

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ

- 1.1 เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer (Elmer-Perkin Model. Lambda 15)
- 1.2 เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศ (Rotary Evaporator)
- 1.3 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (1.8×90 เซนติเมตร)
- 1.4 เครื่องอบแห้งแบบลมร้อน (Tray Dryer)
- 1.5 เครื่องบด (Grinder Machine Model. HL-22)
- 1.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Clifton)
- 1.7 ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Incubator oven, Kottermann®2738)
- 1.8 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker Series 25, New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison, New Jersey. U.S.A.)
- 1.9 เครื่องเขย่า (Vortex)
- 1.10 เครื่องแก้วและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์
- 1.11 ตู้ปลอดเชื้อรุ่น NU-440-400E (Laminar flow : Nuair)
- 1.12 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH meter)
- 1.13 ตู้กระจกขนาด 30×40×50 เซนติเมตร
- 1.14 เครื่องให้อากาศพร้อมสายยางและหัวทราย

2. วัสดุทดลอง

2.1 สมุนไพร ซื้อจากร้านขายยาสมุนไพรและตลาดสดเทศบาล อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

- 2.1.1 ใบกระวาน (*Amomum krervanh*, Bay leave)
- 2.1.2 ฟ้าทล (*Zingiber cassumunar* Roxb.)
- 2.1.3 กวาวเครือ (*Pueraria mirifica*, Kwao khreu)

- 2.1.4 ฝางเสน (*Caesalpinia sappan* Linn., Sappan wood)
- 2.1.5 แก่นขนุน (*Artocarpus heterophyllus* Lam., jackfruit heartwood)
- 2.1.6 ดีปลี (*Piper retrofractum* Vahl., indian long pepper)
- 2.1.7 พิษนาคี (*Artemisia indica* Willd.)
- 2.1.8 พญาขอ (*Clinacanthus natans*, Acanthaceae)
- 2.1.9 ชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra*, Spanishlicorica)
- 2.1.10 พิลังกาสา (*Ardisia polycephala* Wall.)
- 2.1.11 ลูกสลอด (*Croton tiglium* Linn., Purgion Croton)
- 2.1.12 เทียนขาว (*Impatiens balsamina* Linn., Garden balsam)
- 2.1.13 ต้นเลี้ยว (*Bauhinia malabarica* Roxb.)
- 2.1.14 สาบเสือ (*Eupatorium odoratum*)
- 2.1.15 ดอกจันทน์เทศ (*Myristica fragrans* houtt., Nutmeg tree)
- 2.1.16 ใบมะขามแขก (*Cassia angustifolia* Vahl., India senna)
- 2.1.17 ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* Kurz.)
- 2.1.18 ระย้อม (*Rauwolfia serpentina* Benth.)
- 2.1.19 สมอไทย (*Terminalia chebula* Retz., Myrobalan tree)
- 2.1.20 หญ้าเหี่ยวหมู (*Cyrtus rotundus* Linn., Nut grass)
- 2.1.21 เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* Linn., Rose-Coloured Leadwort)
- 2.1.22 ฝอยทอง (*Cuscuta chinensis* Lam., Dodder)
- 2.1.23 ใบหม่อน (*Camellia sinensis*., White Muberry)
- 2.1.24 ใบแค (*Sesbania grandiflora*, Sesbania)
- 2.1.25 ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*, Egg woman)
- 2.1.26 บานไม่รู้โรย (*Gomphrena globosa* L., Everlasting)
- 2.1.27 หญ้าหนวดแมว (*Orthosiphon aristatus* Miq., Java tea)
- 2.1.28 ลูกกระวาน (*Elettaria cardamomum* White et Mason, Cardamom)
- 2.1.29 ดอกคำฝอย (*Carthamus tinctorius* L., Safflower)
- 2.1.30 มะตูม (*Aegle marmelos* L., Bale Fruit)
- 2.1.31 ใบพลู (*Piper betle* L., Betle leave)

3. สารเคมี

- 3.1 เมทิลแอลกอฮอล์ 99% (methyl alcohol, CH_3OH) บริษัท LAB - SCAN
- 3.2 เอทิลแอลกอฮอล์ 95% (ethyl alcohol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) บริษัท LAB - SCAN
- 3.3 คลอโรฟอร์ม (chloroform, CHCl_3) บริษัท LAB - SCAN
- 3.4 เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate, $\text{CH}_3\text{CHOCH}_3$) บริษัท LAB - SCAN
- 3.5 เฮกเซน (hexane, C_6H_{14}) บริษัท LAB - SCAN
- 3.6 ซิลิกาเจล จี 60 (Kieselgel 60) บริษัท Fluka
- 3.7 กรดแทนนิกบริสุทธิ์ (pure tannic acid, $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$) บริษัท Sigma - Aldrich

4. เชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งด้วยสารสกัดสมุนไพรคือ *Vibrio* spp. ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ได้แก่

4.1 เชื้อ *Vibrio harveyi* 01, *V. harveyi* 03, *V. harveyi* 04, *V. harveyi* 05, *V. harveyi* 06, *V. parahaemolyticus* 01 และ *V. alginolyticus* 02 ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2 เชื้อ *V. harveyi* 02 *V. parahaemolyticus* 02 และ *V. alginolyticus* 01 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง

วิธีการทดลอง

1. การคัดเลือกสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp.

1.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำสมุนไพรมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก และนำไปอบแห้งในตู้อบแห้งแบบลมร้อน ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสมุนไพรที่ผ่านการอบแห้ง

ไปบดให้มีขนาดเล็กด้วยเครื่องบด ร่อนผ่านตะแกรงเหล็ก ชั่งน้ำหนัก เก็บใส่ถุงพลาสติกปิดผนึก และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 การเตรียมสารสกัดหยาบจากสมุนไพรมะนาว

นำสมุนไพรมะนาวจากข้อ (1.1) 25 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ใส่ลงในขวดขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำเกลือแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร (Ibrahim and Osman, 1995) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 4) และนำสารสกัดที่ได้ไประเหยเอทิลแอลกอฮอล์ออกให้หมดด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ โดยใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร คำนวณความเข้มข้นดังกล่าวจากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยเมมเบรน (Millipore) ขนาด 0.45 ไมครอน เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรมะนาวในการยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp.

1.1 การเพาะเลี้ยง *Vibrio* spp.

เลี้ยง *Vibrio* spp. ในอาหาร nutrient broth ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับทดสอบสารสกัดหยาบสมุนไพรมะนาวในการยับยั้งการเติบโต *Vibrio* spp. และเลี้ยง *Vibrio* spp. ในอาหารแข็งบนอาหาร Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Sung *et al.*, 2001) เพื่อตรวจสอบลักษณะโคโลนีของเชื้อก่อนเก็บรักษาเชื้อเพื่อทำ stock culture (ภาคผนวก ก)

1.2 การทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรมะนาวในการยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp.

การทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรมะนาวในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย ทำโดยการประยุกต์วิธี well assay (Rauha *et al.*, 2000) โดยเตรียมแบคทีเรียทดสอบในอาหาร nutrient broth ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำมาทดสอบ นำเชื้อที่เตรียมได้ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมในอาหาร

nutrient agar ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ให้มีปริมาณแบคทีเรียทดสอบที่ผสมในอาหาร ประมาณ 10^6 cfu/ml โดยอาหารมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันและเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Baydar *et al.*, 2003) หลังจากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เติมสารสกัดเข้มข้นที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมครอน (Okeke *et al.*, 2001) 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ตรวจผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ซึ่งรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมด้วย

2. การหาความเข้มข้นต่ำสุด (Minimun Inhibitory Concentrations; MICs) ของสารสกัดสมุนไพรที่ยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. โดยวิธี well assay

จากผลการทดลองข้อที่ 1 จะเลือกสมุนไพรที่สามารถยับยั้ง *Vibrio* spp. มากกว่า 5 สายพันธุ์ ทดสอบความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเติบโตของ *V. harveyi* 02 โดยละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1.25, 2.50, 5.00, 10, 20.0, 40.0 และ 80.0 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร) โดยวิธี well assay โดยกำหนดให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^6 cfu/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีการข้อ 1.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone)

3. การหาความเข้มข้นต่ำสุด (Minimun Inhibitory Concentrations ; MICs) ของสารสกัดสมุนไพรที่ยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. โดยวิธี broth dilution

นำสารสกัดสมุนไพรมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของ *V. harveyi* 02 โดยทำการทดสอบในอาหาร nutrient broth ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยการเตรียมสารสกัดสมุนไพรให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.001, 0.002, 0.005, 0.010, 0.020, 0.039, 0.078, 0.156, 0.313, 0.625, 1.250, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร) เมื่อผสมลงไปในอาหาร nutrient broth ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นที่กำหนดไว้ จากนั้นเติมเชื้อให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^4 และ 10^6 cfu/ml ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อทุกๆ 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง มานับปริมาณ *V. harveyi* 02 โดยใช้วิธี spread plate บนอาหาร nutrient agar ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์

4. การศึกษาสารประกอบสำคัญของสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp.

4.1 การศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายต่อสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Vibrio* spp.

สกัดสารจากสมุนไพรอบแห้ง 10 กรัม ด้วยตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตรโดยใช้หลักการเลือกตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (non-polar) สำหรับแยกสารที่ไม่มีขั้วออกมาก่อนแล้วจึงใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วเพิ่มขึ้นตามลำดับเพื่อแยกสารที่มีขั้วเพิ่มขึ้น ซึ่งตัวทำละลายได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท เมทิลแอลกอฮอล์ และน้ำ ตามลำดับ ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดมากรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 4) จากนั้นระเหยแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเก็บสารสกัดหยาบสมุนไพรในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารสกัดหยาบสมุนไพรมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. โดยใช้วิธี well assay จากข้อ 1.2

4.2 การแยกสารประกอบสำคัญของสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดคอลัมน์

นำสารสกัด 10 มิลลิลิตร จากข้อ 4.1 ผสมกับผงซิลิกาเจล 10 กรัม ตั้งทิ้งไว้สักครู่เพื่อเตรียมนำไปแยกสารโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดคอลัมน์

เตรียมคอลัมน์แก้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.8 เซนติเมตร สูง 90 เซนติเมตร ใส่สำลีลงไปทางด้านล่างของคอลัมน์ เติมผงซิลิกาเจล 70 กรัม ที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นใน desicator จากนั้นผสมซิลิกาเจลกับเฮกเซนแล้วเทลงในคอลัมน์โดยไม่ให้มีฟองอากาศ ปิดด้านบนด้วยสำลี แล้วจึงเติมสารสกัดที่ผสมกับซิลิกาเจลด้านบนของคอลัมน์แล้วปิดด้วยสำลีอีกครั้ง เติมตัวทำละลายดังต่อไปนี้ลงไปลงในคอลัมน์ตามสภาพมีขั้วจากน้อยไปมาก ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท เมทิลแอลกอฮอล์ และน้ำ ชนิดละ 200 มิลลิลิตร ตามลำดับ ควบคุมอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่างของสารที่แยกจากคอลัมน์ครั้งละ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อหาความยาวคลื่นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียทดสอบ และนำสารสกัดที่

แยกได้แต่ละลำดับส่วนไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยวิธี well assay

4.3 การวิเคราะห์สารประกอบสำคัญของสารสกัดสมุนไพร

ทำการแยกสารสกัดจากข้อ 4.2 ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อวิเคราะห์สารประกอบสำคัญในสารสกัดสมุนไพร (ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีพลังงาน) (ภาคผนวก ข)

5. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากสมุนไพร

5.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารจากสมุนไพร

นำสมุนไพร 2 ชนิด คือ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Vibrio* spp. ที่ผ่านการอบแห้งและบดละเอียด มาทำการสกัดสารจากสมุนไพรในตัวทำละลาย ด้วยอัตราส่วนสมุนไพรแห้ง 10 กรัม ต่อตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตร ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เอทิลอะซิเตท เมทิลแอลกอฮอล์ เอทิลแอลกอฮอล์ และน้ำ โดยแปรผันอุณหภูมิในการสกัด ดังนี้ อุณหภูมิห้อง (30 ± 5 องศาเซลเซียส) 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.4) นำสารละลายส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

5.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสาร

นำสมุนไพร 2 ชนิด คือ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Vibrio* spp. ที่ผ่านการอบแห้งและบดละเอียด มาทำการสกัดสมุนไพรอบแห้งต่อตัวทำละลาย ด้วยอัตราส่วนสมุนไพรแห้ง 10 กรัม ต่อตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตร ตัวทำละลายที่ทำการทดลองได้แก่ เอทิลอะซิเตท เมทิลแอลกอฮอล์ เอทิลแอลกอฮอล์ และน้ำ และควบคุมอุณหภูมิตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 5.1 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.4) นำสารละลายส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

6. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในกึ่งกลาดำ

6.1 สัตว์ทดลอง

กึ่งกลาดำ อายุประมาณ 2 เดือน ขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 8-10 กรัมต่อตัว จากฟาร์มเลี้ยงกึ่งกลาดำ อำเภอนันทนิคม จังหวัดชลบุรี

6.2 อาหารกึ่ง

อาหารกึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 อาหารสำเร็จรูป (อาหารสำเร็จรูป CP No. 5003 พี)

กลุ่มที่ 2 อาหารผสมสารสกัดสมุนไพร สมอไทย ฝรั่งเสน ใบพลู ลูกใต้ใบ ลูกสลอด และเจตมูลเพลิง เตรียมโดยพ่นสารสกัดหยาบสมุนไพรลงบนอาหารสำเร็จรูป ในอัตราส่วนสารสกัดหยาบสมุนไพรเข้มข้นต่ออาหารสำเร็จรูป เท่ากับ 1 : 6 (มิลลิกรัมต่อกรัม) ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสมุนไพรในอาหารกึ่งเท่ากับ 16.67 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม) หลังจากนั้นนำไปผึ่งลมให้แห้ง คลุกด้วยน้ำมันปลาทูน่า และนำไปผึ่งลมให้แห้งอีกครั้ง ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ในแต่ละกลุ่มการทดลองจะให้อาหารสำเร็จรูปคิดเป็น 3 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักกึ่งกลาดำ โดยให้อาหาร 3 ครั้งต่อวัน เวลา 8.00 น. 12.00 น. และ 18.00 น.

6.3 การเตรียมแบคทีเรียก่อโรคและการทำให้กึ่งกลาดำติดโรค

เลี้ยง *V. harveyi* 02 ในอาหาร nutrient broth ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อมาวัดค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ปรับความเข้มข้นเชื้อเท่ากับ 5×10^6 cfu/ml ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ทำให้กึ่งกลาดำติดโรคโดยการแช่กึ่งในสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำกึ่งกลาดำกลับไปเลี้ยงในตู้กระจกเป็นเวลา 1 สัปดาห์

6.4 การเตรียมน้ำเค็ม

เจือจางน้ำเกลือเข้มข้นด้วยน้ำประปาให้มีความเข้มข้นประมาณ 15 ppt มาเชื่อมด้วย โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 100 ppt เติมอากาศด้วย air pump เป็นเวลา 2 วัน แล้วจึง เติมน้ำที่เตรียมได้ในตู้กระจกขนาด $30 \times 40 \times 60$ เซนติเมตร ปริมาตร 40 ลิตร เพื่อใช้เลี้ยงกุ้ง กูลาดำ จำนวน 20 ตัวต่อตู้

6.5 การแบ่งกลุ่มการทดลองเลี้ยงกุ้ง

ก่อนเริ่มการทดลองนำกุ้งกูลาดำ มาเลี้ยงรวมในบ่อพักที่มีการให้อาหารสำเร็จรูป 3 ครั้ง ต่อวัน เวลา 8.00 น. 12.00 น. และ 18.00 น. และให้อากาศตลอดเวลา เป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อปรับให้กุ้งคุ้นเคยกับสภาพที่จะทำการทดลอง

6.5.1 การทดลองเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1

การเลี้ยงกุ้งกูลาดำครั้งที่ 1 ประกอบด้วย 2 กลุ่มการทดลอง ได้แก่

กลุ่มการทดลองที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมโดยให้อาหารสำเร็จรูป ตลอดการทดลอง

- กลุ่มควบคุม (-) ให้อาหารสำเร็จรูปและไม่มีการทำให้กุ้งกูลาดำติดโรคด้วย *V. harveyi* 02 หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์
- กลุ่มควบคุม (+) ให้อาหารสำเร็จรูปและมีการทำให้กุ้งกูลาดำติดโรคด้วย *V. harveyi* 02 หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

กลุ่มการทดลองที่ 2 เป็นกลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดสมุนไพร สมอไทย ผางเสน ใบพลู ลูกใต้ใบ ลูกสลอด และเจตมูลเพลิง แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรในอาหารสำเร็จรูปเท่ากับ 16.67 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิกรัมต่อกรัม) และทำให้กุ้งกูลาดำมีการติดโรคด้วย *V. harveyi* 02 หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

6.5.2 การทดลองเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 2 ประกอบด้วย 2 กลุ่มการทดลอง ได้แก่

กลุ่มการทดลองที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมโดยให้อาหารสำเร็จรูป ตลอดการทดลอง

- กลุ่มควบคุม (-) ให้อาหารสำเร็จรูปและไม่มีการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรคด้วย *V. harveyi* 02 หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์
- กลุ่มควบคุม (+) ให้อาหารสำเร็จรูปและมีการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรคด้วย *V. harveyi* 02 หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

กลุ่มการทดลองที่ 2 เป็นกลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดสมอไทยและสารสกัดฝรั่ง กำหนดให้ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรในอาหารสำเร็จรูปเท่ากับ

- สารสกัดสมอไทยต่ออาหารสำเร็จรูป 8.34 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิลิตรต่อกรัม)
- สารสกัดสมอไทยต่ออาหารสำเร็จรูป 16.67 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิลิตรต่อกรัม)
- สารสกัดสมอไทยต่ออาหารสำเร็จรูป 33.33 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิลิตรต่อกรัม)
- สารสกัดฝรั่งต่ออาหารสำเร็จรูป 8.34 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิลิตรต่อกรัม)
- สารสกัดฝรั่งต่ออาหารสำเร็จรูป 16.67 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิลิตรต่อกรัม)
- สารสกัดฝรั่งต่ออาหารสำเร็จรูป 33.33 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิลิตรต่อกรัม)

6.6 การทำความสะอาด และการตรวจสอบบัติน้ำในตู้กระจก

6.6.1 เปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 2 วัน ซึ่งถ่ายน้ำออกในปริมาตร 50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรทั้งหมด และดูดตะกอนภายในตู้กระจก แล้วเติมน้ำใหม่ให้เท่ากับระดับเดิม

6.6.2 วัดอุณหภูมิของน้ำในตู้กระจก โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำคือ 25 - 31 องศาเซลเซียส

6.6.3 วัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของน้ำในตู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำทุกๆ วัน ที่เหมาะสมคือ

7 - 8.9

6.7 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำตู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำ

6.7.1 เก็บตัวอย่างน้ำ จากตู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำทุกสัปดาห์ใส่ภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณ *Vibrio* spp. ที่มีในน้ำโดยวิธี standard plate count ในอาหาร nutrient agar ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และอาหาร TCBS สำหรับ *Vibrio* spp.

6.7.2 เก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำในแต่ละกลุ่มในสัปดาห์สุดท้ายของการทดลองหลังจากทำให้กุ้งติดโรคด้วย *V. harveyi* 02 นำไปวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งกุลาดำ โดยนำตับกุ้งกุลาดำจำนวน 1 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ นำมาหาจำนวนเชื้อด้วยวิธี standard plate count ในอาหาร nutrient agar ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และอาหาร TCBS สำหรับ *Vibrio* spp.

6.8 การบันทึกข้อมูล

6.8.1 หากการเติบโตโดยการชั่งน้ำหนักของกุ้งกุลาดำในสัปดาห์สุดท้ายของการเลี้ยง โดยการชั่งน้ำหนักในแต่ละตู้ทดลอง แล้วนำมาหาค่าน้ำหนักเฉลี่ย

6.8.2 หากการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำโดยการนับจำนวนกุ้งที่เหลือรอดในแต่ละกลุ่มการทดลอง นำมาคำนวณหาการรอดชีวิตโดยใช้สูตร

$$\text{การรอดชีวิต (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนกุ้งกุลาดำที่เหลือรอดในแต่ละกลุ่มการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนกุ้งกุลาดำเริ่มต้นในแต่ละกลุ่มการทดลอง}}$$

7. สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน
กรุงเทพฯ

8. ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

การทดลองเริ่มต้นตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2546 ถึงเดือน กุมภาพันธ์ 2549