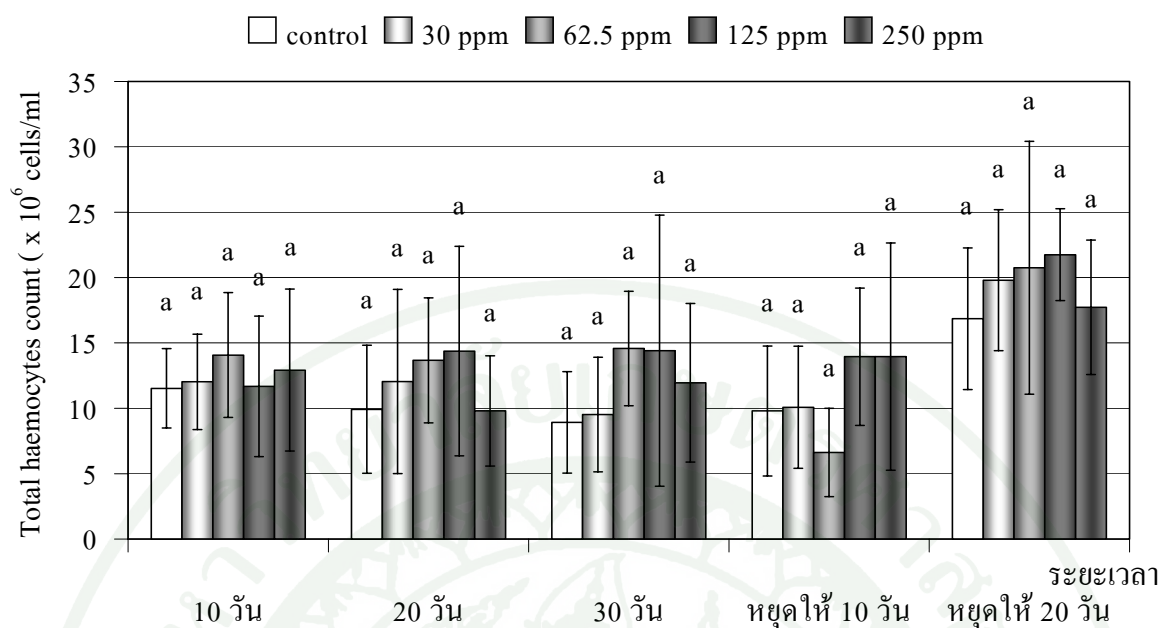
2.2.2.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count)

กุ้งขาวชดควบคุมและชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับความเข้มข้น 30, 62.5, 125 และ 250 ppm เป็นเวลา 10, 20 และ 30 วัน และหยุดให้อีก 20 วันมีปริมาณเม็ดเลือดรวมไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 26 และ ภาพที่ 22)

ตารางที่ 26 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)

Treatment	ระยะเวลา				
	10 วัน	20 วัน	30 วัน	หยุดให้ 10 วัน	หยุดให้ 20 วัน
Control	11.525 $\pm$ 3.038 ^a	9.925 $\pm$ 4.902 ^a	8.925 $\pm$ 3.880 ^a	9.800 $\pm$ 4.973 ^a	16.850 $\pm$ 5.421 ^a
30 ppm	12.025 $\pm$ 3.647 ^a	12.050 $\pm$ 7.039 ^a	9.525 $\pm$ 4.378 ^a	10.075 $\pm$ 4.677 ^a	19.800 $\pm$ 5.938 ^a
62.5 ppm	14.075 $\pm$ 4.775 ^a	13.675 $\pm$ 4.786 ^a	14.575 $\pm$ 4.378 ^a	6.625 $\pm$ 3.377 ^a	20.750 $\pm$ 9.673 ^a
125 ppm	11.675 $\pm$ 5.374 ^a	14.375 $\pm$ 8.015 ^a	14.400 $\pm$ 10.371 ^a	13.950 $\pm$ 5.252 ^a	21.750 $\pm$ 3.515 ^a
250 ppm	12.925 $\pm$ 6.199 ^a	9.800 $\pm$ 4.216 ^a	11.950 $\pm$ 6.063 ^a	13.950 $\pm$ 8.694 ^a	17.725 $\pm$ 5.142 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 22 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocytes count) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (x 10⁶ cells/ml)

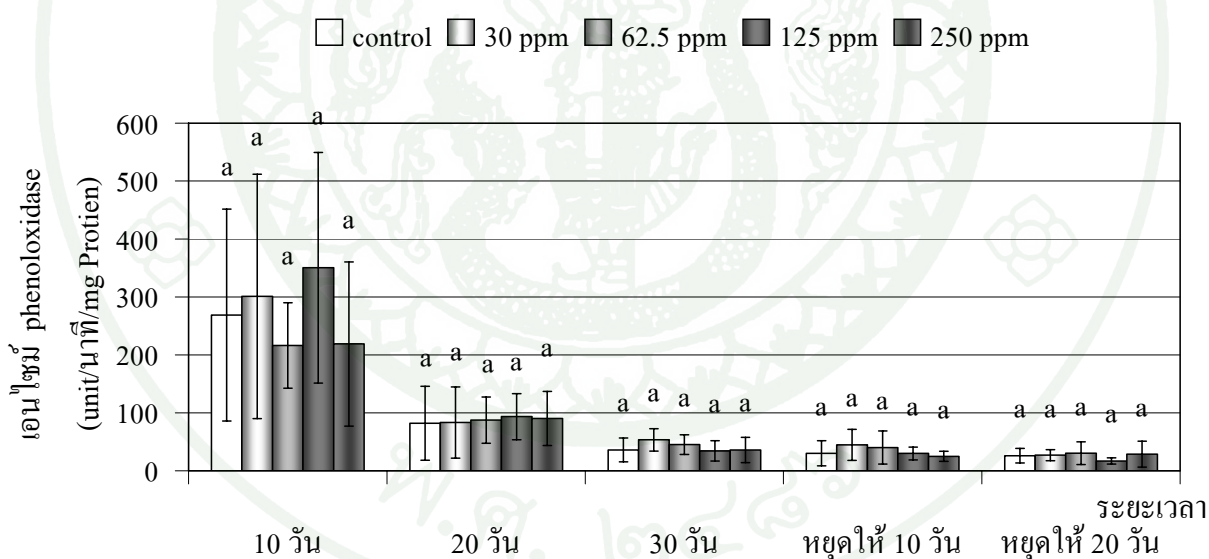
2.2.2.2 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (phenoloxidase activity)

กุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรทุกระดับความเข้มข้นเป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน และหยุดให้อีก 20 วัน มีกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุมและระหว่างชุดทดลอง ($P>0.05$) (ตารางที่ 27 และ ภาพที่ 23)

ตารางที่ 27 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด
ฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (unit/นาฬิกา/ mg Protein)

Treatment	ระยะเวลา				
	10 วัน	20 วัน	30 วัน	หยุดให้ 10 วัน	หยุดให้ 20 วัน
Control	268.797±182.801 ^a	82.020±63.784 ^a	36.111±20.549 ^a	30.239±21.632 ^a	26.184±12.562 ^a
30 ppm	300.900±210.891 ^a	83.257±61.529 ^a	53.477±19.256 ^a	44.751±26.830 ^a	26.969±9.514 ^a
62.5 ppm	216.269±73.677 ^a	87.546±39.757 ^a	45.197±17.011 ^a	40.140±28.648 ^a	30.489±19.477 ^a
125 ppm	350.520±199.000 ^a	93.469±39.721 ^a	34.524±17.556 ^a	30.052±11.089 ^a	17.018±5.432 ^a
250 ppm	218.823±141.824 ^a	90.357±46.661 ^a	36.132±21.765 ^a	24.953±8.674 ^a	28.826±22.479 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
($P < 0.05$)



ภาพที่ 23 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด
ฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (unit/นาฬิกา/mg Protein)

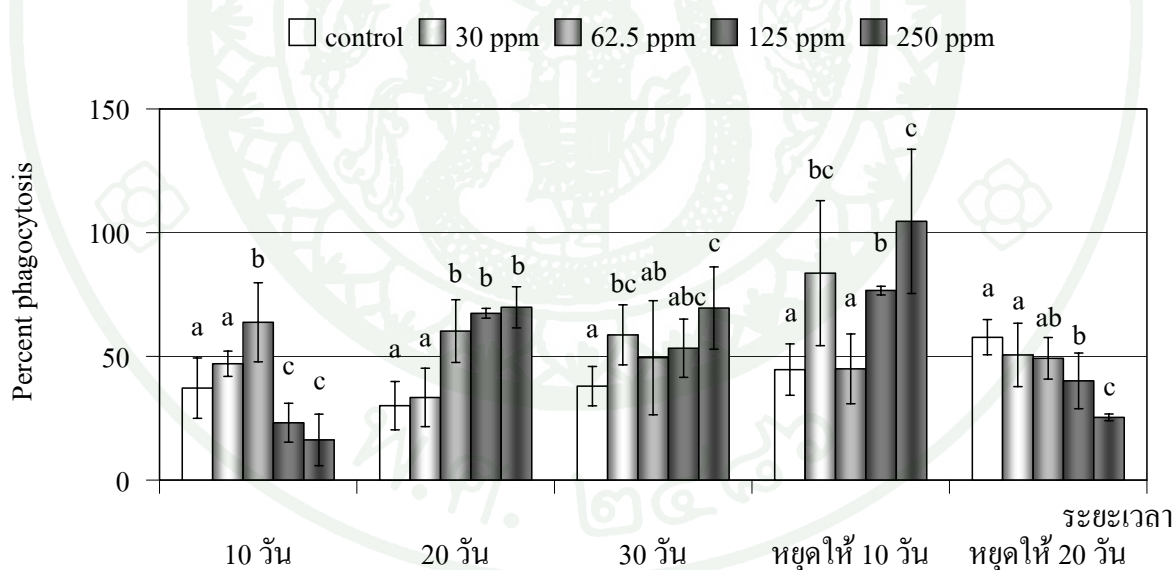
2.2.2.3 กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (phagocytic activity)

ที่ระยะเวลา 10 วัน กุ้งขาวชดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 62.5 ppm มีค่า percent phagocytosis เท่ากับ 63.778 ± 15.974 ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม และชุดทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30 ppm แม้จะมีค่า percent phagocytosis สูงกว่าในกุ้งขาวชุดควบคุมแต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) สำหรับกุ้งขาวชดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 125 และ 250 ppm มีค่า percent phagocytosis น้อยกว่าชุดควบคุมและกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรระดับอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในวันที่ 20 พบว่า กุ้งชดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ 62.5, 125 และ 250 ppm มีค่า 60.240 ± 12.681 , 67.437 ± 1.970 และ 69.806 ± 8.293 ซึ่งสูงกว่าและแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) จากชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น ส่วนที่ 30 วัน กุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรทุกชุดมี percent phagocytosis สูงกว่าชุดควบคุม แต่มีเพียงกุ้งชดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30 และ 250 ppm ที่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกุ้งขาวชุดควบคุม แต่สำหรับกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 250 ppm นั้นมีค่า percent phagocytosis ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) กับกุ้งชดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30 และ 125 ppm แต่แตกต่างทางสถิติกับกุ้งชดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 62.5 ppm และเมื่อหยุดให้อาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรเป็นเวลา 10 วัน พบว่า กุ้งขาวทดลองทุกชุดที่ได้เคยรับอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรมีค่า percent phagocytosis สูงกว่าในกุ้งขาวชุดควบคุม แต่เฉพาะที่ระดับ 30, 125 และ 250 ppm ที่มีค่า percent phagocytosis สูงกว่ากุ้งชุดควบคุม และชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 62.5 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างชุดทดลองดังกล่าว สำหรับช่วงหยุดให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 20 วันนั้น พบว่า กุ้งขาวทุกชุดที่เคยเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรในทุกระดับมีค่า percent phagocytosis ต่ำกว่ากุ้งขาวชุดควบคุม โดยในกุ้งขาวชดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 125 และ 250 ppm มีค่า percent phagocytosis ต่ำกว่าชุดควบคุม และ ชุดที่เคยเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ ระดับ 30 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 28 และ ภาพที่ 24)

ตารางที่ 28 percent phagocytosis ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตาม
ระดับและระยะเวลาที่กำหนด

Treatment	ระยะเวลา				
	10 วัน	20 วัน	30 วัน	หยุดให้ 10 วัน	หยุดให้ 20 วัน
Control	37.158±12.214 ^a	30.088±9.788 ^a	37.939±7.932 ^a	44.645±10.427 ^a	57.747±7.121 ^a
30 ppm	47.023±5.113 ^a	33.387±11.818 ^a	58.658±12.131 ^{bc}	83.616±29.281 ^{bc}	50.564±12.793 ^a
62.5 ppm	63.778±15.974 ^b	60.240±12.681 ^b	49.444±23.040 ^{ab}	44.958±14.117 ^a	49.210±8.447 ^{ab}
125 ppm	23.178±7.837 ^c	67.437±1.970 ^b	53.273±11.738 ^{abc}	76.587±1.794 ^b	40.048±11.266 ^b
250 ppm	16.219±10.363 ^c	69.806±8.293 ^b	69.541±16.620 ^c	104.541±29.142 ^c	25.334±1.340 ^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวนั่ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
($P < 0.05$)



ภาพที่ 24 percent phagocytosis ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับ
และระยะเวลาที่กำหนด

2.2.2.4 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด (bactericidal activity)

กุ้งขาวชดควบคุมที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน พบทุกชุดการทดลองมีกิจกรรม bactericidal activity ใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 1:4 – 1:8 เช่นเดียวกับในระยะเวลา 20 วัน ซึ่งมีค่า bactericidal activity 1:8-1:32 ยกเว้นกุ้งชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 250 ppm ที่มีค่า bactericidal activity เท่ากับ 1:8 ส่วนที่ระยะเวลา 30 วันมีค่า bactericidal activity ใกล้เคียงกันที่ระดับ 1:16-1:32 ในกุ้งขาวชดควบคุมและชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30 และ 62.5 ppm ส่วนกุ้งชุดที่รับอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 125 และ 250 ppm ที่มีค่า bactericidal activity ที่ 1:16 สำหรับในช่วงหลังจากหยุดให้อาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรเป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่า กุ้งขาวชุดที่ได้เคยรับอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 125 ppm มีค่า bactericidal activity 1:4 ซึ่งต่ำกว่าในชุดควบคุม และชุดอื่น ๆ ที่มีค่า bactericidal activity ช่วง 1:4-1:8 นอกจากนั้นหลังจากหยุดให้อาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรเป็นระยะเวลา 20 วัน พบกุ้งขาวชดควบคุมและชุดทดลองที่เคยเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30, 62.5 และ 125 ppm มีค่า bactericidal activity ที่ 1:16-1:32 เว้นแต่ที่ระดับ 250 ppm ที่มีค่า bactericidal activity เท่ากับ 1:4 – 1:8 ดังตารางที่ 29

ตารางที่ 29 ค่า bactericidal activity ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด

Treatment	ระยะเวลา				
	10 วัน	20 วัน	30 วัน	หยุดให้ 10 วัน	หยุดให้ 20 วัน
Control	1:4	1:8-1:32 (1:8)	1:16-1:32 (1:16)	1:4-1:8 (1:4)	1:16-1:32 (1:16)
30 ppm	1:4	1:16-1:32 (1:32)	1:16-1:32 (1:32)	1:4-1:8 (1:4)	1:16-1:32 (1:16)
62.5 ppm	1:4-1:8 (1:4)	1:8-1:32 (1:32)	1:16-1:32 (1:32)	1:4-1:8 (1:4)	1:16-1:32 (1:16)
125 ppm	1:4	1:8-1:32 (1:8)	1:16	1:4	1:16-1:32 (1:16)
250 ppm	1:4-1:8 (1:4)	1:8	1:16	1:4-1:8 (1:4)	1:4-1:8 (1:4)

หมายเหตุ ค่า median ของข้อมูลแสดงในวงเล็บ

2.2.3 การศึกษาการใช้สารสกัดฟ้าทะลายโจรเพื่อเสริมสุขภาพในปลานิล

เมื่อเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 5, 10 20, 40 และ 80 ppm เป็นเวลา 1 เดือน และเลี้ยงปลานิลต่อด้วยอาหารปกติเป็นระยะเวลา 15 วัน ทำการสุ่มปลานิลทุก ๆ 15 วัน เพื่อทำการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันตลอดการทดลอง ซึ่งผลการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันมีดังนี้

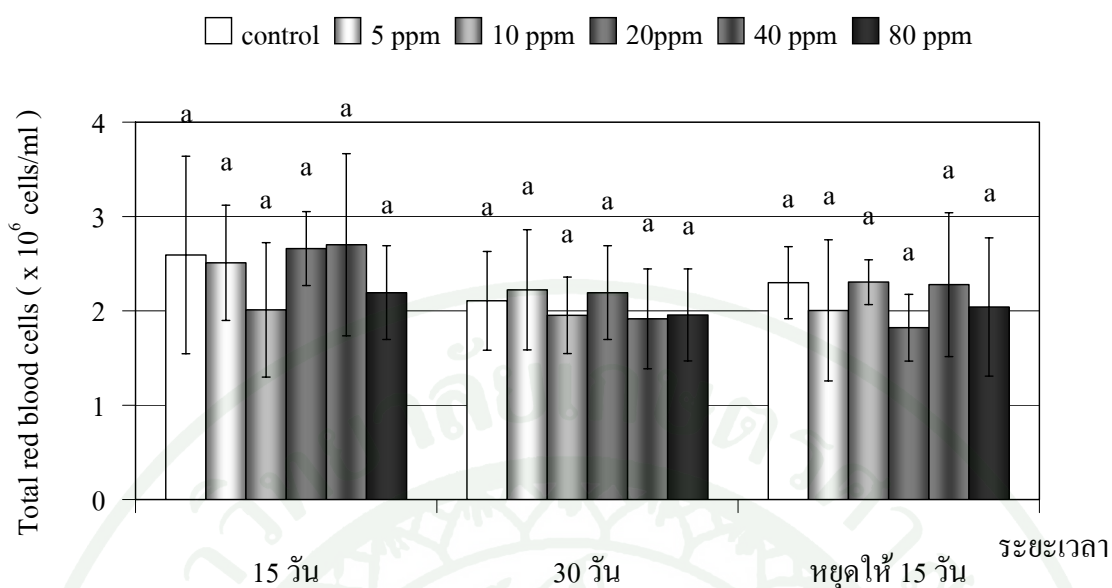
2.2.3.1 ปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cells)

ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณเม็ดเลือดแดงตลอดช่วงการทดลอง ($P > 0.05$) โดยที่ 15 วัน อยู่ในช่วง $2.010 \pm 0.713 \times 10^6$ - $2.700 \pm 0.965 \times 10^6$ cells/ml ระยะเวลา 30 วัน อยู่ในช่วง $1.914 \pm 0.529 \times 10^6$ - $2.223 \pm 0.637 \times 10^6$ cells/ml และหลังจากหยุดให้ 15 วัน อยู่ในช่วง $1.821 \pm 0.354 \times 10^6$ - $2.304 \pm 0.237 \times 10^6$ cells/ml (ตารางที่ 30 และ ภาพที่ 25)

ตารางที่ 30 ปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cells) ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)

Treatment	ระยะเวลา		
	15 วัน	30 วัน	หยุดให้ 15 วัน
Control	2.592 ± 1.047^a	2.106 ± 0.523^a	2.298 ± 0.382^a
5 ppm	2.508 ± 0.610^a	2.223 ± 0.637^a	2.004 ± 0.749^a
10 ppm	2.010 ± 0.713^a	1.953 ± 0.405^a	2.304 ± 0.237^a
20 ppm	2.661 ± 0.392^a	2.193 ± 0.497^a	1.821 ± 0.354^a
40 ppm	2.700 ± 0.965^a	1.914 ± 0.529^a	2.277 ± 0.762^a
80 ppm	2.193 ± 0.498^a	1.956 ± 0.487^a	2.040 ± 0.732^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวดิ่ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 25 ปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cells) ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด ฟื้ทะเลลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)

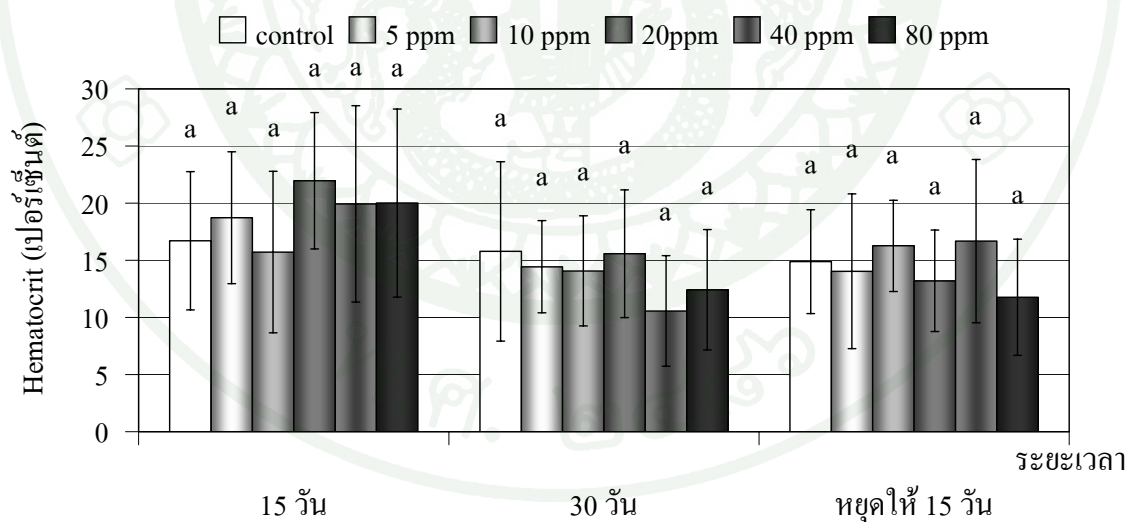
2.2.3.2 ค่า hematocrit

ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของค่า hematocrit ตลอดช่วงการทดลอง ($P > 0.05$) โดยที่ 15 วัน อยู่ในช่วง $15.720 \pm 7.061 - 21.960 \pm 5.958$ เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 30 วัน อยู่ในช่วง $10.560 \pm 4.839 - 15.780 \pm 7.853$ เปอร์เซ็นต์ และหลังจากหยุดให้ 15 วัน อยู่ในช่วง $11.760 \pm 5.081 - 16.260 \pm 3.982$ เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 31 และ ภาพที่ 26)

ตารางที่ 31 ค่า hematocrit ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (เปอร์เซ็นต์)

Treatment	ระยะเวลา		
	15 วัน	30 วัน	หยุดให้ 15 วัน
Control	16.710 ± 6.053 ^a	15.780 ± 7.853 ^a	14.880 ± 4.548 ^a
5 ppm	18.720 ± 5.776 ^a	14.430 ± 4.036 ^a	14.040 ± 6.776 ^a
10 ppm	15.720 ± 7.061 ^a	14.070 ± 4.824 ^a	16.260 ± 3.982 ^a
20 ppm	21.960 ± 5.958 ^a	15.570 ± 5.586 ^a	13.200 ± 4.443 ^a
40 ppm	19.933 ± 8.584 ^a	10.560 ± 4.839 ^a	16.680 ± 7.139 ^a
80 ppm	20.010 ± 8.233 ^a	12.420 ± 5.261 ^a	11.760 ± 5.081 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 26 ค่า hematocrit ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (เปอร์เซ็นต์)

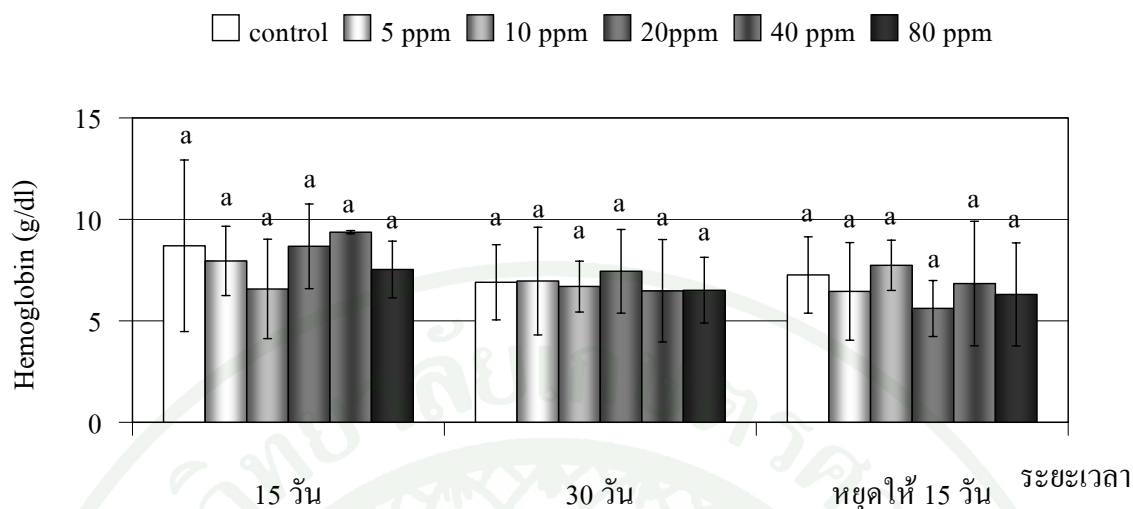
2.2.3.3 ปริมาณ hemoglobin

จากการศึกษาปริมาณ hemoglobin ของปลานิลไม่พบความแตกต่างทางสถิติตลอดช่วงการทดลอง ($P>0.05$) โดยที่ 15 วัน อยู่ในช่วง $6.570 \pm 2.447 - 9.367 \pm 3.806$ g/dl ระยะเวลา 30 วันอยู่ในช่วง $6.480 \pm 2.523 - 7.440 \pm 2.063$ g/dl และหลังจากหยุดให้ 15 วัน อยู่ในช่วง $5.610 \pm 1.379 - 7.740 \pm 1.239$ g/dl (ตารางที่ 32 และ ภาพที่ 27)

ตารางที่ 32 ปริมาณ hemoglobin ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (g/dl)

Treatment	ระยะเวลา		
	15 วัน	30 วัน	หยุดให้ 15 วัน
Control	8.700 ± 4.226^a	6.900 ± 1.855^a	7.260 ± 1.880^a
5 ppm	7.950 ± 1.704^a	6.960 ± 2.656^a	6.450 ± 2.405^a
10 ppm	6.570 ± 2.447^a	6.690 ± 1.249^a	7.740 ± 1.239^a
20 ppm	8.670 ± 2.085^a	7.440 ± 2.063^a	5.610 ± 1.379^a
40 ppm	9.367 ± 3.806^a	6.480 ± 2.523^a	6.840 ± 3.062^a
80 ppm	7.530 ± 1.396^a	6.510 ± 1.619^a	6.300 ± 2.538^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 27 ปริมาณ hemoglobin ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับ และระยะเวลาที่กำหนด (g/dl)

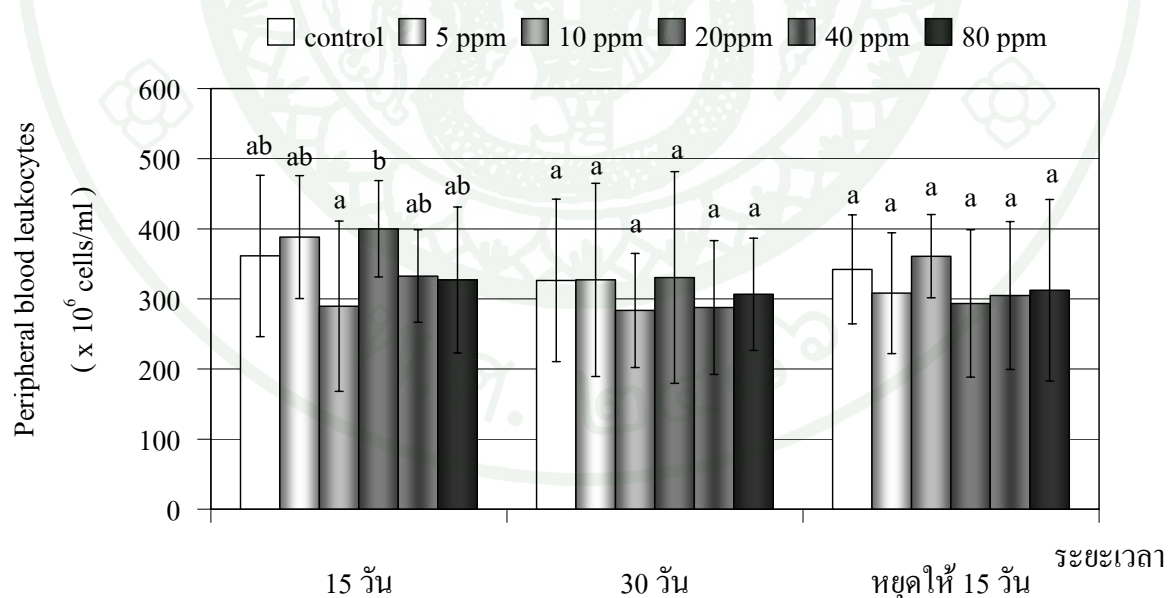
2.2.3.4 จำนวนเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด (peripheral blood leukocytes)

ในวันที่ 15 พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติระหว่างชุดทดลอง ($P < 0.05$) โดยชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 20 ppm มีค่าสูงสุดที่ $400.000 \pm 68.862 \times 10^6$ cells/ml ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 10 ppm ซึ่งมีค่าต่ำสุดที่ $289.530 \pm 121.478 \times 10^6$ cells/ml แต่ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองอื่น ๆ ($P > 0.05$) ส่วนที่ระยะเวลา 30 วัน และ 15 วันหลังจากหยุดให้อาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างชุดทดลอง ($P > 0.05$) (ตารางที่ 33 และ ภาพที่ 28)

ตารางที่ 33 จำนวน peripheral blood leukocytes ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด
ฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)

Treatment	ระยะเวลา		
	15 วัน	30 วัน	หยุดให้ 15 วัน
Control	361.333 $\pm$ 115.083 ^{ab}	326.310 $\pm$ 115.916 ^a	342.060 $\pm$ 77.831 ^a
5 ppm	388.260 $\pm$ 87.734 ^{ab}	327.210 $\pm$ 137.690 ^a	308.250 $\pm$ 86.230 ^a
10 ppm	289.530 $\pm$ 121.478 ^a	283.500 $\pm$ 81.267 ^a	360.960 $\pm$ 59.414 ^a
20 ppm	400.000 $\pm$ 68.862 ^b	330.570 $\pm$ 80.190 ^a	293.490 $\pm$ 105.080 ^a
40 ppm	332.571 $\pm$ 65.949 ^{ab}	287.790 $\pm$ 95.440 ^a	304.860 $\pm$ 105.496 ^a
80 ppm	327.090 $\pm$ 104.017 ^{ab}	306.660 $\pm$ 79.948 ^a	312.360 $\pm$ 129.437 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
($P < 0.05$)



ภาพที่ 28 จำนวน peripheral blood leukocytes ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด
ฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^6$ cells/ml)

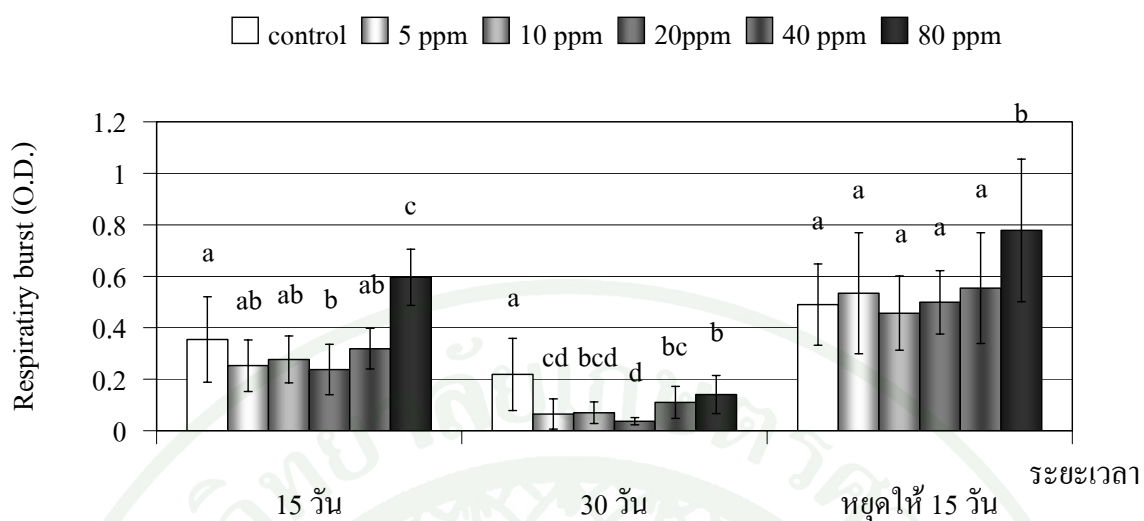
2.2.3.4 ค่า respiratory burst activity

ที่ระยะเวลา 15 วัน ปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรระดับ 80 ppm มีค่า respiratory burst activity (O.D.) เท่ากับ 0.596 ± 0.109 ซึ่งสูงกว่าปลานิลชุดควบคุม และชุดทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรระดับ 20 ppm ซึ่งมีค่า respiratory burst เท่ากับ 0.238 ± 0.098 ต่ำกว่าในชุดควบคุมและชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรระดับ 80 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับปลานิลชุดทดลองอื่น ($P < 0.05$) ส่วนที่ระยะเวลา 30 วัน ปลานิลชุดทดลองมีค่า respiratory burst ต่ำกว่าทุกชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนในระหว่างชุดทดลองพบว่าปลานิลชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 80 ppm มีค่า respiratory burst สูงกว่าชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 5 และ 20 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับปลานิลชุดทดลองอื่น ๆ ($P > 0.05$) หลังจากหยุดให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่า ปลานิลชุดที่เคยเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 80 ppm มีค่า respiratory burst เท่ากับ 0.778 ± 0.27 ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 34 และ ภาพที่ 29)

ตารางที่ 34 ค่า respiratory burst ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (O.D.)

Treatment	ระยะเวลา		
	15 วัน	30 วัน	หยุดให้ 15 วัน
Control	0.354 ± 0.166^a	0.219 ± 0.140^a	0.490 ± 0.158^a
5 ppm	0.253 ± 0.100^{ab}	0.065 ± 0.059^{cd}	0.534 ± 0.235^a
10 ppm	0.277 ± 0.091^{ab}	0.070 ± 0.042^{bcd}	0.457 ± 0.144^a
20 ppm	0.238 ± 0.098^b	0.037 ± 0.014^d	0.499 ± 0.123^a
40 ppm	0.319 ± 0.079^{ab}	0.110 ± 0.062^{bc}	0.554 ± 0.215^a
80 ppm	0.596 ± 0.109^c	0.141 ± 0.074^b	0.778 ± 0.277^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวดิ่ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 29 ค่า respiratory burst ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับ และระยะเวลาที่กำหนด (O.D.)

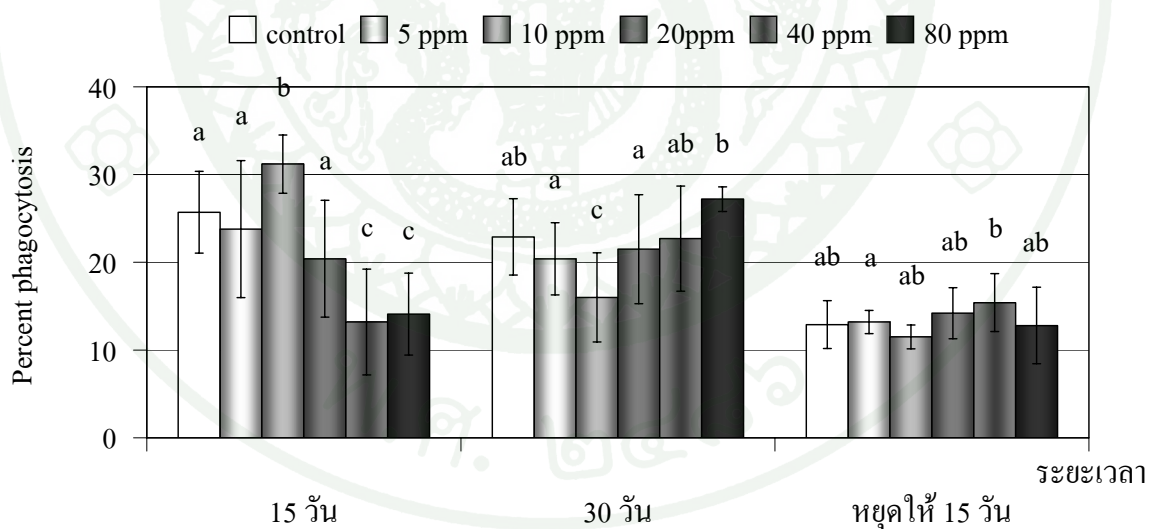
2.2.3.6 กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (phagocytic activity)

หลังจาก 15 วัน ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลอง พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติ ระหว่างชุดทดลอง โดยชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 10 ppm มีค่า percent phagocytosis สูงสุด และแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดทดลองอื่น ๆ ส่วนค่าต่ำสุด พบในชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 40 ppm ซึ่งมี percent phagocytosis เท่ากับ 13.200 ± 6.033 ซึ่งแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดควบคุม และชุดทดลองอื่น ๆ เว้นแต่ชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 80 ppm เท่านั้นที่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ส่วนที่ระยะเวลา 30 วัน พบว่าปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 10 ppm มีค่า percent phagocytosis ต่ำสุดที่ระดับ 16.000 ± 5.077 เปอร์เซ็นต์ซึ่งแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) กับทุกชุดทดลอง ส่วนปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 80 ppm มีค่า percent phagocytosis สูงกว่าในปลานิลชุดควบคุม และชุดทดลองอื่น ๆ แต่แตกต่างทางสถิติกับชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 5, 10 และ 20 ppm ($P < 0.05$) เท่านั้น และหลังจากหยุดให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน ปลานิลทุกชุดทดลองมีค่า percent phagocytosis ใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ยกเว้นชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 5 และ 40 ppm ที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 35 และ ภาพที่ 30)

ตารางที่ 35 percent phagocytosis ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด

Treatment	ระยะเวลา		
	15 วัน	30 วัน	หยุดให้ 15 วัน
Control	25.700 $\pm$ 4.668 ^a	22.900 $\pm$ 4.358 ^{ab}	12.900 $\pm$ 2.726 ^{ab}
5 ppm	23.800 $\pm$ 7.814 ^a	20.400 $\pm$ 4.115 ^a	13.200 $\pm$ 1.3166 ^a
10 ppm	31.200 $\pm$ 3.327 ^b	16.000 $\pm$ 5.077 ^c	11.500 $\pm$ 1.354 ^{ab}
20 ppm	20.400 $\pm$ 6.653 ^a	21.500 $\pm$ 6.205 ^a	14.200 $\pm$ 2.898 ^{ab}
40 ppm	13.200 $\pm$ 6.033 ^c	22.700 $\pm$ 5.982 ^{ab}	15.400 $\pm$ 3.306 ^b
80 ppm	14.100 $\pm$ 4.677 ^c	27.200 $\pm$ 1.398 ^b	12.800 $\pm$ 4.366 ^{ab}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวดิ่ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 30 percent phagocytosis ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด

การทดลองที่ 3 การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของสัตว์น้ำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร

3.1 การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของสัตว์น้ำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน

3.1.1 การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งกุลาดำ

3.1.1.1 ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้

เมื่อนำลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันระดับต่าง ๆ จนครบ 1 เดือน มาศึกษาปริมาณ *Vibrio* spp. พบว่า ปริมาณ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำชุดควบคุมมีปริมาณสูงสุดที่ $6.000 \pm 2.078 \times 10^7$ CFU/g ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากทุกชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับต่าง ๆ กัน (ตารางที่ 36 และ ภาพที่ 31)

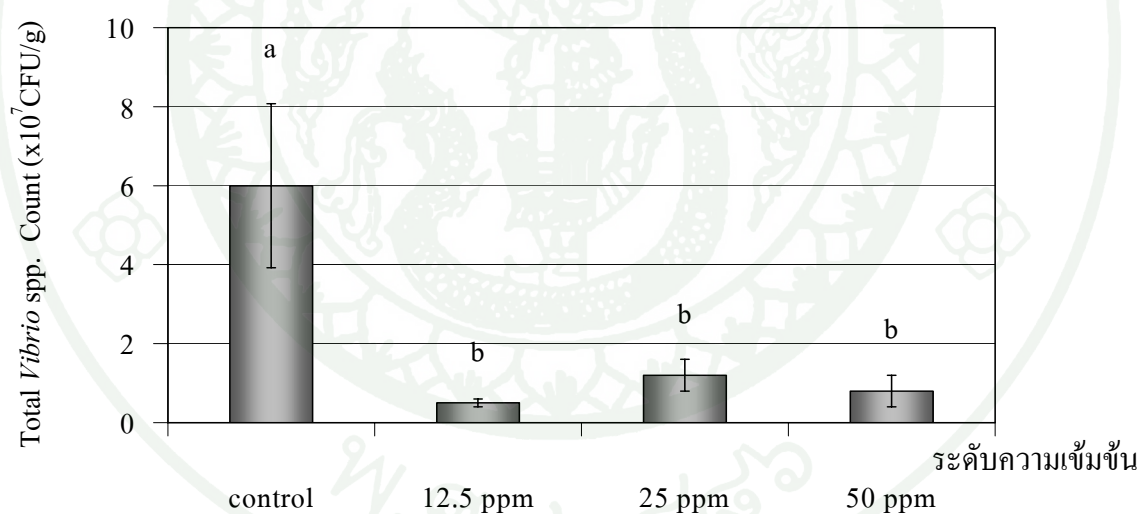
3.1.1.2 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้

เมื่อนำลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันระดับต่าง ๆ จนครบ 1 เดือน มาศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ พบว่า ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมีปริมาณสูงสุดที่ $99.600 \pm 10.253 \times 10^7$ CFU/g ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากทุกชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน และพบว่าชุดทดลองที่ 50 ppm มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดน้อยที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 12.5 ppm (ตารางที่ 36 และ ภาพที่ 32)

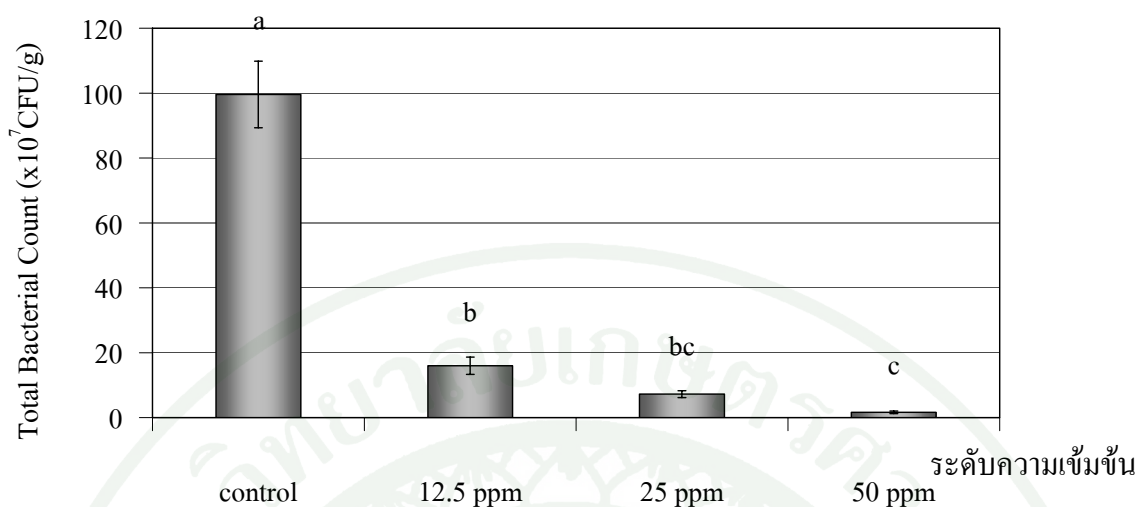
ตารางที่ 36 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน ($\times 10^7$ CFU/g)

Treatment	Total Count	
	<i>Vibrio</i> spp.	Bacteria
Control	6.000 ± 2.078^a	99.600 ± 10.253^a
12.5 ppm	0.500 ± 0.100^b	16.000 ± 2.646^b
25 ppm	1.200 ± 0.400^b	7.200 ± 1.058^{bc}
50 ppm	0.800 ± 0.400^b	1.600 ± 0.400^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 31 ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน ($\times 10^7$ CFU/g)



ภาพที่ 32 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน (x10⁷CFU/g)

3.1.2 การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งขาว

3.1.2.1 ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้

หลังจากเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับต่าง ๆ จนครบ 1 เดือน นำลำไส้มาบดเพื่อศึกษาปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ พบว่าชุดควบคุม มี $10.667 \pm 2.646 \times 10^9$ CFU/g ซึ่งสูงกว่าทุกชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับต่าง ๆ กัน (ตารางที่ 37 และ ภาพที่ 33)

3.1.2.2 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้

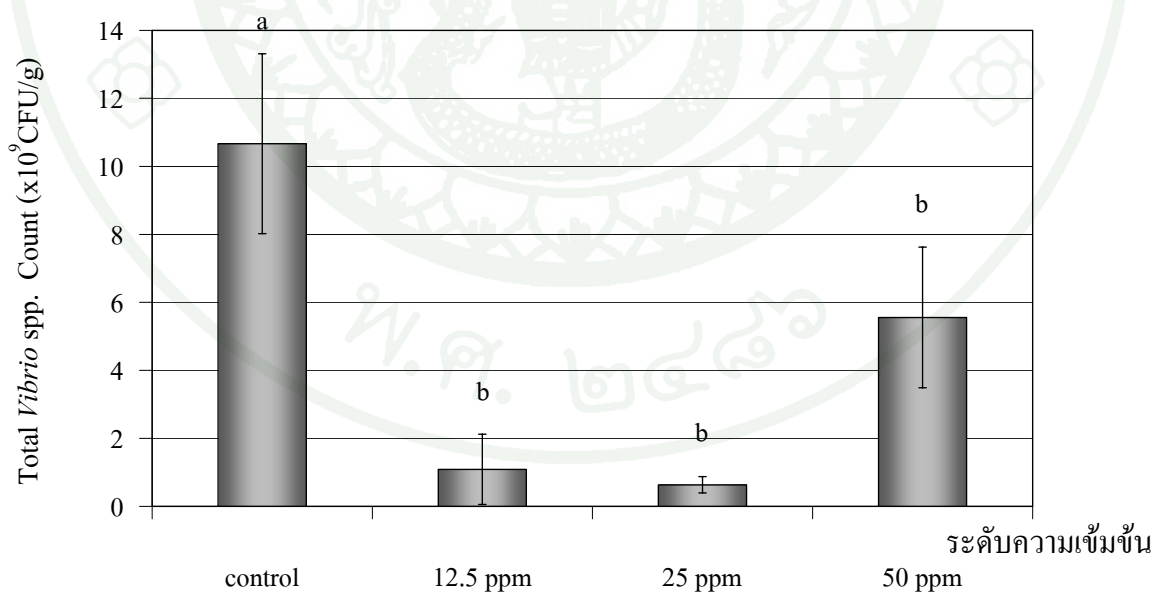
เมื่อนำลำไส้กุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันระดับต่าง ๆ จนครบ 1 เดือน มาศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งขาวชุดควบคุมมีปริมาณ $1911.000 \pm 1756.590 \times 10^9$ CFU/g ซึ่งสูงกว่าชุดทดลองที่เลี้ยงด้วย

อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างทุกชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด (ตารางที่ 37 และ ภาพที่ 34)

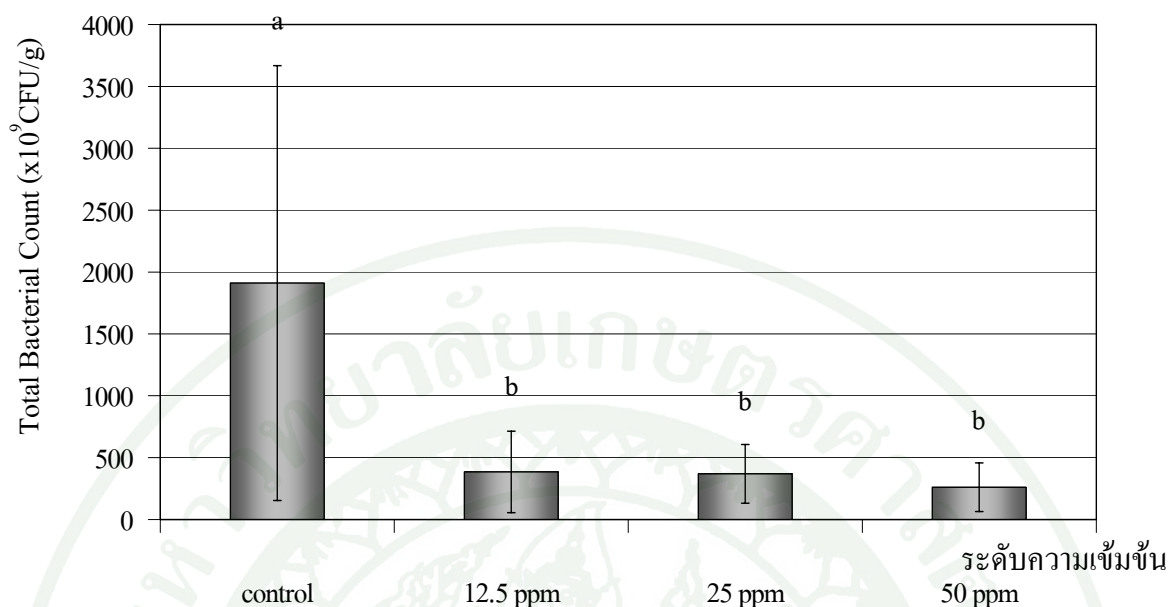
ตารางที่ 37 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน ($\times 10^9$ CFU/g)

Treatment	Total Count	
	<i>Vibrio</i> spp.	Bacteria
Control	10.667 ± 2.646^a	1911.000 ± 1756.590^a
12.5 ppm	1.089 ± 1.035^b	387.333 ± 329.265^b
25 ppm	0.633 ± 0.240^b	369.156 ± 237.974^b
50 ppm	5.556 ± 2.068^b	261.156 ± 196.429^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 33 ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน ($\times 10^9$ CFU/g)



ภาพที่ 34 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน (x10⁹CFU/g)

3.1.3 การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของปลานิล

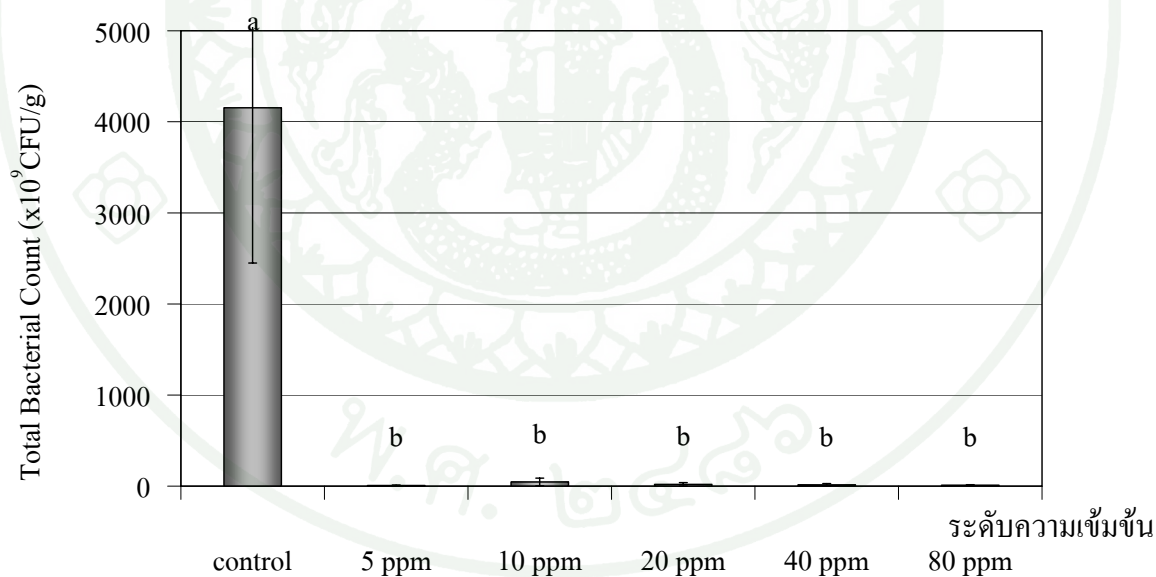
3.1.3.1 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้

เมื่อนำลำไส้ปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันระดับต่าง ๆ จนครบ 1 เดือน มาศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ของปลานิลชุดควบคุมมีปริมาณ $4154.3333 \pm 1706.3901 \times 10^9 \text{ CFU/g}$ ซึ่งสูงกว่าทุกชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างทุกชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด (ดังตารางที่ 38 และ ภาพที่ 35)

ตารางที่ 38 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน
($\times 10^9$ CFU/g)

Treatment	Total Bacteria Count
Control	4154.333 ± 1706.390^a
5 ppm	5.893 ± 5.700^b
10 ppm	46.627 ± 42.029^b
20 ppm	19.303 ± 18.554^b
40 ppm	15.007 ± 12.862^b
80 ppm	10.197 ± 5.552^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
($P < 0.05$)



ภาพที่ 35 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน
($\times 10^9$ CFU/g)

3.2 การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของสัตว์น้ำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร

3.2.1 การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งกุลาดำ

3.2.1.1 ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้

เมื่อนำลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรระดับต่างๆ จนครบ 1 เดือน แล้วนำมาศึกษาปริมาณ *Vibrio* spp. ในลำไส้ พบว่า ชุดควบคุมมีปริมาณสูงสุดที่ $605.000 \pm 14.552 \times 10^7$ CFU/g ซึ่งแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) จากทุกชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30 และ 250 ppm มีปริมาณ *Vibrio* spp. ในระดับต่ำที่ $47.000 \pm 2.646 \times 10^7$ และ $36.000 \pm 0.872 \times 10^7$ CFU/g ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จากชุดทดลองอื่นๆ (ตารางที่ 39 และ ภาพที่ 36)

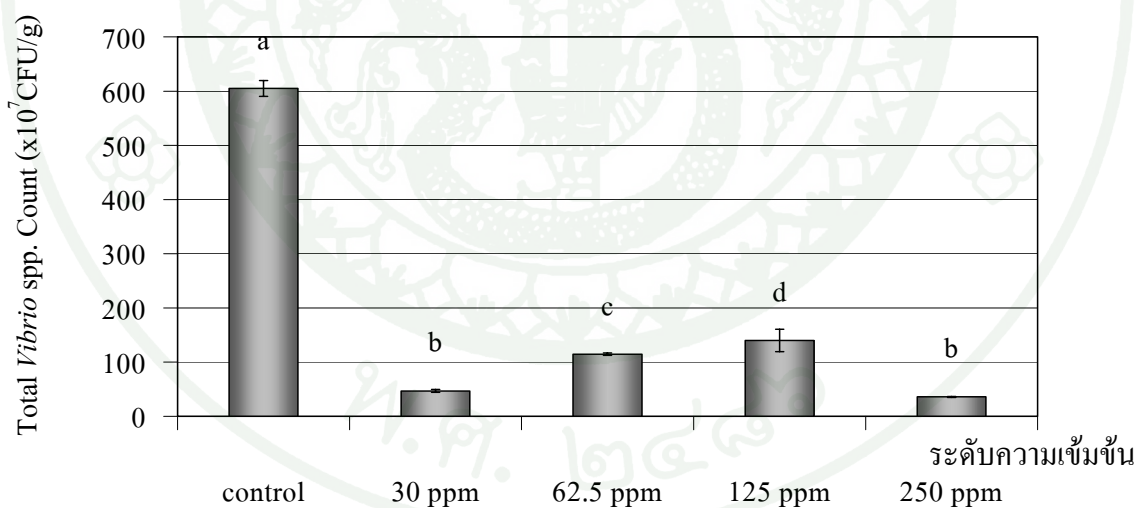
3.2.1.2 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้

นำลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรระดับต่างๆ จนครบ 1 เดือน มาศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ พบว่า ชุดควบคุมมีปริมาณสูงสุดที่ $573.760 \pm 24.219 \times 10^7$ CFU/g ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้กุ้งชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 250 ppm มีปริมาณต่ำที่สุด คือ $19.473 \pm 1.194 \times 10^7$ CFU/g ซึ่งแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกุ้งทุกชุดทดลอง (ตารางที่ 39 และ ภาพที่ 37)

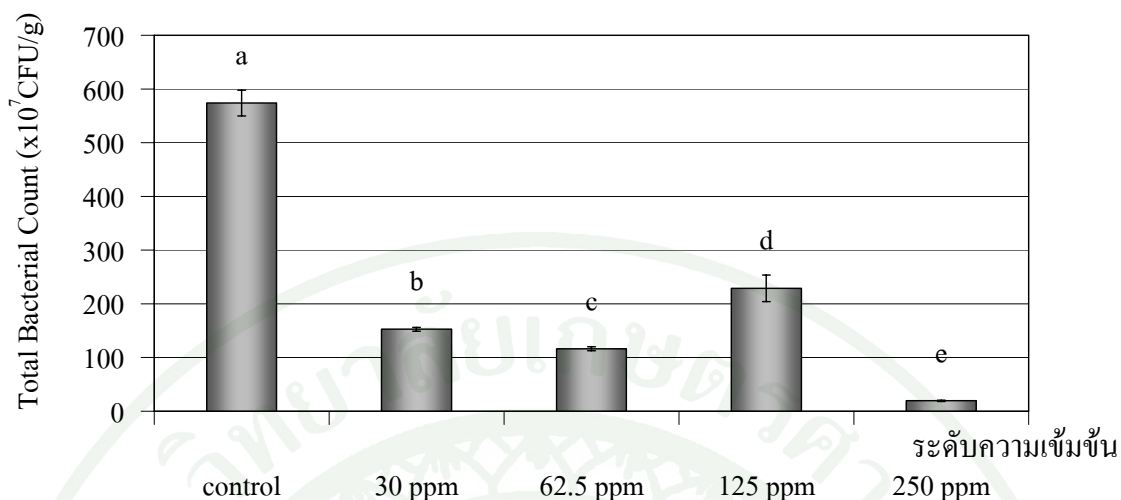
ตารางที่ 39 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร ($\times 10^7$ CFU/g)

Treatment	Total Count	
	<i>Vibrio</i> spp.	Bacteria
Control	605.000 $\pm$ 14.552 ^a	573.760 $\pm$ 24.219 ^a
30 ppm	47.000 $\pm$ 2.646 ^d	152.700 $\pm$ 3.559 ^b
62.5 ppm	114.800 $\pm$ 2.100 ^c	116.410 $\pm$ 3.782 ^c
125 ppm	140.000 $\pm$ 20.718 ^b	228.800 $\pm$ 24.830 ^d
250 ppm	36.000 $\pm$ 0.872 ^d	19.473 $\pm$ 1.194 ^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 36 ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร ($\times 10^7$ CFU/g)



ภาพที่ 37 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร (x10⁷CFU/g)

3.2.2 การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งขาว

3.2.2.1 ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้

เมื่อนำลำไส้กุ้งขาวมาบดเพื่อการศึกษาปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุมและระหว่างชุดทดลอง ($P > 0.05$) โดยอยู่ในช่วง $2.858 \pm 2.425 \times 10^9$ - $4.582 \pm 2.782 \times 10^9$ CFU/g (ตารางที่ 40 และ ภาพที่ 38)

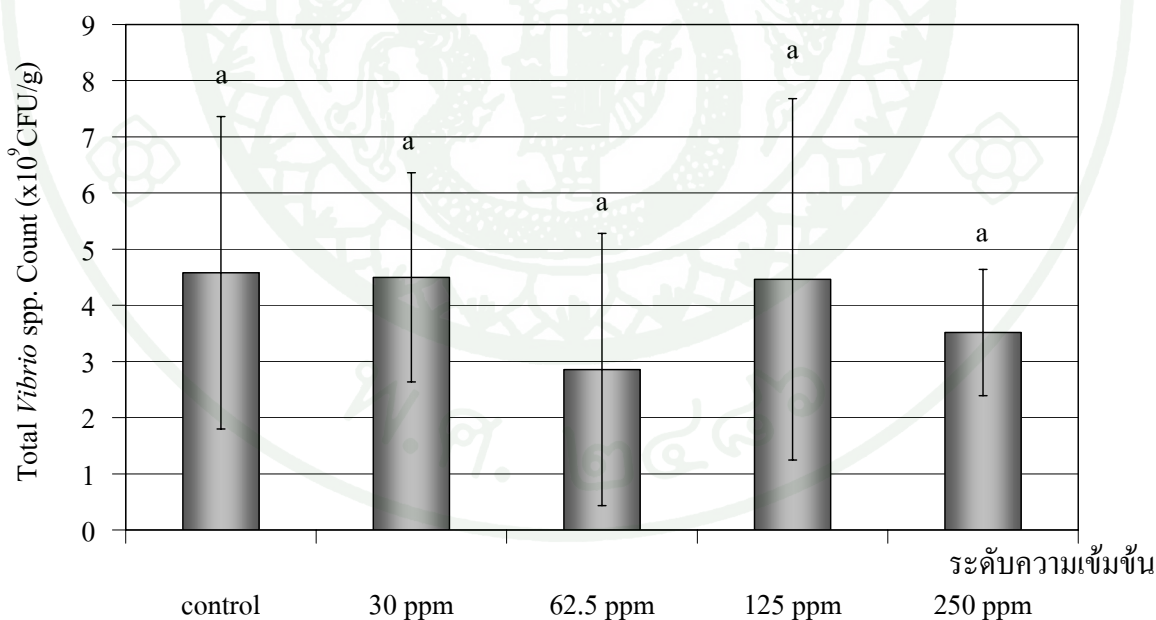
3.2.2.2 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้

เมื่อนำลำไส้กุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรระดับต่าง ๆ จนครบ 1 เดือน มาศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งชุดควบคุมมีปริมาณ $14385.000 \pm 4708.113 \times 10^9$ CFU/g ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) จากกุ้งชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30, 62.5 และ 125 ppm แต่ในกุ้งชุดที่รับอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 250 ppm นั้นมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ $22272.000 \pm 11146.203 \times 10^9$ CFU/g ซึ่งสูงกว่าชุดทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 40 และ ภาพที่ 39)

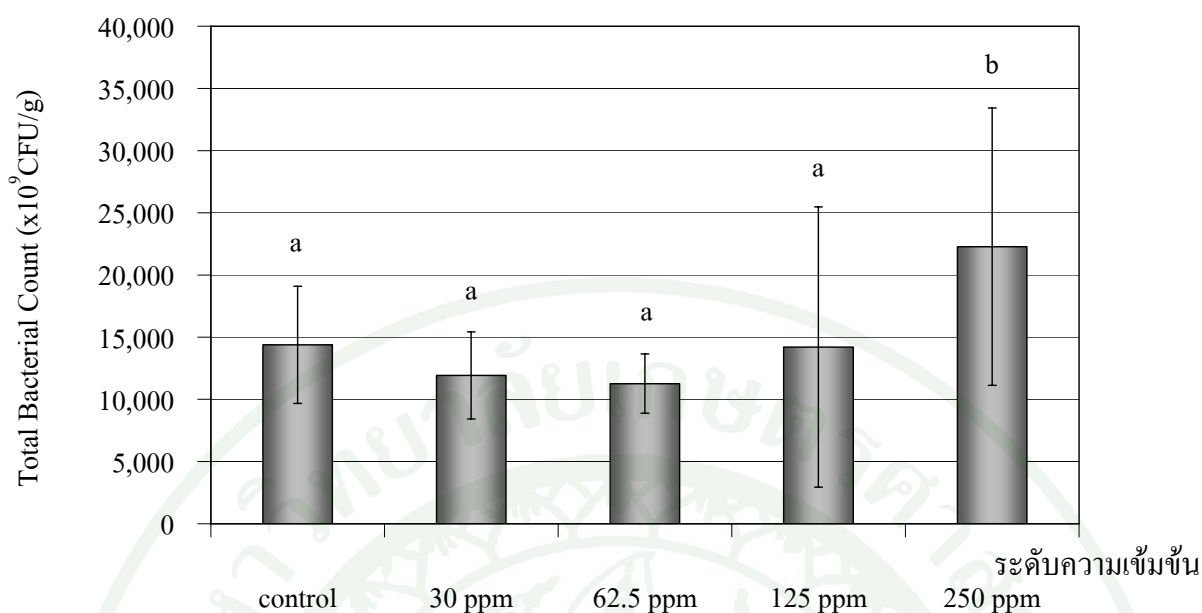
ตารางที่ 40 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร ($\times 10^9$ CFU/g)

Treatment	Total Count	
	<i>Vibrio</i> spp.	Bacteria
Control	4.582 ± 2.782^a	14385.000 ± 4708.113^a
30 ppm	4.498 ± 1.862^a	11925.333 ± 3495.340^a
62.5 ppm	2.858 ± 2.425^a	11264.000 ± 2378.898^a
125 ppm	4.463 ± 3.217^a	$14208.000 \pm 11260.492^a$
250 ppm	3.517 ± 1.124^a	$22272.000 \pm 11146.203^b$

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวนอง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 38 ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร ($\times 10^9$ CFU/g)



ภาพที่ 39 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร (x10⁹ CFU/g)

3.2.3 การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของปลานิล

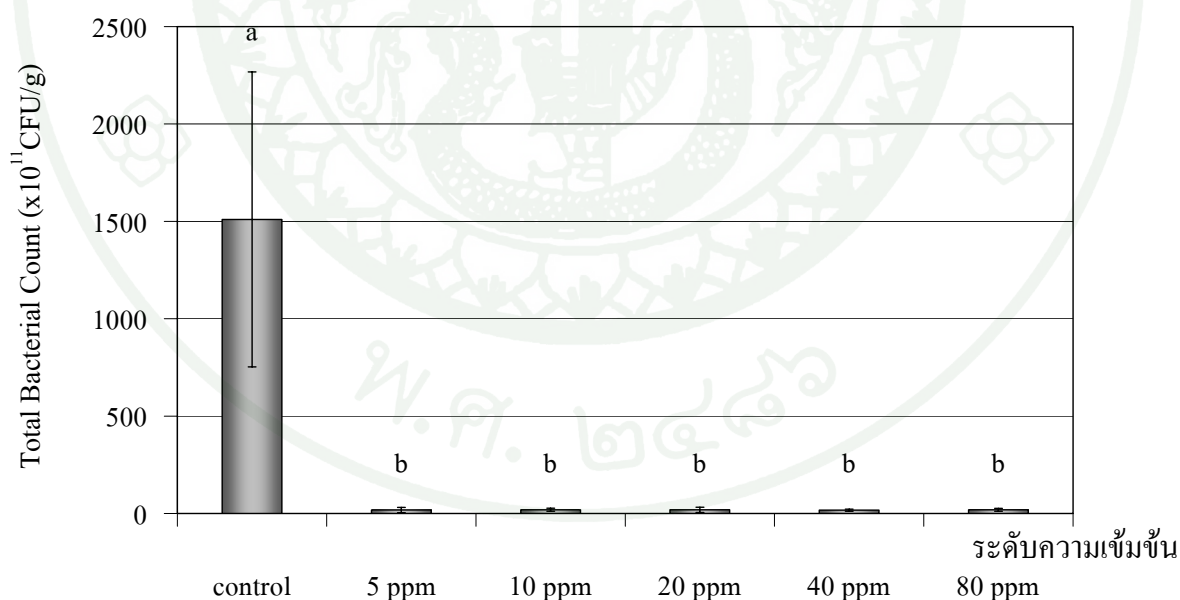
3.2.3.1 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้

ปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรระดับต่างๆ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ของปลานิลชุดควบคุมมีปริมาณ $1509.903 \pm 756.882 \times 10^{11}$ CFU/g ซึ่งสูงกว่าทุกชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยสารสกัดฟ้าทะลายโจร ($P > 0.05$) (ตารางที่ 41 และ ภาพที่ 40)

ตารางที่ 41 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร ($\times 10^{11}$ CFU/g)

Treatment	Total Bacteria Count
Control	1509.903 ± 756.883^a
5 ppm	18.024 ± 13.580^b
10 ppm	19.072 ± 7.750^b
20 ppm	18.754 ± 13.775^b
40 ppm	17.272 ± 5.553^b
80 ppm	19.006 ± 7.329^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวดิ่ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 40 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร ($\times 10^{11}$ CFU/g)

วิจารณ์

การทดลองที่ 1 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสัตว์น้ำ

1.1 การศึกษาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Streptococcus agalactiae* (in vitro) ของสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร

การศึกษาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดขมิ้นชันที่มีสารสำคัญ curcuminoids รวม 25.725 % w/w และฟ้าทะลายโจรที่มีสารสำคัญ total lactone รวม 10.654 % w/w สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) ของเชื้อ *V. harveyi* และ *S. agalactiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB โดยใช้อัตราส่วนของสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่มีความเข้มข้น 5×10^5 CFU/ml ต่อสารละลายสารสกัดขมิ้นชัน และฟ้าทะลายโจรเป็น 1:1 ส่วน ซึ่งแต่ละระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบนั้น จะทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเนื่องจากสารสกัดทั้งขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรในหลอดทดลองมีความขุ่นสูงส่งผลให้มีความคลาดเคลื่อนของการอ่านผลการทดลอง เพราะต้องสังเกตจากความใสของสารละลายในหลอดทดลอง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงกำหนดให้มีหลอดควบคุมผลบวก และผลลบแต่ละระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองเพื่อยืนยันผลตลอดการทดลอง หลังจากเขย่าสารละลายผสมกันแล้ว นำหลอดทดลองไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดลองพบว่า สารสกัดขมิ้นชัน และฟ้าทะลายโจรลักษณะ crude extract มีค่า MIC ต่อเชื้อ *V. harveyi* ที่ 512 และ 2,560 ppm ตามลำดับ และ มีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. agalactiae* ที่ 853.33 และ 853.33 ppm ตามลำดับ

เมื่อได้ค่า MIC แล้วทำการดูการตายของเชื้อจากหลอดความเข้มข้นสูงสุดที่ขุ่นและหลอดใสทุกหลอดปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร TCBS และ TSA ที่ผสม 1.5 % NaCl ทำการ spread plate แล้วนำเข้าตู้บ่มเชื้อเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรที่สามารถฆ่าเชื้อ *V. harveyi* และ *S. agalactiae* ตามลำดับ (MBC) พบว่า ต้องใช้สารสกัดขมิ้นชัน และฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 2,275.55 และ 2,560 ppm ตามลำดับสามารถฆ่า *V. harveyi* ได้โดยไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหาร TCBS ส่วนการฆ่า *S. agalactiae* นั้น พบว่า สารสกัดขมิ้นชัน และฟ้าทะลายโจรลักษณะ crude extract ที่ระดับสูงกว่า

4,452,17 ppm จึงจะสามารถฆ่าเชื้อ *S. agalactiae* ได้โดยไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหาร TSA

จากค่า MIC และ MBC ที่ได้ในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อ และฆ่าเชื้อ *V. harveyi* และ *S. agalactiae* ได้ที่ความเข้มข้นสูง และพบว่าสารสกัดขมิ้นชันออกฤทธิ์ต่อ *V. harveyi* ได้ดีกว่าฟ้าทะลายโจร เนื่องจากว่าแม้ใช้ใน ปริมาณน้อยกว่าแต่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และฆ่าเชื้อได้เทียบเท่ากับสารสกัดฟ้าทะลายโจร สอดคล้องกับการศึกษาของ มะลิ และคณะ (2547) ที่รายงานว่า สารสกัดขมิ้นชันที่มีสาร curcuminoid 21.57 % w/w และฟ้าทะลายโจรที่มีสาร total lactone 30.49 % w/w เข้มข้น 250 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Vibrio* spp. 15 ไอโซเลทใน อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton (MH) ซึ่งขมิ้นชันมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ได้ดีกว่าฟ้าทะลายโจร พร้อมกันนั้นยังมีการศึกษาของ กิจการ และคณะ (2548) ที่ทดสอบ ประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชัน และฟ้าทะลายโจรต่อเชื้อก่อโรคกุ้ง (*Vibrio* spp.) ในหลอด ทดลอง (*in vitro*) พบว่า สารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 250 – 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ยับยั้งการเจริญเติบโต ของเชื้อได้ 100% ส่วนฟ้าทะลายโจรที่ 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อได้ 40 และ 90 % ตามลำดับได้เช่นกัน

ในส่วนขมิ้นชันนอกจากการออกฤทธิ์ของสารสำคัญแล้วยังมีรายงานว่า น้ำมันหอม ระเหยของขมิ้นชันมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Lutomoski *et al.*, 1979; Bhvanishker and Murthy, 1986) วณิดา (2542) ทำการศึกษาฤทธิ์ด้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหย และสาร curcuminoids จาก ขมิ้นชัน พบว่า สามารถให้ผลยับยั้งเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ได้ดี และในน้ำมันหอมระเหยจาก ขมิ้นชันสามารถยับยั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และราได้ จากผลงานวิจัยต่าง ๆ สอดคล้องกับผลการ ทดลองครั้งนี้ที่ใช้รูปแบบสารสกัดขมิ้นชันลักษณะ crude extract ซึ่งน่าจะเป็นรูปแบบการใช้ที่ดี เนื่องจากยังคงมีทั้งส่วน curcuminoids และน้ำมันหอมระเหย โดยส่วนประกอบดังกล่าวน่าจะเป็น ส่วนสำคัญในการในการออกฤทธิ์ต่อเชื้อที่ใช้ทดลอง ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อ แบคทีเรียนั้น Bhavani and Murthy (1979) รายงานว่า สารสกัดแอลกอฮอล์ของขมิ้นชันและน้ำมัน หอมระเหยก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ *Streptococci* spp., *Lactobacillus* และ *Staphylococcus* และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ (Von *et al.*, 1974 ; Shankar and Murthy , 1978) ส่วน curcumin และ อนุพันธ์ต่าง ๆ ในขมิ้นชันมีฤทธิ์ไปขัดขวางกระบวนการ ผลิตเอนไซม์ β -lactamase ของจุลินทรีย์ (Kumar *et al.*, 2001) ที่ผลิตขึ้นเพื่อต่อต้านยาปฏิชีวนะกลุ่ม

β -lactam ซึ่งจะทำให้ยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น (Hauser, 2007) นอกจากนี้ curcumin ที่มีในขมิ้นชัน มีโครงสร้างเป็น diene ketone จำนวนมากทำให้ตัวสารมีคุณสมบัติเป็น lipophylicity สูงขึ้น สามารถแทรกซึมเข้าสู่เซลล์ได้ง่าย (Arauja and Leon, 2001) และในโมเลกุลยังมี phenol และ hydroxyl group ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อราได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากสามารถแทรกตัวเข้าไปในส่วนของไขมันที่อยู่ในผนังหุ้มเซลล์ชั้นใน ทำให้เชื้อสูญเสีย permeability ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของส่วนประกอบภายในเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว และสามารถทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอนได้ (รุ่งทิพย์, 2552) ซึ่งกลไกต่าง ๆ ที่กล่าวมาน่าจะเป็นส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้ง และฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคนิสต์ตัวน้ำได้โดยตรง

ส่วนสารสกัดฟ้าทะลายโจรนั้นจากผลการทดลองนี้แม้จะสามารถควบคุมและฆ่าเชื้อทดลองได้ แต่ต้องใช้ในปริมาณสูง ซึ่งวิษณุ และ สุรภี (2533) รายงานว่าสารบริสุทธิ์ neo-andrographolide ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* เลย และสารบริสุทธิ์ andrographolide และ dehydroandrographolide ขนาด 20-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อดังกล่าวแต่น้อยมาก แต่ ธีคาร์ตัน (2534) ทดสอบฤทธิ์ต้านทานเชื้อแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* 01 และ *Shigella dysenteriae* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงด้วยวิธี Agar dilution พบว่า สามารถควบคุมเชื้อดังกล่าวได้ผลดี และยังพบว่าฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 85 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก สอดคล้องกับรูปแบบสารสกัดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เนื่องจากใช้แอลกอฮอล์เป็นสารสกัดเช่นกัน นอกจากนี้ นวลตา และคณะ (2538) ได้ศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของสารสกัดประเภท Lactone 4 ชนิด ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Laddan ประกอบด้วย andrographolide, 14-deoxygendrographolide, 14-deoxy-11, 12-didehydrographolide และ neo andrographolide พบว่าสามารถฆ่า *Streptococcus* Gr. A, *Streptococcus* Gr. B และ *Staphylococcus aureus* ได้ จากข้อมูลดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าฟ้าทะลายโจรมีผลดีต่อเชื้อบางชนิดเท่านั้น ซึ่งแตกต่างจากขมิ้นชันที่ออกฤทธิ์ในวงกว้างกว่าต่อเชื้อแบคทีเรีย (Wang *et al.*, 2009) ซึ่งจะเห็นได้จากผลการทดลองนี้ว่าต้องใช้สารสกัดฟ้าทะลายโจรที่สูงกว่ามากจึงจะมีผลต่อเชื้อแบคทีเรีย สำหรับในส่วนกลไกการทำงานของฟ้าทะลายโจรต่อเชื้อแบคทีเรียนั้นมีการศึกษาไม่มากนัก Limsong *et al.* (2004) พบว่าสารสกัดฟ้าทะลายโจรออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ด้วยการลดกิจกรรมของ glycosyltransferase และ glucan-binding lactin ของเชื้อซึ่งเป็นกิจกรรมที่ทำให้เชื้อสามารถเกาะติดเซลล์ได้มากขึ้น

อย่างไรก็ตามผลการศึกษารังนี้พบว่าค่า MIC และ MBC ของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อเชื้อ *V. harveyi* และ *S. agalactiae* มีค่าสูงซึ่งไม่เหมาะสมในการนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อโดยการละลายน้ำ เพราะจะสิ้นเปลือง และอาจมีผลข้างเคียงกับสัตว์น้ำได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของยาปฏิชีวนะที่แนะนำให้ใช้ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียทั่วไปหลายชนิด เช่น oxytetracyclin, trimetoprim, erythromycin และ sulfadiazine ตามค่ามาตรฐานของ National Committee for Clinical Standard (2000) มีค่า MIC เพียง 4, 2, 0.5 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรเท่านั้นซึ่งน้อยกว่าสมุนไพรที่ใช้ทดสอบอย่างมาก

1.2 การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Streptococcus agalactiae* ของสัตว์น้ำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร

เมื่อนำค่า MIC และ MBC ของสารสกัดขมิ้นชัน และ ฟ้าทะลายโจรต่อเชื้อ *V. harveyi* และ *S. agalactiae* ที่ได้มากำหนดระดับความเข้มข้นของสารสกัดเพื่อนำมาผสมอาหาร เมื่อทดลองให้อาหารที่ระดับดังกล่าว พบว่าสัตว์น้ำไม่สามารถกินอาหารได้ อาจเนื่องมาจากสารสกัดที่ใช้ผสมในอาหารมีความเข้มข้นสูงเกินไปทำให้อาหารมีรสชาติเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการปรับลดความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการผสมอาหารลง 10 เท่า เพื่อให้เหมาะสมสำหรับการใช้ในการทดลอง โดยแบ่งชุดทดลองออกตามที่กำหนดและใช้ระดับความเข้มข้นเดียวกันในทุกการทดลองที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง ซึ่งจากงานวิจัยของ มะลิ และคณะ (2547) ที่ทำการศึกษาการใช้สมุนไพรในกุ้งกุลาดำ รายงานว่า การใช้ระดับความเข้มข้นของสมุนไพรที่มีค่าสูงจะส่งผลให้กุ้งมีความต้องการอาหารลดลง ส่งผลให้การเจริญเติบโต และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันลดลง

ในการศึกษาความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ของสัตว์น้ำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันนั้น ได้ทำการศึกษาในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาว เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค Vibriosis ในกุ้ง โดยแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ chitinase มาย่อยไคตินที่เป็นส่วนประกอบของเปลือกกุ้ง ทำให้เชื้อโรคเข้าสู่กระแสเลือดและแพร่กระจายไปทั่วร่างกายทำให้กุ้งตายในที่สุด (Lightner, 1988) จากการทดลองนี้ พบว่า กุ้งกุลาดำและกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ และทดสอบความคุ้มโรคด้วยการฉีด มีอัตราการตายต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ 25 ppm มีอัตราการตายต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สอดคล้องกับ กิจการ และคณะ (2548) ที่ทดลองให้กุ้งกุลาดำกินอาหารที่มีสารสกัดขมิ้นชันนาน 7

และ 14 วัน พบว่า กุ้งชดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด 5 และ 25 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม มีความสามารถในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียโดยมีอัตราการรอดตายและความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) สูงกว่าชุดอื่น ๆ นอกจากนี้ เติ้มดวง และ สุริยัน (มปป.) ทดลองให้ลูกกุ้งกลาดำกินอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันเป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และ เชื้อตัวแดงดวงขาว โดยการหาค่า LC_{50} ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า อัตราการรอดของลูกกุ้งกลาดำที่กินอาหารสำเร็จรูปผสมขมิ้นชัน มีอัตราการรอดสูงกว่าลูกกุ้งที่ไม่ได้กินอาหารผสมขมิ้นชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ส่วนการศึกษความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ของสัตว์น้ำได้ทำการศึกษาในปลานิลนั้น เนื่องจากโรคแบคทีเรียชนิดนี้ก่อความเสียหายกับปลานิลในประเทศไทยอย่างมาก (นเรศ และคณะ, 2548) โดยหลังจากปลานิลกินอาหารผสมขมิ้นชันเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์และทดสอบความคุ้มโรคด้วยการฉีด พบว่า ปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมขมิ้นชันที่ระดับ 20 ppm ขึ้นไปมีอัตราการตายต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สอดคล้องกับคุณสมบัติของขมิ้นชันที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียอันเป็นสาเหตุของโรคได้หลายชนิด (กิตติมา, 2548)

โดยผลที่ได้จากการศึกษความต้านทานครั้งนี้จะเกิดจากสารสกัดขมิ้นชันไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันบางอย่างในตัวสัตว์น้ำได้ Antony *et al.* (1999) พบว่า curcumin สามารถกระตุ้นการทำงานของ macrophage และเพิ่ม antibody titer ให้ตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมได้ดีขึ้น ดังนั้นหลังจากฉีดเชื้อแบคทีเรียเข้าไปแล้วภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ที่ถูกกระตุ้นจากการได้รับขมิ้นชัน น่าจะเข้ามามีบทบาทในการต้านทานสิ่งแปลกปลอมด้วย นอกจากนี้สารสกัดขมิ้นชันที่สัตว์น้ำได้รับน่าจะ สามารถมีปฏิกิริยาควบคุมเชื้อได้โดยตรง เนื่องจากการทำงานของ phenolic group ที่อยู่ในโมเลกุลสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้โดยตรง และโดยทั่วไปเมื่อสัตว์มีการติดเชื้อร่างกายจะเกิดสภาวะเครียด และมีการตอบสนองของ inflammatory cytokines ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเพื่อช่วยลดการเกิด tissue injury ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระหลายชนิดทั้ง reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) เป็นสาเหตุให้เกิด DNA damage ในเซลล์สัตว์ (Gupta and Balasubrahmanyam, 1998; Pinlaor *et al.*, 2004) โดย Wright (2002) พบว่าโครงสร้างโมเลกุล phenolic OH group และ methylene CH_2 group ที่ติดอยู่กับ β - diketone moiety ใน curcuminoid ของขมิ้นชันสามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมหรืออิเล็กตรอนซึ่งจะช่วยลดการเกิดอนุมูลอิสระที่มากเกินไปที่เกิดขณะติดเชื้อได้ นอกจากนี้ขมิ้นชันสามารถยับยั้งการหลั่งของ arachidonic acid ช่วยลดการบวมของเซลล์ที่ติดเชื้อได้ และ curcumin สามารถควบคุม interleukin (IL-2) รวมถึงควบคุมการ

ทำงานของ nuclear transcription factor-kappa B (NF- κ B) ซึ่งมีผลยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) (บุศรา และคณะ, 2550) ทำให้การสร้างอนุมูลอิสระลดลง นอกจากนี้ยังช่วยควบคุม interleukin (IL-12) และ tumor necrosis factor alpha (TNF- α) ซึ่งเป็น pro-inflammatory ที่มีส่วนสำคัญในการก่อให้เกิด granuloma formation ภายในเซลล์ได้ (Allam, 2009) ดังนั้นสารสกัดในขมิ้นชันน่าจะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อโรคในร่างกาย ทำให้สัตว์ทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันสามารถต้านทานแบคทีเรียก่อโรคได้ดีขึ้น โดยสารสกัดขมิ้นชันมีฤทธิ์ต่อเชื้อโดยตรงทำให้สัตว์น้ำชุดทดลองมีอัตราการตายที่ต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังช่วยลดอนุมูลอิสระและ tissue injury ที่เป็นผลจากการติดเชื้อด้วย

ส่วนกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับต่าง ๆ ตามกำหนดเป็นเวลา 2 สัปดาห์และทดสอบความคุ้มโรคด้วยการฉีด พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรส่วนมากจะส่งผลให้กุ้งมีอัตราการตายลดลงหลังจากได้รับเชื้อ *V. harveyi* ด้วยการฉีด โดยกุ้งทั้ง 2 ชนิดที่ได้รับอาหารผสมฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30 ppm มีอัตราการตายต่ำกว่าชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งให้ผลแตกต่างจากการทดลองของ กิจการ และคณะ (2548) ที่พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม นาน 14 วัน มีความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียมากกว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่นเล็กน้อย ในขณะที่การผสมฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทำให้กุ้งมีความต้านทานต่อเชื้อ WSSV ได้ดีขึ้น ส่วนการศึกษาในปลานิล พบว่า หลังจากปลานิลได้รับอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรตามกำหนดเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ปลานิลชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรมีอัตราการตายไม่ต่างจากชุดควบคุม ($P > 0.05$)

มีรายงานจาก Kumar *et al.* (2004) ว่าฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ต่อ specific และ non specific immune system โดยสามารถกระตุ้นการทำงานของ B-cells และ monocyte ในไก่ได้ (อิริชญา, 2548) พร้อมกันนั้นยังมีรายงานว่าฟ้าทะลายโจรสามารถเพิ่ม phagocytic activity และ macrophage migration index ในหนูได้ (Puri *et al.*, 1993) นอกจากนี้ฟ้าทะลายโจรสามารถถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือดได้สมบูรณ์แต่เข้าสู่เซลล์ได้ในปริมาณจำกัด เนื่องจากเกิดการจับกับโปรตีนในพลาสมาขณะเข้าไปในร่างกาย (Panossian *et al.*, 2000) โดยส่วนที่เหลือจากการจับน่าจะเข้าทำปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรียได้โดยตรง นอกจากนี้ Liu *et al.* (2008) รายงานว่า andrograpanin ในสารสกัดฟ้าทะลายโจรสามารถควบคุมการเกิด nitric oxide (NO) ที่มากเกินไป โดยไปยับยั้งระดับ iNOS mRNA transcription และ protein expression ช่วยลดการเกิดอนุมูลอิสระที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียได้

และสามารถควบคุม TNF- α , IL-6 และการสร้าง IL-12 p70 ที่มากเกินไปช่วยลดการเกิด inflammatory disease, septic shock และ autoimmune disease ได้ โดยไปรบกวน protein kinase (MAPKs) signal pathways ที่เป็นสื่อในการกระตุ้น cytokines เหล่านี้ ซึ่งกลไกเหล่านี้ของฟาทะลายโอรนอกจากจะเป็นส่วนช่วยให้ร่างกายสามารถต้านทานสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาได้แล้ว ยังช่วยลดความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากสิ่งแปลกปลอมและปัจจัยแวดล้อมด้วย

การทดลองที่ 2 การศึกษาการใช้สารสกัดขมิ้นชันและฟาทะลายโอรเพื่อเสริมสุขภาพในสัตว์น้ำ

การศึกษาการใช้สารสกัดขมิ้นชันและฟาทะลายโอรเพื่อเสริมสุขภาพในสัตว์น้ำ โดยศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้สมุนไพรทั้ง 2 ชนิด เพื่อเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ โดยในกึ่งกุลาดำและกึ่งขาวประเมินองค์ประกอบของภูมิคุ้มกัน ได้แก่ total haemocytes count, phenoloxidase activity, phagocytic activity และ bactericidal activity ส่วนปลาไนประเมินองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกัน ได้แก่ red blood cells, hematocrit, hemoglobin, peripheral blood leukocytes, respiratory burst และ phagocytic activity พบว่า เมื่อเลี้ยงกึ่งกุลาดำและกึ่งขาวด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน ส่วนมากมีแนวโน้มให้ค่าทางภูมิคุ้มกันดีกว่าชุดควบคุม แต่เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติแล้วมีเพียง phenoloxidase activity และ bactericidal activity ของทั้งกึ่งกุลาดำและกึ่งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ 25 และ 50 ppm เท่านั้นที่แสดงความแตกต่างกับชุดควบคุมเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 30 วัน ($P < 0.05$) และเมื่อหยุดให้อาหารทดลองพบว่า กึ่งกุลาดำและกึ่งขาวที่เลี้ยงอาหารทดลองทุกชุดมีแนวโน้มขององค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันลดลง โดยให้ผลแตกต่างจากการทดลองของ กิจการ และคณะ (2548) ที่พบว่า กึ่งกุลาดำที่เลี้ยงอาหารผสมขมิ้นชันที่ระดับ 43.14 และ 215.7 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นาน 8 สัปดาห์ มีแนวโน้มของปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนต่ำกว่าชุดควบคุม ส่วน phenoloxidase activity ของกึ่งที่เลี้ยงด้วยขมิ้นชันทุกความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม ($P > 0.05$) นอกจากนี้ จิตติวัฒนา (2550) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกึ่งก้ามกราม พบว่า เมื่อให้กึ่งก้ามกรามกินอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ 5 และ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีแนวโน้มของกิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase สูงกว่าชุดควบคุมแต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ทั้งในระดับห้องทดลองและในฟาร์ม

ส่วนปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน พบว่า ปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 20 ppm เป็นระยะเวลา 15 วัน มีผลทำให้มีการเพิ่มปริมาณ phagocytic activity และที่ระยะเวลา 30 วัน มีผลทำให้มีการเพิ่มปริมาณ respiratory burst สูงกว่าในชุดควบคุมอย่างเด่นชัด แต่ไม่มีผลต่อองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันอื่น ๆ สอดคล้องกับการศึกษาของ มิถิลา (2549) ซึ่งทดลองผสมผงขมิ้นชันในอาหารปลาทอง พบว่า ไม่มีความแตกต่างของค่า hematocrit และ hemoglobin เมื่อได้รับอาหารผสม curcuminoids ที่ 10,000 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และ Sambainah *et al.* (1982) พบว่าหลังให้อาหารผสมขมิ้นชัน 0.1, 0.2, 0.5, 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ในหนู ไม่พบความแตกต่างของ hemoglobin และเม็ดเลือดแดงเช่นกัน นอกจากนี้ กิตติมา (2548) ทำการทดลองเสริมสารสกัดขมิ้นชัน 0.05 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารไก่กระทอง พบว่ามีผลของระดับ antibody ต่อวัคซีน Newcastle สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.01$) และมีอัตราส่วน heterophil / lymphocyte (ซึ่งเป็นตัวชี้วัดถึงความเครียดโดยถ้ามีค่าต่ำจะให้ผลดี) ในไก่ที่อายุ 14 วัน ที่เสริมสารสกัดขมิ้นชัน 0.01 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม ($P < 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาสัดส่วนต่อ bursal weight / body weight (สัดส่วนของอวัยวะน้ำเหลืองต่อน้ำหนักตัวโดยถ้ามีค่าสูงจะให้ผลดี) พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดขมิ้นชัน 0.03 เปอร์เซ็นต์มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

จากผลการทดลองที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันนี้ชี้ได้ชัดว่าสารสกัดขมิ้นชันที่ผสมในอาหารสัตว์น้ำไม่ส่งต่อปริมาณเม็ดเลือดและองค์ประกอบต่าง ๆ ของเม็ดเลือด แต่มีผลกับบางองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันดังที่พบในการทดลองครั้งนี้ เนื่องจาก curcumin ในขมิ้นชันสามารถมีผลต่อการทำงานของ T-cells, B-cells, macrophage, neutrophils, natural killer cell และ dendritic cells (Ranjan *et al.*, 1998a; Ranjan *et al.*, 1998b; Kim *et al.*, 2005; Li and Liu, 2005; Yadar *et al.*, 2005; Jagetia and Aggarwal, 2007) Antony *et al.* (1999) รายงานว่า curcumin สามารถเพิ่ม macrophage phagocytic activity และ antibody titer ต่อ sheep red blood cells (SRBC) ในเลือดและเพิ่ม plaque forming cells (PFC) ในม้ามของหนูทดลองได้ พร้อมกันนั้น curcumin สามารถเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ lymphocyte โดยเพิ่มการผลิต IgG จากการศึกษาลymphocytes ในม้ามของหนู (Allam, 2009) นอกจากนี้ Ranjan *et al.* (1998b) รายงานว่า curcumin สามารถยับยั้งการตายของ B-cells ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายโดย Epstein-bar virus (EBV) ได้ และ curcumin ยังสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) ให้เพิ่มสูงขึ้นในสัตว์ทดลองได้ (บุศรา และคณะ, 2550) นอกจากนั้นช่วยลด cyclosporine และ hydrogen peroxide ที่ถูกสร้างจากภาวะเครียดได้ด้วย ทำให้สามารถต้านทานอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์ของร่างกายได้

การศึกษาฟ้าทะลายโจรเพื่อเสริมสุขภาพสัตว์น้ำ พบว่า กุ้งกุลาดำและกุ้งขาว ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร มีการเพิ่มของระดับองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันที่ทำการศึกษ โดยกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 30 ppm เป็นระยะเวลา 30 วัน มีกิจกรรม phenoloxidase activity, phagocytic activity และ bactericidal activity สูงกว่าชุดควบคุม และบางองค์ประกอบแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ให้ผลแตกต่างจากการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยฟ้าทะลายโจร โดย กิจการ และคณะ (2548) ที่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ของ phenoloxidase activity และ ปริมาณเม็ดเลือดรวมของชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 304.92 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมกับชุดควบคุม

ในส่วนการทดลองการใช้ฟ้าทะลายโจรในปลานิล พบว่า ปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 10 ppm เป็นระยะเวลา 30 วัน มีปริมาณ red blood cells, hemotocrit, hemoglobin และ peripheral blood leukocytes ไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม แต่เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารทดลองที่ระดับดังกล่าวเพียง 15 วัน พบ phagocytic activity สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม ($P < 0.05$) โดย ชฎาธาร (2550) รายงานว่า percent phagocytosis และ phagocytic index ของเม็ดเลือดขาวมีค่าเพิ่มมากขึ้น ($P < 0.05$) ในปลาทองที่ได้รับไบยอ และฟ้าทะลายโจร ร่วมกับการใช้ synthesis astaxanthin และกลุ่มที่ได้รับฟ้าทะลายโจรเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ อริชญา (2548) รายงานว่า andrographolide ในฟ้าทะลายโจรไม่กระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ lymphocyte แต่กระตุ้นการทำงานของ B cells และ monocytes ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองภูมิคุ้มกันในกระแสเลือด (humoral immune response) ได้

จากผลการทดลองที่ได้นี้อาจกล่าวได้ว่าฟ้าทะลายโจรมีบทบาทโดยตรงต่อการทำงานของเม็ดเลือดขาวที่ตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันในกระแสเลือดในสัตว์น้ำได้เพราะมีผลเพิ่ม percent phagocytosis ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งของการทำงานในระบบภูมิคุ้มกัน โดย Puri *et al.* (1993) พบว่า ฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์มีผลกระตุ้นการทำงานของภูมิคุ้มกันทั้ง specific และ non specific โดยสามารถเพิ่มปริมาณ hemagglutination antibody, hemolytic plaque-forming cells และ phagocytic activity นอกจากนั้นยังควบคุม cytokine ที่อาจมีมากเกินไป เช่น IL-6 และ TNF- α ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดแผลบริเวณเนื้อเยื่อได้ (Liu *et al.*, 2008) พร้อมกันนั้นฟ้าทะลายโจรยังมีคุณสมบัติเกี่ยวข้องกับสารต้านอนุมูลอิสระที่คล้ายกับในขมิ้นชัน โดยสามารถเพิ่มการทำงานของ SOD, CAT และ GPx ในตับหนูได้ ลดอนุมูลอิสระที่เกิดในเซลล์ปกติ (Trividi and Rawel, 2001)

การทดลองที่ 3 การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของสัตว์น้ำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร

หลังจากให้กึ่งกุลาดำ กึ่งขาว และปลานิลกินอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน และฟ้าทะลายโจร เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่า กึ่งกุลาดำและกึ่งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันมีปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. และเชื้อแบคทีเรียรวมในลำไส้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนั้นปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมในลำไส้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($P < 0.05$) โดยไม่มีผลกระทบกับน้ำหนักเฉลี่ยของสัตว์น้ำทดลองครั้งนี้ (ภาคผนวก ก) ซึ่งผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าขมิ้นชันสามารถควบคุม และลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ของสัตว์ทดลองได้ สอดคล้องกับฤทธิ์ของขมิ้นชันที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด โดยไปยับยั้งการสร้างกรด และการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น *Lactobacillus acidophilus* และ *L. plantarum* (Shanker and Murthy, 1978) และ ยับยั้งการสร้างก๊าซของเชื้อ *Escherichia coli* (Bhavanishanker and Murthy, 1986) นอกจากนี้มีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบและเหง้าของขมิ้นชันซึ่งมี monoterpene และ sesquiterpene ketone สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* MTCC 433 ได้ที่ความเข้มข้น 15.62 และ 125 ไมโครกรัมต่อลิตร (Uechi *et al*, 2000)

ประกอบศิริ (2546) รายงานว่า curcumin เมื่อเข้าสู่กระแสเลือดและอวัยวะต่าง ๆ แล้วจะไม่พบ curcumin ในรูปแบบเดี่ยว ๆ เนื่องจาก curcumin มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบขณะมีการดูดซึมในลำไส้ นอกจากนี้ Aggarwal and Sung (2008) ได้รายงานว่าการทดลองให้ curcumin ทางปากมี bioavailability ต่ำ เนื่องจาก curcumin จะเกิด metabolize ในตับและลำไส้เปลี่ยนรูปเป็น curcumin glucuronide และ curcumin sulphate ส่วนการทดลองให้โดย intraperitoneal หรือ systemic ส่งผลให้ curcumin ในร่างกายและในระบบเปลี่ยนรูปเป็น tetrahydrocurcumin, hexahydrocurcumin และ octahydrocurcumin (hexahydrocurcuminol) โดยทุกรูปแบบดังกล่าวยังคงมีหมู่ phenol group อยู่ในโครงสร้างโมเลกุล ซึ่งน่าจะเป็นส่วนสำคัญในการทำลายเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ โดยทำให้เกิดการรวมตัวกับโปรตีนภายในเซลล์และเกิดการแตกของเซลล์แบคทีเรียได้ ดังนั้นรูปแบบต่าง ๆ เหล่านี้น่าจะเป็นกลไกหนึ่งที่จะช่วยให้ขมิ้นชันสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของสัตว์น้ำทดลองในครั้งนี้ได้ดีขึ้น นอกจากนั้นการเลี้ยงสัตว์น้ำทดลองโดยการให้อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันติดต่อกันอาจช่วยให้ขมิ้นชันมีระดับความเข้มข้นในร่างกายที่เพียงพอที่จะออกฤทธิ์ต่อสิ่งแปลกปลอมได้ และ

curcumin ในขมิ้นชันยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ macrophage และ natural killer cells (Sharma *et al.*, 2005)

สำหรับกุ้งกุลาดำ กุ้งขาว และปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรเป็นระยะเวลา 1 เดือน หลังจากนั้นนำลำไส้มาบดเพื่อประเมินเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ พบว่า ในกุ้งกุลาดำ มีปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. และ แบคทีเรียรวมส่วนใหญ่ในลำไส้ต่ำกว่ากุ้งชดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งให้ผลแตกต่างจากการทดลองของ กิจการ และคณะ (2548) ที่พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรมีแบคทีเรียในลำไส้ไม่แตกต่างจากชดควบคุม ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตามการทดสอบครั้งนี้พบว่า กุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. และ แบคทีเรียรวมในลำไส้กับชดควบคุม ($P > 0.05$) และกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ระดับสูง คือ 250 ppm พบปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมในลำไส้สูงกว่าในชดควบคุม ($P > 0.05$) ซึ่งจากผลที่ได้ อาจเป็นไปได้ว่าระดับความเข้มข้นของสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ผสมในอาหารสูงเกินไป ทำให้กุ้งขาวกินอาหารทดลองได้น้อย ส่งผลทำให้ฤทธิ์ในการต้านทานแบคทีเรียลดลง ไม่เหมาะสมกับการควบคุมเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ ซึ่งสอดคล้องกับเภสัชจลนศาสตร์ของฟ้าทะลายโจรในหนูขาวที่พบว่าประสิทธิภาพของสาร andrographolide นั้นจะลดลงเป็น 4 เท่าเมื่อให้ขนาดยาสูงเกินปกติ 10 เท่า (Panossian *et al.*, 2000)

ส่วนในปลานิล พบเชื้อแบคทีเรียรวมในลำไส้ของชดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรมีปริมาณต่ำกว่าชดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ฟ้าทะลายโจรเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อในลำไส้ของทั้งกุ้งกุลาดำ และปลานิล แต่ไม่มีผลในกุ้งขาว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาส่วนใหญ่ที่พบว่าฟ้าทะลายโจรมีประสิทธิภาพต่อระบบทางเดินอาหาร ซึ่งโดยทั่วไปมีรายงานว่า dehydroandrographolide ในฟ้าทะลายโจรถูกดูดซึมเร็วที่สุด และ neoandrographolide ถูกซึมช้าที่สุด (ธีรวุฒิ และคณะ, 2534) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า neoandrographolide ในสารสกัด crude extract ของฟ้าทะลายโจรในการศึกษานี้ อาจเป็นส่วนหลักในการออกฤทธิ์ในลำไส้เช่นเดียวกับในสัตว์อื่น ๆ นอกจากนี้ Akowuah *et al.* (2009) รายงานว่าการให้ andrographolide และ 14-deoxy-11, 12-didehydrographolide ทางปากนั้นจะมีการดูดซึมเข้ากระแสเลือดได้อย่างรวดเร็ว แต่ andrographolide ไม่มี phenolic hydroxyl ทำให้คงสภาพดีในลำไส้เมื่อเปรียบเทียบกับพวก polyphenolic acid และ flavonoids ด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้ฟ้าทะลายโจรสามารถทำงานได้ดีในลำไส้เนื่องจากการแพร่กระจายอยู่ได้นาน สอดคล้องกับผลการทดลองใน

การควบคุมเชื้อแบคทีเรียครั้งนี้ ดังนั้นฟ้าทะลายโจรจึงเป็นสมุนไพรที่นิยมนำมาใช้ในผู้ป่วยโรค
อุจจาระร่วง และบิด เนื่องจากมีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียใกล้เคียงกับเตตราไซคลิน โดยมีฤทธิ์ลดความ
เคลื่อนไหว และการหดเกร็งตัวของลำไส้ซึ่งสารออกฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรเป็นพวก diterpene
lactones (ชญาธาร, 2550) นอกจากนี้ สุรชนิ และคณะ (2533) รายงานว่าสารสกัดฟ้าทะลายโจร,
crude lactone และ deoxyandrographolide มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วง
และเชื้อหนอง ส่วน andrographolide และ neodandrographolide ไม่มีผล

จากผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการใช้สารสกัด crude extract ของขมิ้นชันที่มีสารสำคัญ
curcuminoids รวม 25.725 % w/w และฟ้าทะลายโจรที่มีสารสำคัญ total lactone รวม 10.654 %
w/w ในการควบคุมเชื้อก่อโรคของสัตว์น้ำเศรษฐกิจโดยการละลายน้ำนั้นคงไม่เหมาะสม เนื่องจาก
ต้องใช้ในปริมาณมาก นอกจากนี้รูปแบบของสมุนไพรที่เป็นสารสกัดอาจทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย
เนื่องจากต้องทำการสกัดสารก่อนนำมาใช้ ส่วนฤทธิ์ในการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย เสริมภูมิคุ้มกัน
และการควบคุมปริมาณเชื้อในลำไส้ของสัตว์น้ำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน และ
ฟ้าทะลายโจรนั้นมีแนวโน้มที่ดี โดยจากผลการทดลองส่วนนี้ชี้ชัดว่า การให้สารสกัดสมุนไพร
รูปแบบผสมอาหารเป็นรูปแบบที่เหมาะสมในการใช้เลี้ยงสัตว์น้ำ และเป็นแนวทางเพื่อทดแทนการ
ใช้ยาปฏิชีวนะที่ควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำได้ ซึ่งกลไกของขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร
ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียโดยตรง คือการควบคุมการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย หรือทางอ้อม
โดยการกระตุ้นการทำงานของระบบต่าง ๆ เช่น macrophage, cytokine, T และ B cells และ anti-
inflammatory เป็นต้น โดยกระบวนการดังกล่าวจะช่วยให้ร่างกายสัตว์น้ำสามารถต้านทานเชื้อและ
ช่วยเสริมภูมิคุ้มกันให้ดีขึ้น ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าการเพิ่มกิจกรรมบางประเภทของระบบ
ภูมิคุ้มกันที่ทำงานดีขึ้น เช่น phenoloxidase activity, phagocytic activity, bactericidal activity และ
respiratory burst เป็นต้น นอกจากนี้ cucumin ในขมิ้นชันยังช่วยยับยั้งการเกิด hemolysis และ lipid
peroxidation ของเม็ดเลือดในร่างกายสัตว์โดยอาศัยลักษณะ โมเลกุลที่เป็น β -diketone และ phenolic
hydroxyl (Sugiyama *et al.*, 1996) โดยลักษณะโมเลกุลดังกล่าวมีส่วนช่วยทำให้แทรกซึมเข้าเซลล์
และกระจายตัวในเซลล์ได้ง่าย เช่นเดียวกับโมเลกุลของฟ้าทะลายโจรที่ดูดซึมได้รวดเร็วและมีผลดี
ต่อการทำงานเช่นในลำไส้ของคน แต่ฟ้าทะลายโจรนั้นขณะที่ดูดซึมเข้าร่างกายจะมีการสูญเสียไป
เนื่องจากการจับกับพลาสมาโปรตีนซึ่งอาจส่งผลกับประสิทธิภาพการทำงานได้ (Panossian *et al.*,
2000) โดยปัจจัยดังกล่าวน่าจะส่งผลให้มีประสิทธิภาพต่ำกว่าในขมิ้นชัน แต่ทั้งฟ้าทะลายโจรและ
ขมิ้นชันมีคุณสมบัติคล้ายกัน เช่น กลไก anti-oxidant และ anti-inflammatory โดยกลไกเหล่านี้เอง

เป็นตัวเสริมการทำงานของกระบวนการต่าง ๆ ภายในตัวสัตว์น้ำ (ฐานิดา, 2550) ทำให้ร่างกายแข็งแรง มีความต้านทานต่อสิ่งแปลกปลอมได้ดีขึ้น

นอกจากนี้สารสกัดในการทดลองที่เป็นลักษณะ crude extract ทั้งในขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรนั้นทำให้สารสำคัญออกฤทธิ์ curcuminoids และ diterpenoid lactone ตามลำดับ รวมถึงน้ำมันหอมระเหยต่าง ๆ ทุกชนิดคงอยู่ร่วมกัน ซึ่งจะมีส่วนช่วยในการออกฤทธิ์และการทำงานต่อเชื้อแบคทีเรียและร่างกายของสัตว์น้ำทดลองได้

ดังนั้นผลการศึกษายาทาบทของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำและฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคครั้งนี้จะเป็นแนวทางและข้อมูลเบื้องต้นในการประยุกต์ใช้สมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้เพื่อลดการใช้จ่ายปฏิชีวนะที่ก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยา และใช้เสริมสุขภาพในสัตว์น้ำเศรษฐกิจต่อไปในอนาคต

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การศึกษาการใช้สารสกัดขมิ้นชันเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในลักษณะ *in vitro* โดยการประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโต และการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิด *Vibrio harveyi* และ *Streptococcus agalactiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดของขมิ้นชันที่ 512 และ 853.33 ppm ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (Minimal Inhibitory Concentration [MIC]) และที่ 2,275.55 และ > 4,452.17 ppm ตามลำดับ สามารถฆ่าเชื้อ (Minimal Bactericidal Concentration [MBC]) ซึ่งจัดว่ามีประสิทธิภาพต่ำ

2. การศึกษาการใช้สารสกัดฟ้าทะลายโจรเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในลักษณะ *in vitro* โดยการประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโต และการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิด *V. harveyi* และ *S. agalactiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดของฟ้าทะลายโจรที่ 2,560 และ 853.33 ppm ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (Minimal Inhibitory Concentration [MIC]) และที่ 2,560 และ > 4,452.17 ppm สามารถฆ่าเชื้อ (Minimal Bactericidal Concentration [MBC]) ซึ่งจัดว่ามีประสิทธิภาพต่ำ

3. การศึกษาการใช้สารสกัดขมิ้นชันเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในลักษณะ *in vivo* โดยการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาวด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน และทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* พบว่า กุ้งกุลาดำ และกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ 25.0 มก./อาหาร 1 กก. (ppm) เป็นเวลา 2 สัปดาห์สามารถต้านทานต่อเชื้อโรคได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในปลานิลเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันและทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *S. agalactiae* พบว่า ปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ 20.0 มก./อาหาร 1 กก. (ppm) เป็นเวลา 2 สัปดาห์สามารถต้านทานต่อเชื้อโรคได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4. การศึกษาการใช้สารสกัดฟ้าทะลายโจรเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในลักษณะ *in vivo* โดยการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาวด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร และทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* พบว่ากุ้งกุลาดำและกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ 30.0 มก./อาหาร 1 กก. (ppm) เป็นเวลา 2 สัปดาห์สามารถต้านทานต่อเชื้อโรคได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในปลานิลเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลาย

โอรและทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *S. agalactiae* พบว่า ปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด ฟ้าทะเลลายโอรทุกระดับ เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$)

5. การทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ โดยเฉพาะกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด (bactericidal activity) สำหรับปลานิลเมื่อทดลองเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันเป็นที่ระดับ 20 ppm เป็นระยะเวลา 15 วัน มีผลทำให้มีการเพิ่มกิจกรรม phagocytic activity และที่ระยะเวลา 30 วัน มีผลทำให้มีการเพิ่มปริมาณ respiratory burst

6. การทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะเลลายโอรเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ โดยเฉพาะกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase, phagocytic activity และ bactericidal activity สำหรับปลานิลเมื่อทดลองเลี้ยงด้วยอาหารทดลองที่ระดับ 10 ppm ดังกล่าวเพียง 15 วัน พบ phagocytic activity เพิ่มขึ้น

7. ส่วนการศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งกุลาดำ กุ้งขาว และปลานิล พบว่า สารสกัดขมิ้นชันทุกความเข้มข้นสามารถลดจำนวนแบคทีเรียรวมทั้งหมด และจำนวน *Vibrio* sp. ทั้งหมดได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับสารสกัดฟ้าทะเลลายโอรทุกความเข้มข้นสามารถลดจำนวนแบคทีเรียรวมทั้งหมด และจำนวน *Vibrio* sp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งกุลาดำ และปลานิลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ข้อเสนอแนะ

อย่างไรก็ตามผลการศึกษาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร ลักษณะ crude extract ต่อเชื้อ *V. harveyi* และ *S. agalactiae* ยังมีค่าสูง ทำให้การนำไปใช้ต้องใช้ในปริมาณมาก อาจส่งผลกระทบต่อต้นทุนในการผลิตเนื่องจากต้องมีการสกัดด้วยตัวทำละลาย ดังนั้นในอนาคตน่าจะมีการศึกษาวิจัยถึงผลของขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรที่เป็นลักษณะสมุนไพร (crude drug) ต่อไปเพื่อให้สามารถปรับใช้ได้ภายในระดับฟาร์ม

และจากผลการทดลองนี้ระบุว่า สารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรสามารถนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและเสริมภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำในรูปแบบการผสมอาหาร โดยแนะนำให้ผสมอาหารกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวด้วยสารสกัดขมิ้นชัน และฟ้าทะลายโจรที่ 25 และ 30 ppm ตามลำดับ มีผลดีในการป้องกันโรค เสริมภูมิคุ้มกัน และควบคุมแบคทีเรียในลำไส้ ส่วนในปลานิลการผสมอาหารด้วยสารสกัดขมิ้นชัน และฟ้าทะลายโจรที่ระดับ 20 และ 10 ppm ตามลำดับ มีผลดีในการป้องกันโรค เสริมภูมิคุ้มกัน และควบคุมแบคทีเรียในลำไส้ แต่การนำไปใช้ควรต้องคำนึงถึงปริมาณสารสำคัญที่เป็นตัวออกฤทธิ์ในสารสกัดสมุนไพรด้วยเพื่อให้การใช้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ปัจจุบันงานวิจัยการใช้สารสกัดสมุนไพรในระดับฟาร์มของสัตว์น้ำมีค่อนข้างน้อย ส่วนใหญ่เป็นงานวิจัยในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้นซึ่งน่าจะสนับสนุนให้มีการวิจัยเพิ่มมากขึ้น พร้อมกันนั้นควรส่งเสริมให้มีการศึกษาถึงผลกระทบจากปัจจัยแวดล้อมในการเลี้ยงกับการออกฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรเพิ่มเติม และควรมีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเอนไซม์หรืออื่นที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของสมุนไพร โดยข้อมูลต่าง ๆ จะทำให้สามารถนำสมุนไพรมาปรับใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทยให้ยั่งยืนต่อไปได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมส่งเสริมการส่งออก. 2549. การส่งออกสินค้าสำคัญของไทย ปี 2544 - 2548 . กรมส่งเสริมการส่งออก, กระทรวงพาณิชย์.

กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร. 2533. สมุนไพรพื้นบ้านฉบับรวม. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข, กรุงเทพฯ.

กิจการ ศุภมาตย์. 2538. โรคไวรัสในกึ่งกลาดำ. วารสารข่าวริมบ่อ 3 (5) : 2 - 5.

_____, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุตินา ตันติกิตติ และ Rudolf Hoffmann. 2543 ก. ภูมิคุ้มกันโรคในกึ่งกลาดำ : II เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกึ่งกลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 581 - 588.

_____, อุษณีย์ เอกปนิธานพงศ์, T. Itami และ จิราพร เกษรจันทร์. 2543 ข. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกึ่งกลาดำ:I. เทคนิคในการศึกษาภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกึ่งกลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์ 22(ฉบับพิเศษ): 567 - 580.

_____, นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, มะลิ บุญยรัตผลิน, จรีพร เรืองศรี, ฐานันดร ทัดตานนท์ และ ธนาวุฒิ กล่าวเกลี้ยง. 2548. ผลของสมุนไพรต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค การเจริญเติบโต สุขภาพ และความต้านทานโรคในกึ่งกลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์ 27 (ฉบับพิเศษ 1): 55-70.

กิติมา จินตามงคล. 2548. ผลการใช้สารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน ย่านพาโหม และบอระเพ็ด ต่อภูมิคุ้มกันโรค ภาวะเครียด และคุณลักษณะทางการเจริญเติบโตในไก่กระตัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เกษตรกลางกรุง (นามแฝง). 2539. ฟ้ายะลวยโจร : สูดยอคสมุนไพรไทยกับการพัฒนานำมาใช้ของ
คนไทยยุคโลกาภิวัตน์. วารสารชมรมถ่ายทอดเทคโนโลยีการเกษตร 2 (14) : 6 - 17.

กิริ กอนันตกุล. 2542. การเพาะเลี้ยงปลานิลแปลงเพศ. กองประมงน้ำจืด, กรุงเทพฯ.

จริยา สีนเดิมสุข. 2536. ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดบริสุทธิ์จากสมุนไพรฟ้ายะลวยโจร.
วารสารกรมการแพทย์ 18(8) : 394 - 400.

จิตติวัฒนา เหล็งบำรุง. 2550. ประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ในการ
กระตุ้นภูมิคุ้มกันของกิ้งก่ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) เพื่อยับยั้ง
Aeromonas hydrophila. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชฎาธาร โทนเคียว. 2550. ผลของใบยอและฟ้ายะลวยโจรต่อการเปลี่ยนแปลงสีและอัตราการจับกิน
เชื้อโรคของเม็ดเลือดขาวในปลาทอง (*Carasius auratus*). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2528. โรคปลา. ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ.

_____ และ พรเลิศ จันทรรักษ์กุล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย.
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

ชลิดา ชมานนท์, สมภพ รุ่งสุภา และ วิณา เกษพุดชา. 2540. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบ
มะม่วงต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกิ้งกูดดำ. รายงานการวิจัย
ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปี 2540. สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 73 น.

_____, สมภพ รุ่งสุภา, มณฑิรา ถาวรยุติการต์ และวินา เกษพุดชา. 2542. การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อระบบภูมิคุ้มกันในกิ้งกูดดำ, น. 233 - 239. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37 (สาขาประมง), 3 - 5 กุมภาพันธ์ 2542, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ชัยชาญ ไตรศรีศิลป์. 2545. ฟีนอลออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกิ้งกูดดำ *Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชัยวัฒน์ สุวรรณทัต, สุวรรณ กิจภากรณ์, กฤษ อังคนาพร, พิภพ สดสี และ นันทวัน บุญยะประสงค์. 2547. การใช้สารขมิ้นชันเป็นสารต้านออกซิเดชันต่อสภาพภูมิคุ้มกัน และสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อซึ่งอยู่ในสภาวะเครียด, น. 181 - 187. ใน สมุนไพรไทย : โอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์, 15 - 16 มกราคม 2547, โรงแรมสยามซิตี้.

ชาติรี ชาญประเสริฐ และ ดร.ณ เพ็ชรพลาย. 2531. การปลูกสมุนไพรฟ้าทะลายโจรเพื่อใช้เป็นยา. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 30: 315 - 320.

ฐานิดา ศรีหาวงษ์. 2550. ผลของสารสกัดหยาบสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อความเครียดจากภาวะออกซิเดชันและการเปอร้ออกซิเดชันของไขมันในไก่เนื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณพพร ดำรงศิริ. 2530. พฤษกษอนุกรมวิธาน. มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ.

คริษฐา จันทวรรณ, นนทวิทย์ อาริย์ชน และ ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ. 2550. การศึกษาชนิดและความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่แยกได้จากปลาไน, น. 204 - 211. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 (สาขาประมง), 30 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2550, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ครุณี แซ่ฮุย, อนันต์ ต้นสุตะพานิช และ ลีลา เรืองแป้น. 2530. *Vibrio harveyi* สาเหตุของโรคแบคทีเรียเรืองแสงของลูกกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguensis*), น. 106 - 126. ใน โรคกุ้งทะเลและการใช้เคมีภัณฑ์. เอกสารประกอบการสัมมนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ครั้งที่ 1, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ครุณี เพ็ชรพลาย, ประถม ทองศรีรักษ์, ชาตรี ชาญประเสริฐ, เชนิพนธ์ สารสวรรค์, ทวีผล เศษตวงศ์ ณ อรุณยา, ปราณี ขวลิตรารัง, เย็นจิตร จิงเวชดำรงกุล และ อติศักดิ์ ดีต้นนา. 2533. การพัฒนาการปลูกฟ้ายะลวยโอรเพื่อนำมาใช้ผลิตยา. กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กรุงเทพฯ.

เต็ม สมิตินันท์. 2523. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง). กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

เต็มดวง สมศิริ และ สุริยัน สุนทรวิทย์. มปป. ผลการศึกษาประสิทธิภาพการใช้มันชันผสมอาหารลูกกุ้งกุลาดำต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* และเชื้อตัวแดงดวงขาว. กรมประมง, กรุงเทพฯ.

ธิดารัตน์ ปลื้มใจ. 2534. ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของฟ้ายะลวยโอร. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข.

ธีรวุฒิ ปิ่นทอง, ไชยยศ บุญญาภิจ, อำไพ หมั่นไธสง และ เรณู โกยสุขโข. 2534. การวิเคราะห์ andrographolide neoandrographolide และ dehydroandrographolide โดยเครื่องปั่นแยกสารระบบโครมาโตกราฟแรงดันสูง. สารศิริราช 43: 760-768.

นนทวิทย์ อาริย์ชน. 2549. คู่มือปฏิบัติการภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ. ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ.

นวลมณี พงศ์ธนา. 2548. โรคของปลานิล. สวัสดิ์สัตว์น้ำไทย (3): 32 - 36.

นวลตา ม่วงน้อยเจริญ, อัญชลี ตั้ตตะวะศาสตร์, วิชัย ปราสาททอง, เกริก รัตอาภา และ
ไพบุลย์ ดาวสดไส. 2538. ความสัมพันธ์ระหว่างส่วนประกอบทางเคมีของฟ้าทะลายโจร
และผลทางการรักษาโรค. รายงานการวิจัย, สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ,
กรุงเทพฯ. 62 น.

นเรศ ช้วนยุค, หิรัญ กังแฮ, เรวัตร คงประดิษฐ์ และ กิจการ สุขมัตย์. 2548. โรคติดเชื้อแบคทีเรีย
Streptococcus agalactiae ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*).
วารสารสงขลานครินทร์ 27 (ฉบับพิเศษ 1): 307 - 319.

นันทริกา ชันช้อย. 2538. ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง (Shrimp Immune System), น. 332 - 342. ใน
ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 22. สัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทย,
กรุงเทพฯ.

นันทวัน บุญยะประภัศร. 2529. ก้าวไปกับสมุนไพร. ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร. คณะเภสัชศาสตร์,
มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

นิจศิริ เรืองรังษี และ พยอม ดันติวัฒน์. 2534. พิษสมุนไพร. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

บรรจง เทียนส่งรัมย์. 2521. หลักการเลี้ยงกุ้งทะเล. คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ.

บ้งอร ศรีมุกดา. 2530. การเพาะกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 55/2530. สถานีประมงน้ำจืด
จังหวัดระยอง, กรมประมง, กรุงเทพฯ.

บุศรา แก้วสมุทร, สมชาย ปิ่นละออง, ธิดารัตน์ บุญมาศ, เตือนใจ ศรีสว่างวงศ์ และ พวงรัตน์ ยง
วณิชย์. 2550. ผลของเคอร์คูมินต่อการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์อินดิคิเบิลไนตริก
ออกไซด์ซินเทส และเอนไซม์ในกลุ่มต่อต้านอนุมูลอิสระในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดพยาธิ
ใบไม้ตับ. วารสารวิจัย มข. (บศ.) 7 (2): 121-131.

เบญจมินทร์ ทองเปิง. 2547. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบยั่งยืน. สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม, กรุงเทพฯ.

ปกรณ อุ่นประเสริฐ. 2531. เทคนิคการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ประชาชนการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ประคองศิริ บุญคง. 2546. บทความพินฟูวิชาการ ขมิ้นชัน สารพันประโยชน์. วารสารองค์การเภสัชกรรม 29 (1): 31-38.

ประจวบ หล้าอุบล. มปป. ความรู้เรื่องการเลี้ยงกุ้ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2543. เสวนาวิชาการเรื่อง กุ้ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภูมิ. 2547. ระบบภูมิคุ้มกันของปลา, น. 19 - 24. ใน การอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง การวินิจฉัยและการป้องกันโรคในสัตว์น้ำ. คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ฝ่ายวิชาการบริษัทไทยยูเนี่ยน ฟีดมิลล์. 2549. รวมความรู้การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม. สวัสดิ์สัตว์น้ำไทย (10): 3 - 26.

พยอม ตันติวัฒน์. 2521. สมุนไพร. สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

เพียว เหมือนวงศ์ญาติ. 2529. ตำราวิทยาศาสตร์สมุนไพร. เมดิคอลมีเดียจำกัด, กรุงเทพฯ.

พรเกียรติ สมหวัง. 2544. การสกัดสารเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชันโดยใช้สารพอลิออกซีเอทิลีนซอร์บิแทน โมโนโอเลต. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เพ็ญภา ทรัพย์เจริญ. 2539. โครงการศึกษาการใช้ฟ้าทะลายโจรแก้เจ็บคอเปรียบเทียบกับเพนนิซิลิน วี (0 09) . สงขลานครินทร์เวชสาร 14 : 37.

กัสสร สวาทะสุข, เครือวัลย์ อ่อนทอง และ สถาพร ดิเรกบุษราคม. 2543. ผลของสารสกัดลูกใต้ใบ ต่อสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ, น. 11 - 16. ใน การประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38, 1 - 4 กุมภาพันธ์ 2543, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ภาณุพรรณ. 2544. ขมิ้นชันยอดสมุนไพรโบราณรักษาสารพัดโรค. สำนักพิมพ์น้ำฝน. กรุงเทพฯ.

ภิญโญ เกียรติภิญโญ. 2545. วิธีปฏิบัติสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว แอล.เวนาไม. ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ.

มะลิ บุญยรัตกลิน, นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, กิจการ สุขมาตย์, ธนาวุฒิ กล่าวเกลี้ยง และ ฐานันดร ทัดตานนท์. 2547. ผลของสมุนไพรไทย 3 ชนิดต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค การ เจริญเติบโต อัตรารอด สุขภาพกุ้ง และความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ, น. 127 - 142. ใน สัมมนาเผยแพร่ผลงานวิจัย เรื่อง “การวิจัยเพื่อแก้ปัญหาอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งของ ประเทศไทย” วันที่ 28 กันยายน 2547 โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ กรุงเทพมหานคร. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

มานพ ตั้งตรงไพโรจน์, ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล, พรรณศรี จริโมภาส, สุจินต์ หนูขวัญ, กำชัย ลาวัณยุติ, วีระ วัชรกรโยธิน และ วิมล จันทโรทัย. 2536. การพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลา นิล. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 23. 67 น.

มัลลิกา วรรณประภา. 2547. ผลของสารสกัดขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ต่ออัตรารอดและ อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน (*Macrobrachium rosenbergii* de Man). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มิลิตา ปราณศิลป์. 2549. การใช้ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ในอาหารปลาทอง (*Carassius auratus*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ยุทธนา ศิริวิชญ์กุล, สุรพล ชลดำรงกุล และสมเกียรติ ทองรักษ์. 2545. ผลของฟ้าทะลายโจร ใบฝรั่ง ขมิ้นชัน ไพล และเปลือกผลมังคุด ต่อการรักษาโรคท้องร่วงในสุกร, น.115 – 127. ใน การประชุมวิชาการ สมุนไพรไทย : โอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมผลิตสัตว์, กรุงเทพฯ.

รุ่งทิพย์ ขวนชื่น. 2552. สารฆ่าจุลชีพ : ยาระงับเชื้อโรคและยาฆ่าเชื้อโรค. บริษัท ตีรณสาร จำกัด, กรุงเทพฯ.

รุทธี สุทธิศรี. 2545. ขมิ้นชัน : ยานำรู้. ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์, คณะเภสัชศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

เรวดี วงศาโรจน์. 2538. ขมิ้นชันใช้ป้องกันและรักษาโรค. วารสารองค์การเภสัชกรรม 21(4) : 27 -33.

ถัดดาวลัย บุญรัตนกรกิจ. 2535. โอกาสและทางเลือกของสมุนไพรไทย. นิตยสารอาชีพชาวเกษตร 12 : 47 - 52.

ลิตา เรืองแป้น, สถาพร ดิเรกบุษราคม และ เขาวินัย ดนยดล. 2543. ประสิทธิภาพและผลข้างเคียงของการใช้พญาขอ (*Clinacanthus nutans*) ป้องกันโรคไวรัสในกิ้งกูดดำ, น. 119 - 127. ใน การประชุมวิชาการกึ่งทะเลแห่งชาติครั้งที่ 2 : การยกระดับกึ่งไทยด้วยงานวิจัยและพัฒนา วันที่ 23 - 25 พฤศจิกายน 2543 โรงแรมรอยัล ภูเก็ต ซิตี้ จ. ภูเก็ต. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.

วลัยพร ทิมบุญธรรม. 2544. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วนิดา ไทรชมภู. 2542.ฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยและสารเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยมหิดล.

วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์. 2546. การศึกษาการใช้พืชสมุนไพร Family Cucurbitaceae ในการป้องกัน และกำจัดเชื้อไวรัสในการเพาะเลี้ยงกิ่งกลาดำ. รายงานการวิจัยทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 58 น.

วิษณุ ธรรมลิขิตกุล และ สุรภี พฤกษชาติวุฒิ. 2533. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสมุนไพรฟ้าทะลายโจร. สารศิริราช 42 (8) : 431 - 434.

ศิริมา พรสุวัฒนกุล, ประสาน ธรรมอุปกรณ์ และ อูมา กิตยานี. 2532. ทดสอบการป้องกันและรักษาแผลกระเพาะอาหารของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและเปปแติน้อย ใน ประชุมวิชาการเภสัชกรรม ประจำปี 2532. โรงแรมเอเชีย, กรุงเทพฯ. 127 น.

สถาบันวิจัยสมุนไพร. 2544 ก. มาตรฐานสมุนไพรไทย : ขมิ้นชัน. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข, กรุงเทพฯ.

สถาบันวิจัยสมุนไพร. 2544 ข. มาตรฐานสมุนไพรไทย : ฟ้าทะลายโจร. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข, กรุงเทพฯ.

สถาพร ดิเรกนุสราคม และ อุษณีย์ เอกปนิธานพงศ์. 2535. ผลของสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งต่อเชื้อไวรัสที่แยกจากกิ่งกลาดำที่เป็นโรค, น. 259 - 262. ใน รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2535 กรมประมง, 16 - 18 กันยายน 2535.

_____, อังคณา หิรัญสาดี และ สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์. 2539ก. ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพร แก่นิดต่อเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคห้วเหลืองในกิ่งกลาดำ. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 6/2539, สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, สงขลา. 7 น.

_____, ชาญเดช วังสะวิบูลย์ และ เขาวนิตย์ คนยดล. 2541. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบฝรั่งและออกซิเตตราซัยคลินในการกำจัดแบคทีเรียเรืองแสงในกิ่งกลาดำ, น. 144 - 151. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 36, 3 - 5 กุมภาพันธ์ 2541, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, เครือวัลย์ อ่อนทอง, สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์ และ นิพัทธ์ โชติการ. 2540. ฤทธิ์ของสารสกัดจาก สมุนไพรบางชนิดต่อเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาวใน กุ้งกุลาดำ, น. 145 - 150. ใน การประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35, 3 - 5 กุมภาพันธ์ 2540, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์, อังคณา หิรัญสาลี และลิลา เรืองแป้น. 2539ข. ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยบางชนิดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 7/2539, สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, สงขลา. 7 น.

_____, อังคณา หิรัญสาลี, สิทธิ บุญยรัตผลิน, เขาวินัย ดนยศล และ อุษณีย์ เอกปนิธานพงศ์. 2536. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบพญาสัตตอเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการ 8/2536, สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, สงขลา. 7 น.

สมบัติ รักประทานพร. 2542. การเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ด้วย *Bacillus* สายพันธุ์ S11. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรชนี เสวตศิลา, อาดาพรรณ ทองบุญรอด และ วิจารณ์ คำเมือง. 2533. การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของฟ้าทะลายโจรในห้องปฏิบัติการ, น. 15. ใน การประชุมสรุปสถานภาพของฟ้าทะลายโจร, 22 ตุลาคม 2533 , กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และองค์การเภสัชกรรม, กรุงเทพฯ.

สุเมตต์ ปุจฉาการ. 2534. ผลการสกัดฮอร์โมนลอกคราบจากพืชบางชนิดของไทยต่อการลอกคราบของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยมหิดล.

สุทธิชัย ปทุมล่องทอง. 2545. การเลี้ยงปลาน้ำจืด. ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์น้ำฝน, กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

หน่วยบริการฐานข้อมูลพืชสมุนไพรเศรษฐกิจ. 2548. **ขมิ้นชัน**. หน่วยบริการฐานข้อมูลพืช
แหล่งที่มา: <http://www.medplant.mahidol.ac.th>, 23 ธันวาคม 2548.

หยาดรุ้ง สุวรรณรัตน์. 2544. **ประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคใน
กุ้งกุลาดำแช่เยือกแข็ง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนันต์ชัย เขื่อนธรรม, 2542. **หลักการวางแผนการตลาด**. ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์,
กรุงเทพฯ.

อริชญา นาคชำนาญ. 2548. **ผลของสมุนไพรผสมของฟ้าทะลายโจร ขมิ้นชัน มะระขี้นก และไพล
ต่อระบบภูมิคุ้มกัน และคุณลักษณะทางการเจริญเติบโตในไก่กระทง**. วิทยานิพนธ์ปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Aggarwal, B. B. and B. Sung. 2008. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic
diseases : an age-old spice with modern targets. **Trends in Pharmacol Sci** 30 (2):
85-94.

Akowuah, G. A., I. Zhari and M. F. Yam. 2009. Absorption of andrographolines from
Andrographis paniculata and its effect on CCl₄-induced oxidative stress in rats. **Food
Chem. Toxicol.** 47: 2321-2326.

Allam, G. 2009. Immunomodulatory effects of curcumin treatment on murine schistosomiasis
mansoni. **Immunobiology** 214: 712-727.

Allison, A. J., D. N. Butcher, J. D. Connolly and K. H. Overton. 1968. Paniculides A, B and C
bisabolenoid lactone from tissue cultures of *Andrographis paniculata*. **Chem.
Commun.** 23 : 1493.

- Ammon, H. P. T., B. N. Dhawan and R. C. Srimal. 1992. Curcumin : A potent inhibitor of leukotriene B4 formation in rat peritoneal polymorphonuclear neutrophils (PMNL). **Planta. Med.** 58 : 226.
- Antony, S., R. Kuttan and G. Kuttan. 1999. Immunomodulatory activity of curcumin. **Immunol Invest** 28: 291-303.
- Apisariyukul, A., N. Vanittanakom and D. Bubbhasukh. 1995. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **J. Etha. Phar.** 49 : 163 - 167.
- Araujo, C. A. C. and L.L Leon. 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. Mem. Inst. **Oswaldo Cruz.** 96 : 723-728.
- Areechon, N., M. Endo, D. Jantawan, P. Srisapoom and N. Pirarat. 2005. Streptococcal infection in tilapia culture of Thailand, pp. 166 - 174. **In Productivity Techniques and Effective Utilization of Aquatic Animal Resources into the New Century .** Proceedings of the JSPS - NRCT International Symposium Joint Seminar 2005, Bangkok.
- Arora, R. B., N. Basu, V. Kapoor and A.P. Jain. 1971. Anti-inflammatory studies on *Curcuma longa* (Turmeric). **Ibid** 59 (8) : 1289 - 1295.
- Banetjee, A. and S. S. Nigam. 1978. Antimicrobial efficiency of the essential oil of *Curcuma longa*. **Indian J. Pharm.** 864 – 866.
- Bhavani, S. and V. S. Murthy. 1979. Effect of turmeric (*Curcuma longa*) fractions on the growth of some intestinal and pathogenic bacteria in vitro. **J. Exp. Biol.** 17 : 1363 - 1366.
- Bhavanishankar, T. N. and S. Murthy. 1986. Curcumin-induced alteration in the glucose metabolism of *Escherichia coli*. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 32 (4) : 263 - 270.

Brock, J. A. 1983. Disease (infectious and non- infectious), metazoan parasites, predators and public health considerations in *Macrobrachium* culture and fisheries, pp. 329 - 370. In J. P. Mcvey, ed. **CRC Handbook of Mariculture. Vol. I.** Crustacean Aquaculture, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.

_____ and K. Main. 1994. **A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*.** Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu.

Christybapita, M. Divyagnaneswari and R. D. Michael. 2007. Oral administration of *Eclipta alba* laef aqueous extract enhance the non – specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. **Fish Shellfish Immun.** 23 : 840 – 852.

Choudhury, B. R. and M. K. Poddar. 1985. Andrographolide and kalmegh (*Andrographolide paniculata*) extract : effect on intestine brush – border membrane-bound hydrolase. **Methods. Find. Exp. Clin. Pharmacol.** 7 (12) : 617 - 621.

Ciamician, G. and P. Silber. 1897. Zur kenntniss des curcumin. *Cited* J. W. Purseglove, E. G. Brown, C. L. Green and S. R. J. Robbins. 1981. **Turmeric Spices. Vol.II. Tropical Agricultural Series.** Longman Inc, New York.

Commandeur, J. N. M. and N. P. E. Vermuenlen. 1996. Cytotoxicity and cytoprotective activities of natural compounds. **Xenobiotica** 26(7) : 667 - 680.

Dahl, T. A. ,W. M. Mc Gowan, M. A. Shand and V. S. Srinivasan. 1989. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. **Arch. Microbiol.** 151(2) : 183 - 185.

Dhar, M. L., M. M. Dhar, B. N. Dhawan, B. N. Mehrotra and C. Ray. 1968. Screening of Indian plants for biological activity : part I . **Indian J. Med. Res.** 64 : 601.

- Gorter, K. 1911. The bitter constituent of *Andrographis paniculata* Nees. **Rec. Trav. Chim.** 30 : 151 - 160.
- Gupta, R. K. and L. Balasubrahmanyam. 1998. The turmeric effect. **World Patent Information** 20: 185-191.
- Hauser, A. R. 2007. **Antibiotic Basics for Clinicians : Choosing the Right Antibacterial Agent**. Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- Hermann, P. A. and A. W. Martin. 1991. Pharmacology of *Curcuma longa*. **Planta Med.** 57 : 1 - 6.
- Hose, J. E., G. E. Martin, V. A. Nguyen, J. Lucas and T. Rusentein, T. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocytes. **Biol. Bull. Mar. Biol.** 173(1): 178 - 187.
- Itami, T., Y. Takahashi, E. Tsuchihira and H. Igusa. 1994. Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β -1,3- glucan (Schizophyllan), pp. 375-378. *In* L. M. Chou, A. D. Munro, T. J. Lam, T. W. Chen, L. K. K. Cheong, J. K. Ding, K. K. Hooi, H. W. Khoo, V. P. E. Phang, K. F. Shim, C. H. Tan, eds. **The Third Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society**, Manila, Philippines.
- Jackson, C. L. and A. E. Menke. 1882. XXVII-Turmeric oil-Turmerol. *Cited* J. W. Purseglove, E. G. Brown, C. L. Green and S. R. J. Robbins. 1981. **Turmeric Spices. Vol II. Tropical Agricultural Series**. Longman Inc, New York.
- Jagetia, G. C. and B. B. Aggarwal. 2007. Spicing up of the immune system by curcumin. **J. Clin. Immunol.** 27: 19-35.
- Johansson, M.W. and K. Soderhall 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. **Pathology Today** 5 : 171-176.

- Kim, G. Y., K. H. Kim, S. H. Lee, M. S. Yoon, H. J. Lee, D. O. Moon, C. M. Lee, S. C. Ahn, Y. C. Park and Y. M. Park. 2005. Cucumin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells, MAPKs and translocation of NF-kappa B as potential targets. **J. Immunol.** 174: 8116-8124.
- Kumar, R. A., K. Sridevi, N. V. Kumar, S. Nanduri and S. Rajagopal. 2004. Anticancer and immunosimulatory compounds from *Andrographis paniculata*. **J. Ethnopharmacol** 92: 291-295.
- Kumar, S., U. Narain, S. Tripathi and K. Mirsa. 2001. Syntheses of curcumin bioconjugates and study of their antibacterial activities against β -lactamase producing microorganism.. **Bioconjug. Chem.** 92: 281-189.
- Lewis, D. H., J. K. Leong and C. Mock. 1982. Aggregation of penaeid shrimp laevae due to microbial epibionts. **Aquaculture** 27 (2) : 149 - 155.
- Li, X. and X. Liu. 2005. Effect of curcumin on immune function of mice. **J. Huazhong University Sci. Technol. Med. Sci** 25: 137-140.
- Lightner, D. V. 1983. Disease of culture penaeid shrimp, pp. 289-320. In J. P. Mcvey, ed. **CRC Handbook of Mariculture**. Vol. 1. Crustacean Aquaculture, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- _____. 1988. Vibrio disease in penaeid shrimp, pp. 42-47. In D. V. Lightner and C. J. Sindermann, eds. **Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture**. Elsevier, Amsterdam.
- _____ and R. Redman. 1977. Histochemical demonstration of melanin in cellular inflammatory process of penaeid shrimp. **J. Invertebr. Pathol.** 30 : 298 - 302.

- Limsong, J., E. Benjavongkulchai and J. Kuvatanasuchati. 2004. Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. **J. Ethnopharmacol** 92: 281-289.
- Liu, Y. 1996. Curcumin : An ingredient that reduces platelet aggregation and hyperlipidemia and enhances antioxidant and immune function, p. 199-205. *In* S. J. Risch and C. T. Ho, eds. **Species; Flavor Chemistry and Antioxidant Properties.**, Washington. American Chemical Society.
- Liu, J., Z. T. Wang and B. X. Ge. 2008. Andrograpanin, isolated from *Andrographis paniculata* exhibits anti-inflammatory property in lipopolysaccharide-induced macrophage cells through down-regulating the p38 MAPKs signaling pathways. **Int. Immunopharmacol.** 8: 951-958.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265 - 275.
- Lutomoski, J. , B. Keazia and W. Debska. 1974. Effect of an alcohol extract and active ingredient from *Curcuma longa* on bacteria and fungi. **Planta Med.** 26 (1) : 9 - 19.
- Madav, S., H. C. Tripathi and S. K. Tandan Mishra. 1995. Analgesic, antipyretic and antiulcerogenic effects of andrographolide. **Ind. J. Pharm. Sci.** 57 : 121 - 125.
- _____, S. K. Tandan, J. Lal and H. C. Tripathi. 1996. Antiinflammatory activity of andrographolide. **Fitoterapia** 66 : 452 - 458.
- _____, H. C. Tripathi, S. K. Tandan and D. K. Lal. 1998. Antiallergic activity of andrographolide **Ind. J. Pharm. Sci.** 60 : 176 - 178.
- Martin, G. G. and B.L. Graves. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. **J. Morphol.** 185 : 339 - 349.

Martin, D. P. , C. Poole, J. E. Hose, M. Arias, L. Reynolds, N. Mckrell and A. Whang. 1993. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. **J. Inver. Pathol.** 62 : 308 - 315.

Mayer, F. 1943. **The Chemistry of Natural Coloring Matters : The Constitutions, Properties and Biological Relations of The Important Natural Pigments.** Reinhold Publishing Corporation., New York.

McKay, D. and C. R. Jenkin 1970. Immunity in the invertebrates. The role of serum factors in phagocytosis of erythrocytes by haemocytes of the freshwater crayfish (*Parachanna bicarinatus*). **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.** 48 : 139 - 150.

Miquel, J. A., J. M. Bernd, J. M. Sempere, J. Diaz-Alperi and A. Ramirez. 1992. The curcuma antioxidants : Pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. **Arch. Gerontology and Geriatrics** 34 (1) : 37 - 46.

Motoh, H. 1985. **Biology and Ecology of *Penaeus monodon* Monsoon.** SEAFADDEC, Iloilo, Philippines.

Mukhopadhyay, A. , N. Basu, N. Ghatak and P. K. Gujral. 1982. Antiinflammatory and irritant activities of curcumin analogs in rats. **Agents Actions** 12 (4) : 508-815.

National Committee for Clinical Standard. 2000. **Perfromance Standards for Antimicrobial Disc Suscepribility Test.** 6th ed. Wayre, National Committee for Clinical Laboratory Standard.

Nelson, J. S. 1994. **Fishes of the World.** 3rd ed. John Wiley and Sons, Inc., New York.

- Panossian, A., A. Hovhannisyan and G. Mamikonyan. 2000. Pharmacokinetic and oral bioavailability of andrographolide from *Andrographis paniculata* fixed combination Kan Jan in rats and human. **Phytomedicine** 7 (5): 351-364.
- Persson, M., A. Vey and K. Soderhall. 1987. Encapsulation of foreign particles *in vitro* by separated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus*. **Cell. Tiss. Res.** 247 : 409 -415.
- Pick, E. and Y. Keisari. 1980. A sample colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J. Immunol. Methods.** 38 : 161 - 170.
- Pinlaor, S., N. Ma, P. Yongvanit, R. Semba and S. Oikawa. 2004. Repeated infection with *Opisthorchis viverrini* induces accumulation of 8-nitroguanine and 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanine in the bile duct of hamsters via inducible nitric oxide synthase. **Carcinogenesis** 25: 1535-1542.
- Prosser, J. I., K. Killham, L. A. Gloove and E. A. S. Rattray. 1996. Luminescence-base system for detection of bacteria in the environment. **Crit. Rev. Biotechnol.** 16 (2) : 157 - 163.
- Puri, A., R. Saxena, R. P. Saxena and K. C. Saxena. 1993. Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. **J Nat Prod** 56 (7): 995-999.
- Ranjan, D., T. D. Johnston, G. Wu, L. Elliott, S. Bondada and M. Nagabhushan. 1998a. Curcumin blocks cyclosporine A-resistant CD28 costimulatory pathway of human T-cell proliferation. **J. Surg. Res.** 77: 174-178.
- _____, A. Siquijor, T. D. Johnston, G. Wu and M. Nagabhushan. 1998b. The effect of curcumin on human B-cell immortalization by Epstein-Barr virus. **Am. Surg.** 64: 47-51.

- Ratcliffe, N. A., A. F. Rowley, S. W. Fitzgerald and C. P. Rhodes. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **Inter. Rev. Cytology** 97 : 183 - 350.
- Rao, T. S., N. Basu and H. H. Suddiqui. 1982. Anti-inflammatory activity of curcumin analogs. **Ind. J. Med. Res.** 75 : 574 - 578.
- Reddy, A. C. and B. R. Lokesh. 1994. Effect of dietary turmeric (*Curcuma longa*) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver. **Food Chem. Toxicol.** 32 (3) : 279 - 283.
- Sahm, D. F. and J. A. Washington II. 1991. Antibacterial susceptibility test: dilution method, pp. 1105 - 1116. In A. Balows, W. J. Hausler, K. L. Herrmann, H. D. Isenberg and H. Shadomy, eds. **Manual of Clinical Microbiology** 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Sambainah, K., S. Ratankumar, V. S. Kamanna, M. N. Satyanarayana and M. V. L. Rao. 1982. Influence of turmeric and curcumin on growth, blood constituents and serum enzymes in rats. **J. Food Sci. Technol.** 19 (5) : 187 - 190.
- Satoskar, R. R. and S. G. S. Shenoy. 1986. Evaluation of antiinflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patient with postoperative inflammation. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.** 24 (12) : 651 - 654.
- Shankar, T. N. B. and V. S. Murthy. 1978. Effect of turmeric (*Curcuma longa*) on the growth of some intestinal bacteria *in vitro*. **J. Food Sci. Technol.** 15 (4) : 152 - 153.
- Sharma, R. A., A. J. Gescher and W. P. Steward. 2005. Curcumin : the story so far. **Eur. J. Cancer** 42: 1955-1968.

Shoemaker, C. A., P. H. Klesius, D. Xu and R. A. Shelby. 2005. Overview of the immune system of fish. Aquaculture American Conference. Available Source :
http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=168254,
 February 25, 2007.

Sindermann, C. L. and D. V. Lightner. 1988. **Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture**. Elsevier Science, New York.

Smith, V. J. and J. R. S. Chisholm. 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. **Fish Shellfish Immun.** 2 : 1 - 31.

_____ and K. Soderhall. 1986. Cellular immune mechanism in crustacea. **Symposium of the Zoological Society of London** 56 : 59 - 79.

_____. 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. **Dev. Comp. Immunol.** 15 : 251 - 261.

Soderhall, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. **Ann. Rev. J. Fish. Dis.** 2: 3 - 23.

_____ and L. Hall. 1984. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. **Biochimica et Biophysica Acta** 797 : 99 -104.

_____ and V.J. Smith. 1986. Prophenoloxidase-activating cascade as a recognition system in arthropods, pp. 251-258. In A. P. Gupta, ed. **Hemolytic and Humoral Immunity in Arthropods**. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Srimal, R. C. and B. N. Dhawan. 1973. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory analogs in rats. **J. Pharm. Pharmacol.** 25 (6) : 447 - 452.

- Stratton, C. W. and R. C. Cooksey. 1991. Susceptibility test: special test, pp. 1153 - 1165. *In* A. Balows, W. J. Hausler, K. L. Herrmann, H. D. Isenberg and H. Shadomy, eds. **Manual of Clinical Microbiology** 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Sugiyama, Y., S. Kawakisai and T. Osawa. 1996. Involvement of β -diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. **Biochen. Pharmacol.** 52: 519-525.
- Toshiya, M., Y. Toi, H. Bando, T. Maekawa, Y. Takeda, and H. Yamaguchi. 2002. Structural identification of new curcumin dimers and their contribution to the antioxidant mechanism of curcumin. **J. Agric. Food. Chem.** 50 : 2524 - 2530.
- Tripathi, R. M. and S. S. Gupta. 1973. Anti-trypsin and antihyaluronidase activity of the volatile oil of *Curcuma longa* (Haldi). **Ind. J. Pharmacol.** 5 : 260 - 261.
- Trividi, N. P. and V. M. Rawel. 2001. Hepatoprotective and antioxidant property of *Andrographis paniculata* (Nees) in BHC induced liver damage in mice. **Indian. J. Exp. Biol.** 39 (1): 41-46.
- Uechi, S., Y. Ishimine and F. Hongo. 2000. Antibacterial activity of essential oil derived from *Curcuma* sp. (Zingiberaceae) against food-borne pathogenic bacteria and their thermal stability. **Ryukyu Daigaku Nogakubu Gakujutsu Hokoku** 47 : 129 - 136.
- Vargas-Albores, F. 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular response. **J. Mar. Biotechnol.** 3: 153 - 156.
- Von, J., B. Lutomski and W. D. Kedzia. 1974. Effect of an alcohol extract an active ingredients from *Curcuma longa* on bacteria and fungi. **Plant Medica** 26: 9-19.

Wang, Y., Z. Lu, H. Wu and F. Lv. 2009. Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens. **International J. of Food Microbiology** 136: 71-74.

Wongseri, V. and P. Siripong. 1995. Antibacterial activity of curcuminoid compounds from *Curcuma zedoaria* Roscoe rhizome. **Thai Cancer J.** 21(1) : 17 - 24.

Wright, J. S. 2002. Predicting the antioxidant activity of curcumin and curcuminoids. **J. Mol. Str. (Theochem)** 591: 207-217.

Yadav, V. S., K. P. Mishra, D. P. Singh, S. Mehrotra and V. K. Singh. 2005. Immunomodulatory effects of curcumin.. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.** 27: 485-497.

Yegnanarayan, R., A. P. Saraf and J. H. Balwani. 1976. Comparison of antiinflammatory activity of arious extracts of *Curcuma longa* (Linn). **Ibid** 64 (4) : 601 - 608.





ตารางผนวกที่ ก1 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำหลังจากเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันเป็นเวลา 30 วัน

Treatment	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำ (กรัม)	
	เริ่มทดลอง	ระยะเวลา 30 วัน
Control	12.667 ± 0.577 ^a	16.167 ± 1.414 ^a
12.5 ppm	12.333 ± 1.527 ^a	16.444 ± 2.219 ^a
25 ppm	11.000 ± 1.054 ^a	15.333 ± 2.556 ^a
50 ppm	12.000 ± 1.500 ^a	16.556 ± 0.739 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวดิ่ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ ก2 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวหลังจากเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันเป็นเวลา 30 วัน

Treatment	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาว (กรัม)	
	เริ่มทดลอง	ระยะเวลา 30 วัน
Control	13.000 ± 0.901 ^a	17.889 ± 1.119 ^a
12.5 ppm	13.056 ± 0.419 ^a	19.139 ± 5.655 ^a
25 ppm	11.500 ± 1.184 ^a	17.667 ± 2.726 ^a
50 ppm	11.778 ± 1.377 ^a	18.083 ± 1.375 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวดิ่ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ ก3 น้ำหนักเฉลี่ยของปลานิลหลังจากเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันเป็นเวลา 30 วัน

Treatment	น้ำหนักเฉลี่ยของปลานิล (กรัม)	
	เริ่มทดลอง	ระยะเวลา 30 วัน
Control	64.167 ± 14.808 ^a	83.333 ± 6.6667 ^a
5 ppm	59.583 ± 7.324 ^a	90.694 ± 3.640 ^{ab}
10 ppm	74.583 ± 10.631 ^a	104.661 ± 14.158 ^b
20 ppm	65.556 ± 5.0917 ^a	96.944 ± 6.684 ^{ab}
40 ppm	72.222 ± 13.471 ^a	99.444 ± 5.853 ^{ab}
80 ppm	64.028 ± 2.5115 ^a	95.000 ± 13.229 ^{ab}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ ก4 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำหลังจากเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรเป็นเวลา 30 วัน

Treatment	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำ (กรัม)	
	เริ่มทดลอง	ระยะเวลา 30 วัน
Control	11.667 ± 2.309 ^a	15.000 ± 2.000 ^a
30 ppm	12.333 ± 3.055 ^a	17.000 ± 1.000 ^a
62.5 ppm	12.000 ± 1.000 ^a	16.444 ± 0.509 ^a
125 ppm	13.000 ± 1.732 ^a	15.667 ± 1.527 ^a
250 ppm	12.000 ± 2.646 ^a	15.222 ± 1.018 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ ๓5 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวหลังจากเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร
เป็นเวลา 30 วัน

Treatment	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาว (กรัม)	
	เริ่มทดลอง	ระยะเวลา 30 วัน
Control	11.751 ± 1.245 ^a	13.111 ± 2.834 ^a
30 ppm	13.840 ± 1.886 ^a	16.278 ± 1.751 ^{ab}
62.5 ppm	14.063 ± 1.223 ^a	19.333 ± 2.848 ^b
125 ppm	13.880 ± 1.002 ^a	17.889 ± 2.524 ^b
250 ppm	13.920 ± 1.355 ^a	18.000 ± 0.866 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวดิ่ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ ๓6 น้ำหนักเฉลี่ยของปลานิลหลังจากเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร
เป็นเวลา 30 วัน

Treatment	น้ำหนักเฉลี่ยของปลานิล (กรัม)	
	เริ่มทดลอง	ระยะเวลา 30 วัน
Control	66.111 ± 9.766 ^a	117.778 ± 16.777 ^a
5 ppm	69.167 ± 8.780 ^a	107.222 ± 19.317 ^a
10 ppm	79.444 ± 6.0491 ^a	126.111 ± 7.876 ^a
20 ppm	71.994 ± 12.583 ^a	107.222 ± 29.643 ^a
40 ppm	79.667 ± 3.383 ^a	111.667 ± 10.138 ^a
80 ppm	71.994 ± 5.023 ^a	121.806 ± 11.429 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวดิ่ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
($P < 0.05$)



ภาคผนวก ข
สารเคมีและขั้นตอนต่างๆ

สารเคมีและขั้นตอนต่าง ๆ

อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด K-199

1. วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด K-199

1.1 M-199

อาหารเลี้ยงเซลล์ Medium-199 1 ซอง + NaHCO_3 2.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร

1.2 Salt mixture ประกอบด้วย

- KCl	0.4 กรัม
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.3 กรัม
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.0 กรัม
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05 กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.3 NaCl

ละลาย NaCl 11 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.4 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

ละลาย $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.9 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.5 L-glutamin

L-glutamin 0.015 กรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด

0.22 μm

2. อาหารเลี้ยงเซลล์ K-199 จำนวน 100 มิลลิลิตร

2.1 ผสมสารละลายตามลำดับ ดังนี้

- M-199	50 มิลลิลิตร
- salt mixture	10 มิลลิลิตร
- NaCl	10 มิลลิลิตร
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 มิลลิลิตร
- L-glutamine	1 มิลลิลิตร
- Hepes	0.238 กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

2.2 ปรับ pH ด้วย HCl หรือ NaOH ให้อยู่ในช่วง 7.3-7.6

สารเคมีในการวิเคราะห์ Phenoloxidase activity

1. การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ Phenoloxidase activity

1.1 สารละลาย cacodylate buffer pH 7.4

ผสมสารละลาย 0.2 M Sodium cacodylate ปริมาณ 50 มิลลิลิตร สารละลาย 0.2 M HCl ปริมาณ 2.7 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 47.3 มิลลิลิตร

1.2 L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)

L-dihydroxyphenylalanine 4 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

1.3 สารละลายทริปซิน

เตรียมจาก 0.1% ทริปซินใน cacodylate buffer

สารเคมีในการวิเคราะห์โปรตีน

1. reagent a

เตรียมจาก 2 % weight / Volume Na_2CO_3 ละลายใน 0.1 M NaOH

2. reagent b

เตรียมจาก 0.5% CuSO_4 ละลายใน 1% Potassium tartrate

3. reagent c

เตรียมจาก reagent a 50 มิลลิลิตร รวมกับ reagent b 1 มิลลิลิตร

4. reagent d

เตรียมจาก Folin 1 ส่วน ผสมกับน้ำ 2 ส่วน

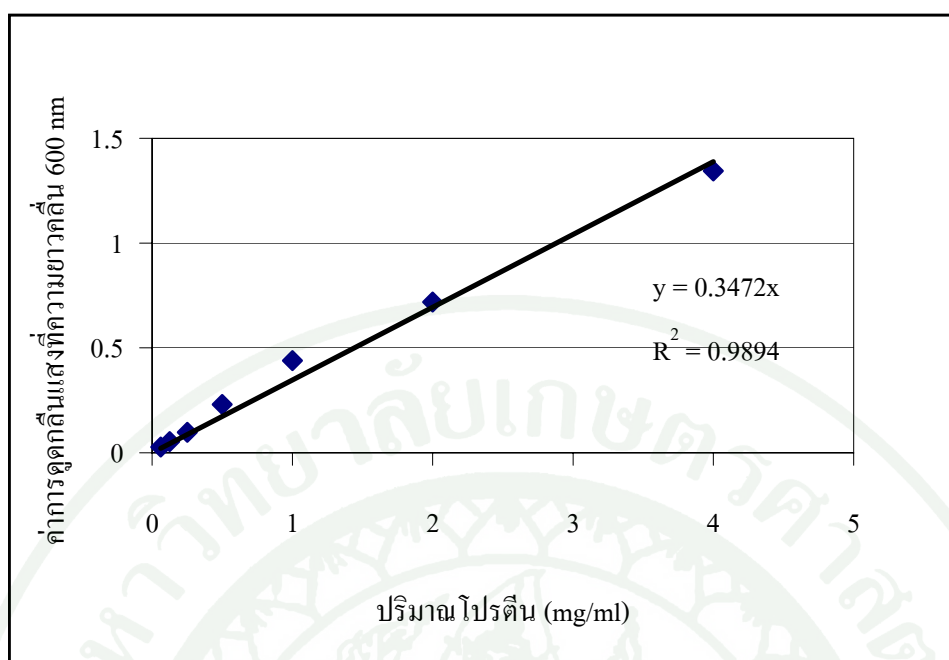
การคำนวณปริมาณเม็ดเลือด (total hemocytes count)

$$\begin{aligned}
 \text{ปริมาตรของ Hemacytometer} &= \text{กว้าง} \times \text{ยาว} \times \text{สูง} \\
 &= 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} \\
 &= 0.1 \text{ mm}^3 \\
 \text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือด} / \text{mm}^3 &= \text{เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้} \\
 \text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือด} / \text{ml}^3 &= \text{เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้} \times 10^4 \times \text{ค่า dilution}
 \end{aligned}$$

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase

กำหนดให้ ค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลง 0.001 = 1 unit

$$\text{phenoloxidase activity} = \text{unit/min/mg Protein}$$



ภาพผนวกที่ ข1 มาตรฐาน โปรตีน (Bovine Serum Albumin) โดยวิธี Lowry (1951)

การคำนวณ percent phagocytosis

$$\text{percent phagocytosis} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่จับกินยีสต์} \times 100}{\text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด}}$$

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวกิตติมา วานิชกุล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 12 กุมภาพันธ์ 2522
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วท.ม. (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนผู้ช่วยสอนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2550)