



## ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์)

ปริญญา

จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์

จุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาผลของสารสกัดขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ต่อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่ก่อโรคในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

Study on Effects of Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) Extract on Pathogenics *Vibrio* spp.  
in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

نامผู้วิจัย นายพรชัย สีนเจริญโกไคย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( รองศาสตราจารย์อ้ออาจ เลาหวิณี, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( รองศาสตราจารย์พัชรี สุนทรนนท์, ป.ร.ด. )

หัวหน้าภาควิชา

( รองศาสตราจารย์ปฐมพร เอมะวิศิษฐ์, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาผลของสารสกัดขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ต่อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่ก่อโรค  
ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

Study on Effects of Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) Extract on Pathogenics *Vibrio* spp.  
in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

โดย

นายพรชัย สิ้นเจริญโกไคย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์)

พ.ศ. 2552

พรชัย สันเจริญโกไคย 2552: การศึกษาผลของสารสกัดขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ต่อแบคทีเรียสกุลวิบริโอที่ก่อโรคในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์) สาขาจุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ งามอาน เลหาวิณี, Ph.D. 90 หน้า

การศึกษาผลของสารสกัดขมิ้นชันต่อแบคทีเรียสกุลวิบริโอที่ก่อโรคในกุ้งขาว พบว่าสารสกัดขมิ้นชันที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. คือสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. fluvialis* ดังนี้ 0.47, 0.47, 0.94, 0.47 3.75 และ 0.47 mg/disc ตามลำดับ และเมื่อศึกษาผลของสารสกัดขมิ้นชันต่ออัตราการรอดและอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้งขาวโดยใช้ระดับสารสกัดขมิ้นชันที่แตกต่างกัน ผลการทดลองพบว่าอัตราการรอดและคุณสมบัติของน้ำไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) แต่พบว่าเมื่อเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 7.5 และ 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม กุ้งขาวมีร้อยละของน้ำหนักที่เพิ่มต่อวันและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อตัวสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) จากการศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว พบว่าปริมาณเม็ดเลือด กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และกิจกรรมของสารต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย มีค่าเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนของสารสกัดขมิ้นชันที่เพิ่มขึ้นในการผสมอาหาร โดยมีค่าสูงที่สุดในอัตราส่วนที่ผสมอาหาร 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สำหรับการศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชัน 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ต่ออัตราการรอดของกุ้งขาวเมื่อมีการได้รับเชื้อ *V. harveyi* พบว่า กุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วน 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีอัตราการรอดตายที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ )

Pornchai Sincharoenpokai 2009: Study on Effects of Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) Extract on Pathogenics *Vibrio* spp. in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Master of Science (Veterinary Microbiology), Major Field: Veterinary Microbiology, Department of Veterinary Microbiology and Immunology. Thesis Advisor: Associate Professor Ong-ard Lawhavinit, Ph.D. 90 pages.

Effects of turmeric (*Curcuma longa* Linn.) extract on pathogenics *Vibrio* spp. in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) were investigated. The results showed that the ethanol turmeric extract was the most effective to inhibit the tested *Vibrio* spp. The MICs of the ethanol turmeric extract on *V. harveyi*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* and *V. fluvialis* was 0.47, 0.47, 0.94, 0.47, 3.75 and 0.47 mg/disc, respectively. Effects of turmeric extract on survival and growth rate of white shrimp were examined by using differential levels of turmeric extract in feed. The results showed that there was no significantly different in survival rate and water quality ( $p>0.05$ ). However, the percentage of average diary growth and weight gained were significantly higher with feed contained turmeric at 7.5 and 15 grams per kilogram of feed when compared with control ( $p<0.05$ ). Efficacy of turmeric extract as an immunostimulant for white shrimp was studied. The results showed that total hemocyte, phenoloxidase activity and bactericidal activity were increase follow with the levels of turmeric extract in feed and the highest ratio of tumeric extract was 15 g/kg of feed. It was found that the effect of turmeric extract at the ratio of 15 g/kg of feed on survival rate of white shrimp challenged with *V. harveyi* was significantly different, it was higher than the control group ( $p<0.05$ ).

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.องอาจ เลหาวินิจ ประธานกรรมการที่ปรึกษา รศ.ดร.พัชรี สุนทรนนท์ กรรมการร่วม ที่ช่วยเหลือแนะนำวิธีการและแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์ด้วยดี และขอขอบพระคุณ อาจารย์สุนันท์ พินิจเกียรติสกุล ประธานการสอบและ รศ.ดร. พงศ์ราม รามสูต ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้คำแนะนำ แก้ไข ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณนายณรงค์ อาบกิ่ง ที่ช่วยเหลือทางด้านอุปกรณ์ตลอดการวิจัยของข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณทางภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกันที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณพี่ๆ น้องๆ ที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกันทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ แนะนำ และเป็นกำลังใจให้ปฏิบัติงานสำเร็จ

สุดท้ายขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ผู้ให้กำเนิดและส่งเสริมค่าเล่าเรียนจนสำเร็จการศึกษา

พรชัย สีนเจริญโกไคย

พฤษภาคม 2552

## สารบัญ

## หน้า

|                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| สารบัญ                                                                                                                                              | (1) |
| สารบัญตาราง                                                                                                                                         | (2) |
| สารบัญภาพ                                                                                                                                           | (4) |
| คำนำ                                                                                                                                                | 1   |
| วัตถุประสงค์                                                                                                                                        | 2   |
| การตรวจเอกสาร                                                                                                                                       | 3   |
| อุปกรณ์และวิธีการ                                                                                                                                   | 28  |
| อุปกรณ์                                                                                                                                             | 28  |
| วิธีการ                                                                                                                                             | 30  |
| ผลและวิจารณ์                                                                                                                                        | 39  |
| สรุปและข้อเสนอแนะ                                                                                                                                   | 58  |
| สรุป                                                                                                                                                | 58  |
| ข้อเสนอแนะ                                                                                                                                          | 59  |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง                                                                                                                                | 60  |
| ภาคผนวก                                                                                                                                             | 77  |
| ภาคผนวก ก สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ                                                                                                                | 78  |
| ภาคผนวก ข การคำนวณปริมาณเมล็ดเลือดและการคำนวณกิจกรรมเอนไซม์<br>phenoloxidase                                                                        | 83  |
| ภาคผนวก ค การเตรียมความชุ่มมาตรฐานและความกว้างของ<br>inhibition zone เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบการทดสอบความไว<br>ต่อการถูกทำลายของเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะ | 85  |
| ภาคผนวก ง ภาพการเก็บตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาว                                                                                                         | 88  |
| ประวัติการศึกษา และการทำงาน                                                                                                                         | 90  |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่ |                                                                                                                                                                       | หน้า |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1        | สารประกอบ Curcumin และอนุพันธ์ของขมิ้นชัน ( <i>Curcuma longa</i> L.) และการออกฤทธิ์                                                                                   | 8    |
| 2        | ประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Vibrio</i> spp. โดยวิธี Kirby-Bauer test                                                                 | 40   |
| 3        | ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และเฮกเซนในการยับยั้ง <i>Vibrio</i> spp. โดยวิธี Agar disc diffusion                                   | 41   |
| 4        | จำนวนกุ้งที่เหี่ยวรอดและอัตราการรอดของลูกกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน                                                          | 43   |
| 5        | น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวและน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของกุ้งขาวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกันเป็นเวลา 9 สัปดาห์ | 45   |
| 6        | ร้อยละของน้ำหนักที่เพิ่มต่อวันของลูกกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน                                                               | 47   |
| 7        | อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของลูกกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน                                                                | 48   |
| 8        | คุณสมบัติของน้ำในการเลี้ยงลูกกุ้งขาวด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน                                                                               | 50   |
| 9        | ปริมาณเม็ดเลือดรวมของลูกกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 9 สัปดาห์                                                   | 51   |
| 10       | กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (unit/min/mg protein) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน                                     | 53   |
| 11       | ค่ากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย <i>Vibrio</i> spp. ของเลือดกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน                                     | 54   |
| 12       | อัตราการรอดของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันระดับ 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 9 สัปดาห์ หลังได้รับเชื้อ <i>V. harveyi</i>                     | 56   |

## สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางผนวกที่ |                                                                                                         | หน้า |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ค1           | การเตรียมความชุ่มมาตรฐาน (Mc. Farland Standards)                                                        | 86   |
| ค2           | ความกว้างของ inhibition zone เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบการทดสอบความไวต่อการถูกทำลายของเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะ | 87   |



## สารบัญภาพ

| ภาพที่                                                                                                                                                                                | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1      ลักษณะของต้นขมิ้นชัน                                                                                                                                                           | 5    |
| 2      ลักษณะของเหง้าขมิ้นชัน                                                                                                                                                         | 5    |
| 3      ลักษณะของ hyaline cells ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด                                                                                                            | 18   |
| 4      ลักษณะ semi-granular cell ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด                                                                                                          | 19   |
| 5      ลักษณะ granular cell ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด                                                                                                               | 19   |
| 6      ลักษณะเมื่อดูดของกุ่มทั้ง 3 ชนิด ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง                                                                                                               | 20   |
| 7      การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>V. cholerae</i> โดยสารสกัดขมิ้นชัน                                                                                                               | 39   |
| 8      ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และ<br>เฮกเซนในการยับยั้ง <i>Vibrio</i> spp. โดยวิธี Agar disc diffusion                                   | 42   |
| 9      อัตราการรอดของลูกกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่<br>แตกต่างกัน                                                                                       | 44   |
| 10      น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวและน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของกุ้งขาวเมื่อสิ้นสุดการ<br>ทดลอง เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน<br>เป็นเวลา 9 สัปดาห์ | 46   |
| 11      ร้อยละของน้ำหนักที่เพิ่มต่อวันของลูกกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด<br>ขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน                                                                   | 47   |
| 12      อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของลูกกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัด<br>ขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน                                                                    | 49   |
| 13      ปริมาณเมื่อดูดของลูกกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันใน<br>อัตราส่วนที่แตกต่างกัน                                                                              | 52   |
| 14      กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (unit/min/mg protein) ของกุ้งขาวที่ได้รับ<br>อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน                                         | 53   |
| 15      ค่ากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย <i>Vibrio</i> spp. ของเลือดกุ้งขาวที่ได้รับอาหาร<br>สำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน                                         | 55   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

### ภาพที่

### หน้า

|    |                                                                                                                                                   |    |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 16 | อัตราการรอดของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันระดับ 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 9 สัปดาห์ หลังได้รับเชื้อ <i>V. harveyi</i> | 56 |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### ภาพผนวกที่

|    |                                               |    |
|----|-----------------------------------------------|----|
| ง1 | การเก็บตัวอย่างเลือดจากบริเวณ ventral sinus   | 89 |
| ง2 | ตัวอย่างน้ำเลือดที่อยู่ในสารป้องกันการแข็งตัว | 89 |

## การศึกษาผลของสารสกัดขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ต่อแบคทีเรียสกุลวibriโอที่ก่อโรคในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

### Study on effects of Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) Extract on Pathogenics

#### *Vibrio* spp. in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

#### คำนำ

ความสำคัญของการใช้สมุนไพร ซึ่งเป็นภูมิปัญญาไทยที่สะสมมาแต่อดีตกาลเป็นสิ่งที่ชาวโลกให้ความสนใจอย่างมาก ในการนำมาใช้ทดแทนสารเคมีและสารปฏิชีวนะที่มีผลข้างเคียงต่อสุขภาพ การศึกษาวิจัยและพัฒนาสมุนไพรของไทยเพื่อนำมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์จะช่วยส่งเสริมศักยภาพในการแข่งขันสินค้าอาหารส่งออกของไทยให้สามารถต่อสู้กับคู่แข่งได้มากขึ้น โดยเฉพาะประเทศคู่ค้าที่มีนโยบายเข้มงวดเรื่องการตรวจสอบสารตกค้างจะได้หมดความกังวลใจ ดังนั้นถ้าการเลี้ยงกุ้งไทยไม่ใช้สารต้องห้ามที่มีอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค แต่เปลี่ยนมาใช้พืชสมุนไพรที่ปลอดภัยแทน มูลค่าการส่งออกกุ้งไทยกว่าแสนล้านบาทก็จะคงอยู่ เพื่อเสริมสร้างการพัฒนาที่ยั่งยืนของประเทศไทย ความหลากหลายของพืชสมุนไพรไทยหลายชนิด เช่น ฟ้าทะลายโจร ขมิ้นชัน และไพลที่มีการใช้กันอยู่ ได้พิสูจน์ในเชิงปฏิบัติอยู่แล้วในชีวิตประจำวันทั้งเรื่องสุขภาพของคนและสัตว์ แต่การศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์เพื่อหาคำอธิบายและเหตุผล เพื่อนำมาพัฒนายังมีอยู่น้อย โดยเฉพาะทางด้านสัตว์น้ำและอาหารจากสัตว์น้ำ ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาอย่างต่อเนื่องจะเป็นการสร้างยุทธศาสตร์การพัฒนาทุนทางสังคม แก้ไขปัญหาความยากจน และยกระดับคุณภาพชีวิตของผู้บริโภค

การใช้สารเคมีในการเลี้ยงสัตว์น้ำพบว่ามีหลายชนิด และหลายวัตถุประสงค์ ส่วนใหญ่ใช้เพื่อการป้องกันรักษาเพิ่มความแข็งแรง เสริมสร้างสุขภาพ และภูมิคุ้มกัน ให้กับสัตว์น้ำ การใช้สมุนไพรเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถช่วยให้สัตว์น้ำมีสุขภาพดี การใช้สมุนไพรในการกำจัดเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำมีการศึกษากันน้อยมาก ดังนั้นการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้สารสกัดขมิ้นชันในการทำลายเชื้อแบคทีเรียสกุลวibriโอที่ก่อโรคในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) และศึกษาเปรียบเทียบอัตราการรอด อัตราการเจริญเติบโต และระดับภูมิคุ้มกันของลูกกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับสารสกัดจากขมิ้นชันผสมอาหารในอัตราส่วนที่ต่างกัน เพื่อเป็นแนวทางเบื้องต้นให้แก่เกษตรกรนำไปพิจารณาประยุกต์ใช้ต่อไป

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่ก่อโรคในกุ้งขาวของสารสกัดขมิ้นชัน
2. เพื่อศึกษาปริมาณสารที่น้อยที่สุดของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่ก่อโรคในกุ้งขาว
3. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบอัตราการรอด อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งขาว ที่เลี้ยงด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันผสมอาหารในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน
4. เพื่อศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของลูกกุ้งขาว ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน
5. เพื่อศึกษาด้านทานของกุ้งขาวเมื่อได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยการเลี้ยงด้วยสารสกัดขมิ้นชัน

## การตรวจเอกสาร

ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 ประเทศในกลุ่มยุโรปห้ามใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตโดยเว้นใช้ในการรักษาสัตว์ รวมทั้งประเทศญี่ปุ่นห้ามนำเข้าเนื้อสัตว์ที่มียาปฏิชีวนะตกค้าง ดังนั้นถ้าประเทศไทยจะส่งเนื้อสัตว์ไปขายในประเทศยุโรปและญี่ปุ่น อาจจำเป็นต้องเลิกใช้ยาปฏิชีวนะแล้วเปลี่ยนมาใช้สารสมุนไพรแทน (ยุทธนา, ม.ป.ป.) การใช้สมุนไพรจะเป็นการพึ่งตนเองมากที่สุดสำหรับประเทศไทย เป็นการลดการเสียเปรียบดุลการค้า และยังสร้างความมั่นคงในการเลี้ยงสัตว์ให้กับเกษตรกรประเทศไทยด้วย

## ขมิ้นชัน

ขมิ้นชัน เป็นพืชที่รู้จักอย่างแพร่หลาย ใช้เป็นสารแต่งสี และใช้เป็นยาสมุนไพรในประเทศแถบเอเชีย ได้แก่ อินเดีย อินโดนีเซีย จีน มาเลเซีย เป็นต้น สำหรับในประเทศไทยการใช้ขมิ้นชันในชีวิตประจำวันนิยมใช้เหง้าขมิ้นเป็นเครื่องเทศ แต่งกลิ่นและรสชาติของอาหารหลายชนิดโดยเฉพาะอาหารทางภาคใต้ของไทย เช่น แกงเหลือง แกงไตปลา แกงกะหรี่ ไก่ทอดขมิ้น ข้าวหมกไก่ ขนมเบื้องญวน เนย ผงมัสคาร์ด เป็นต้น นอกจากนี้ใช้เป็นยาภายนอกช่วยสมานแผล ดังเช่นเวลาบวชพระนิยมใช้ขมิ้นทาหน้างศิระเพื่อป้องกันการเกิดบาดแผล ใช้รักษาพิษแมลงสัตว์กัดต่อย และยังเป็นเครื่องสำอางอีกด้วย (สุภาภรณ์, 2544) ปัจจุบันประเทศไทยปลูกขมิ้นชันส่งขายเป็นสินค้าส่งออก โดยเฉพาะประเทศญี่ปุ่นสั่งซื้อขมิ้นชันจากประเทศไทยจำนวนมาก เนื่องจากผลงานวิจัยของประเทศญี่ปุ่นได้ผลสรุปว่าขมิ้นชันสามารถป้องกันอันตรายของสารเคมีต่อตัวได้ ส่งผลให้การส่งออกของขมิ้นชันสูงขึ้น สำหรับการส่งออกขมิ้นชันและการใช้ขมิ้นชันในประเทศผ่านทางร้านขายยาในปี 2544 มีมูลค่า 4,618,389 บาท และ 17,861,472 บาท ตามลำดับ ขมิ้นชันจึงถือเป็นสมุนไพรนำร่องชนิดหนึ่ง เนื่องจากได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย มีการปลูกทุกภาคของประเทศ และขมิ้นชันที่ปลูกในภาคใต้โดยเฉพาะในจังหวัดสุราษฎร์ธานีเป็นขมิ้นชันที่มีคุณภาพที่ดีที่สุดของประเทศ เนื่องจากมีน้ำมันหอมระเหยและสารเคอร์คูมิน (Curcumin) สูงมาก (อาทร, 2545) และปัจจุบันขมิ้นชันแคปซูลได้ขึ้นทะเบียนบัญชียาหลักแห่งชาติ และเป็นยาสาธารณสุขมูลฐานอีกด้วย (สุภาภรณ์, 2544)

## 1. อนุกรมวิธานของขมิ้นชัน

|                                       |                                                                                                                                 |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ชื่อไทย                               | ขมิ้นชัน                                                                                                                        |
| ชื่อพื้นเมืองอื่นๆ                    | ขมิ้น ขมิ้นแกง ขมิ้นทอง ขมิ้นดี ขมิ้นแดง ขมิ้นหยวก ขมิ้นหัว (เชียงใหม่) ขมิ้น หมิ้น (ภาคใต้) ตายอ (กำแพงเพชร) สะยอ (แม่ฮ่องสอน) |
| ชื่อภาษาอังกฤษ                        | Turmeric, Curcuma, Yellow root                                                                                                  |
| ชื่อวิทยาศาสตร์                       | <i>Curcuma longa</i> Linn.                                                                                                      |
| ชื่อพ้อง                              | <i>Curcuma domestica</i> Valetton                                                                                               |
| วงศ์                                  | Zingiberaceae                                                                                                                   |
| (วันดี, 2538; นันทวัน และ อรุณ, 2539) |                                                                                                                                 |

## 2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นพืชล้มลุก มีอายุหลายปี สูง 30-90 เซนติเมตร ส่วนเหนือดินเป็นก้านใบหุ้มซ้อนกัน ใบมีขนาดใหญ่ ซ้อนทับกัน รูปใบเป็นรูปหอกคล้ายใบพุทธรักษา กว้าง 12-15 เซนติเมตร ยาว 30-40 เซนติเมตร ท้องใบไม่มีขน ใบประดับสีเขียวอ่อนหรือสีขาว ดอกออกเป็นช่อ ก้านช่อดอกยาว แหว่งออกจากเหง้าแทรกขึ้นมาระหว่างก้านใบ มีกลีบดอกมีสีเหลืองอ่อน บานครั้งละ 3-4 ดอก ผลมีรูปกลมมี 3 พู หน้าแล้งขมิ้นจะลงหัว ต้นและใบบนดินแห้ง (ภาพที่ 1) ส่วนอยู่ใต้ดินแบ่งเป็น 2 ส่วน คือส่วนหัวและส่วนรูปไข่เรียกว่าเหง้า เหง้ามีสีเหลืองอมส้ม มีแขนงเป็นรูปทรงกระบอกแตกออกสองข้าง (ภาพที่ 2) (วันดี, 2537; พร้อมจิต และคณะ, 2542)



ภาพที่ 1 ลักษณะของต้นขมิ้นชัน

ที่มา: องค์การเภสัชกรรม (2542)



ภาพที่ 2 ลักษณะของเหง้าขมิ้นชัน

ที่มา: ลาปางรักย์สมุนไพร (2550)

### 3. ส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์

เหง้าแห้งและเหง้าสดรวมทั้งใบ เป็นส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์ (วันดี, 2537) โดยมีอายุที่เก็บเกี่ยวได้คือ 9-10 เดือน (วันดี, 2538)

องค์ประกอบที่พบส่วนใหญ่เป็นแป้ง และเชื้อใยแต่ปริมาณเล็กน้อยขึ้นอยู่กับการเพาะปลูก และอายุการเก็บเกี่ยว โดยแป้งจะมีอยู่ประมาณร้อยละ 40-50 ของน้ำหนักแห้งและองค์ประกอบที่สำคัญคือรงควัตถุที่ให้สีเหลืองได้แก่สารประกอบเคอร์คิวมินอยด์ และน้ำมันหอมระเหย (กานดา, 2540; Govindarajan, 1980)

### 4. สารเคมีที่พบในเหง้าขมิ้นชัน

สารเคมีที่พบในรากและเหง้าของขมิ้นชันมีจำนวนมาก สารเคมีที่พบได้แก่ Curcumin, Bis-demethoxycurcumin, Demethoxycurcumin, Bisabolene,  $\alpha$ -Atlantone,  $\gamma$ -Atlantone, Borneol, Campesterol, Cholesterol, 1,8 - Cineole, Curlone, p-Cymene, Saturated and unsaturated fatty acid, Guaiacol, Bis-p-hydroxy-cinnamoyl methane, Di-p-coumarol methane, Diferuloyl methane, Feruloyl-p-coumaroyl methane, Hydroxy-cinnamoyl-feruloyl methane,  $\alpha$ -Phellandrene, Sabinene,  $\beta$ -Sitosterol, Stigmasterol, Tolidyl methyl carbinol, Turmerone,  $\alpha$ -Turmerone, ar-Turmerone,  $\beta$ -Turmerone, Zingiberene, Dihydrocurcumin, 1,7-Bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl 1,6-heptadiene-3,5-dione), D-arabinose, D-Fructose, D-Glucose, Camphene, Camphor, 1,4-Cineole, Curcumone, Zingerene, Sesquiterpene (สุคนธ์, 2542) Farnsworth and Bunyapraphatsara (1992) รายงานสารสำคัญดังกล่าวเช่นเดียวกัน และมีเพิ่มเติมดังนี้ caryophyllene, L- $\beta$ -curcumens, curdione, cycloisoprenemyrcene, 2,5-dihydroxybisabola-3,10-diene, eugenol, glutamic acid, lectin, limonene, tocopherol และยังมี Ascorbic acid, Bata carotene, Boron, Caffeic acid, Calcium, Cinnamid acid, Curlone, Resin, Riboflavin, Thiamin และ Vanillic acid (Raintree, 2004)

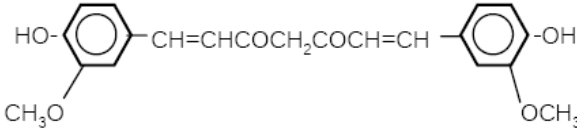
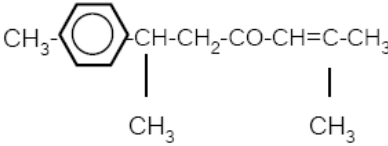
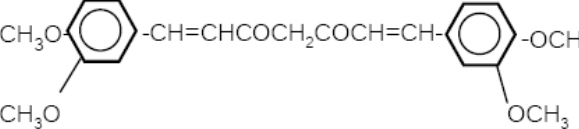
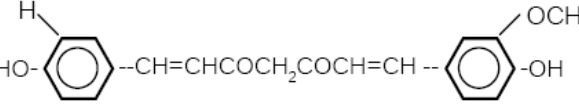
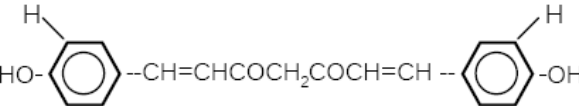
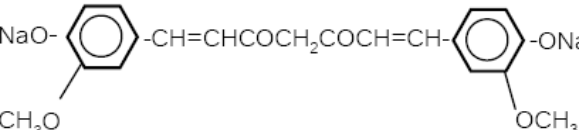
ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าจะเป็นตัวที่ส่งผลให้ขมิ้นชันมีกลิ่นรส คือ องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยประกอบด้วย Turmerol เป็นแอลกอฮอล์ที่มีสูตรโมเลกุล  $C_{13}H_{18}O$  หรือ  $C_{14}H_{20}O$  ต่อมามีการศึกษาพบสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยได้แก่ Turmeron, ar-Turmerone, Borneol, Iso-borneol, Camphor, Caryophyllene, Cineole, Curcumene, Curcumenol, Curdione, Curzerenone, Eugenol, Limonene, Linalool,  $\alpha$ -Pinene,  $\beta$ -pinene, Sabinene, Terpinene, Terpeneol



และ Zingiberene (Jackson and Menke, 1882) รุ่งระวี และคณะ (2545) พบว่าในขมิ้นชันแห้งจะมี น้ำมันหอมระเหยประมาณร้อยละ 2-6 มีสีเหลืองปนส้ม มีกลิ่นเฉพาะตัว และ Purselove *et al.* (1981) ได้พบว่ามีสารประกอบ turmurone อยู่ร้อยละ 50-80 ของน้ำมันหอมระเหยทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีการสกัดสารอีกหลายชนิด ได้แก่ Glycine, Elements, Bisdesmethoxycurcumin, Desmethoxycurcumin และ essential oil จากส่วนอื่นๆ ของขมิ้นชัน

สารประกอบหลักที่ให้สีเหลืองถึงสีส้มจากเหง้าขมิ้นชัน คือ สารประกอบเคอร์คิวมินอยด์ เป็นสารพวก Diaryl methane (Mayer, 1943) Srinivasan (1953) รายงานว่าสารสกัดที่มีสีเหลือง จากขมิ้นประกอบด้วยสารผสม 3 ชนิด คือ เคอร์คิวมิน (Curcumin) เดสเมทอกซีเคอร์คิวมิน (Desmethoxycurcumin) และบิส-เดสเมทอกซีเคอร์คิวมิน (bis-desmethoxycurcumin) เช่นเดียวกับ Rouseff (1988) และจากรายงานของ Purselove *et al.* (1981) ในการสกัดขมิ้นชัน โดยใช้เทคนิค HPLC ปริมาณสารให้สีของขมิ้นชันจะมีอยู่ร้อยละ 0.02-8.1 และแรงกวัดตุให้สีทั้ง 3 มีปริมาณแตกต่างกันคือเคอร์คิวมินมีปริมาณร้อยละ 49-61 เดสเมทอกซีเคอร์คิวมินร้อยละ 20-29 และบิสเดสเมทอกซีเคอร์คิวมินมีปริมาณร้อยละ 15-26 สำหรับสารสีเหลืองชื่อเคอร์คิวมิน (curcumin) มีชื่อทางเคมีว่า bis-(4-hydroxy-3-methoxycinnamoyl)-methane เป็นสารเคมีที่สำคัญในขมิ้นชัน โดยสามารถหลอมละลายที่อุณหภูมิ 176-177 องศาเซลเซียส มีสีน้ำตาลแดง จะมีความไวต่อความเป็นกรดเป็นด่าง จะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีแดงเมื่ออยู่ในสภาวะเป็นกรด และมีสีน้ำตาลแดงเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง สามารถละลายได้ในเอธิลแอลกอฮอล์ สารที่มีความเป็นด่าง (alkali) คีโตน acetic acid และ chloroform ไม่สามารถละลายในน้ำ โดยมีสูตรโครงสร้างเป็นสายอนุพันธ์ของเบนซีน (aliphatic) นอกจากนี้ยังพบว่า Curcumin ยังมีอนุพันธ์ (ตารางที่ 1) อีกหลายชนิดที่ออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระ (Araújo and Leon, 2001)

ตารางที่ 1 สารประกอบ Curcumin และอนุพันธ์ของขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) และ  
การออกฤทธิ์

| สารประกอบ<br>ที่สำคัญ             | โครงสร้างทางเคมี                                                                     | การออกฤทธิ์                                                                                        |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Curcumin</b>                   |    | ต้านเชื้อแบคทีเรีย<br>ต้านเชื้อ HIV<br>ต้านอนุมูลอิสระ<br>ต้านการอักเสบ<br>ต้านการเกิดเนื้อ<br>งอก |
| <b>Ar-turmerone</b>               |   | รักษาบาดแผลที่<br>เกิดจากงูกัด                                                                     |
| <b>Methylcurcumin</b>             |  | ต้านเชื้อแบคทีเรีย                                                                                 |
| <b>Desmethoxy<br/>curcumin</b>    |  | ต้านอนุมูลอิสระ                                                                                    |
| <b>Bisdesmethoxy<br/>curcumin</b> |  | ต้านอนุมูลอิสระ                                                                                    |
| <b>Sodium<br/>curcumin</b>        |  | ต้านการอักเสบ                                                                                      |

ที่มา: Araújo and Leon (2001)

## 5. สรรพคุณในตำรายาไทย

ในตำรายาไทยหลายเล่ม ได้กล่าวถึงสรรพคุณต่าง ๆ ของขมิ้นชันเพื่อใช้บำบัดรักษาโรคต่าง ๆ ดังนี้คือ

ราก เป็นยาบำรุง แก้อาการชัก ลดไข้ แก้ลมชัก ขับปัสสาวะ ป้องกันโรคหนองใน แก้อาการฟกช้ำ แก้โรคผิวหนังผื่นคัน แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ (นันทวัน และ อรุณ, 2539)

เหง้า แก้โรคผื่นคัน แก้ท้องร่วง ขับลม รักษาไข้ รักษาเมะเร็ง ช่วยเจริญอาหาร คลายกล้ามเนื้อในลำไส้ที่เกร็ง ระบายเชื้อวัณโรค แก้ไข้ผอมเหลือง ดมแก้หวัด ฆ่าเชื้อพยาธิ รักษาและสมานแผลในลำไส้ แก้พิษงู และมดกัด รักษากลากเกลื้อน ใช้เป็นยาขัดฟันรักษาฟัน เป็นต้น (นันทวัน และ อรุณ, 2539; สุคนธ์, 2542)

## 6. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและการทดลองทางคลินิกของ Curcumin

ขมิ้นชันนับเป็นพืชใช้เป็นอาหารและยาที่รู้จักกันมากที่สุดชนิดหนึ่ง ส่วนที่นำมาใช้เป็นส่วนของราก ใบ และเหง้า มีประโยชน์ในการรักษาโรคต่างๆหลายชนิด ดังที่มีการทดลองต่อไปนี้

### 6.1 ใบ

น้ำจากใบขมิ้นชันมีผลต่อเชื้อแบคทีเรียอันเป็นสาเหตุของวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) (สุคนธ์, 2542)

### 6.2 เหง้า

1) ฤทธิ์ในการฆ่าและไล่แมลง ซึ่งจากการทดลองพบว่าขมิ้นชันที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ในปริมาณที่สูงสามารถไล่แมลงวัน *Musca nebulosa* ได้ (Dixit and Perti, 1963) นอกจากนั้นยังสามารถไล่มอดแป้ง (*Tribolium castaneum*) และด้วงงวง (*Sitophilus granarius*)

2) แก้โรคผิวหนัง ผื่นคัน รักษาแผลสุพอง แก้อาการแพ้เนื่องจากแมลงกัด ต่อย สารที่ออกฤทธิ์คือสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยอันได้แก่ curcumin มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนองได้ดียิ่งขึ้น (พร้อมจิต และคณะ, 2542)

3) แก๊ท้องอืด ท้องเฟ้อ จุกเสียดแน่น โดยสารที่ออกฤทธิ์คือน้ำมันหอมระเหย ของ ขมิ้นชัน ส่วนการเพิ่มน้ำย่อย gastrin และ secretin เป็นสารที่กระตุ้นให้มีการหลั่งน้ำดีเกิดจาก ฤทธิ์ของ curcumin และ p-tolylcarbinol ทำให้การย่อยอาหารดีขึ้น และเนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ แบคทีเรีย จึงไปลดการใช้กลูโคสของแบคทีเรียในลำไส้ สามารถยับยั้งการเกิดก๊าซที่สร้างจากเชื้อ โรคที่ทำให้เกิดท้องเสีย (*Escherichia coli*) แต่ไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อดังกล่าว (พร้อมจิต และคณะ, 2542)

4) ป้องกันโรคแผลในกระเพาะอาหาร และรักษาแผลเปื่อยในกระเพาะอาหารและ ลำไส้ เนื่องจากพบว่าเคอร์คูมินกระตุ้นให้เกิดการหลั่งมิวซิน (mucin) ในกระเพาะอาหาร จึงช่วย ป้องกันแผลในกระเพาะอาหารได้ เคอร์คูมินขนาดต่ำกว่า 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะช่วยป้องกันการ เกิดแผลในกระเพาะอาหารที่เกิดจากการใช้ยาเฟนิลบูทาโซล (phenylbutazone) แอสไพริน (aspirin) และ 5-ไฮดรอกซีทริปตามีน (5-hydroxytryptamine) แต่ถ้าให้ปริมาณสูงขึ้นถึง 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารเพิ่มขึ้นเนื่องจากทำให้มีการหลั่งมิวซิน น้อยลง และพบว่าขมิ้นชันสามารถใช้รักษาแผลเปื่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กได้ผลดี (วันดี, 2537)

5) เคอร์คูมินและน้ำมันหอมระเหยในขมิ้นชันมีฤทธิ์ลดอาการอักเสบเฉียบพลันได้ ดีกว่าการอักเสบเรื้อรัง โดยไปลดฮิสตามีน (histamine) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการ อักเสบ จากฤทธิ์ ลดการอักเสบนี้เองจึงมีการนำขมิ้นชันไปใช้รักษาโรคทางเดินหายใจ ลดการไอ ขับเสมหะ รักษา โรคไขข้ออักเสบ และใช้ในการผสมเป็นยาสีฟัน เพื่อช่วยลดอาการอักเสบของเนื้อเยื่อในช่องปาก และรักษาเหงือกอักเสบ (วันดี, 2537)

6) มีฤทธิ์ป้องกันการอักเสบจากสารพิษ โดยมีสารที่ออกฤทธิ์ได้แก่ เคอร์คูมิน, p-coumaroyl feruloyl methane และ di-p-coumaroyl methane (รุ่งระวี และคณะ, 2545) โดยเฉพาะ ออกฤทธิ์ต่อต้านสารพิษที่เป็นอันตรายต่อตับ พบว่าสาร Curcuminoids ต่อต้าน carbon tetrachloride และ galactosamine ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดความเป็นพิษในตับ (Hikino, 1985)

7) มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระดีกว่า เมล็ดองุ่นถึง 3 เท่า เมล็ดองุ่นมีฤทธิ์ต้านอนุมูล อิสระมากกว่าวิตามินอี ถึง 50 เท่า เพราะฉะนั้นขมิ้นชันของไทยจึงมีฤทธิ์มากกว่าวิตามินอีถึง 150 เท่า ในการต้านอนุมูลอิสระ (นิรนาม, 2542)

Ruby *et al.* (1995) ได้ศึกษาแยก curcuminoid จากขมิ้นชัน ได้ curcumin 3 ชนิด และนำสารทั้งสามชนิดไปทดสอบ cytotoxic tumour reducing และ ปรากฏิรยาด้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารทั้งสามดังกล่าวนี้สามารถยับยั้งขบวนการต่างๆ ได้

Antony *et al.* (1999) ได้ทำการศึกษา immunomodulation activity ในหนูที่ได้รับ Curcumin พบว่าปริมาณของ white blood cell มีจำนวนเพิ่มขึ้น มีการเพิ่ม antibody ในกระแสเลือด รวมทั้ง macrophage phagocytic activity ด้วย

Wichit (2001) ศึกษาผลของขมิ้นชันและโคเอนไซม์คิวลิบเป็นสารต้านอนุมูลอิสระต่อเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี ในสภาวะที่มีความเครียด พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับขมิ้นชันจะมีระดับการเกิดออกซิเดชันของไขมันลดลง การทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระในผู้ป่วยที่ได้รับขมิ้นชันได้แก่ กลูตาไทโอน เปอร์ออกซิเดส และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสมีฤทธิ์ลดลง หลังการหยุดยาพบว่าสภาวะเครียดเข้าสู่สภาวะปกติเหมือนก่อนทดลอง แสดงว่าการได้รับขมิ้นชันซึ่งมีสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยรักษาสภาวะเครียดและเพิ่มการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระในผู้ป่วย

8) มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา Pitakvongsaporn (2000) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อรา ความคงตัวและการระคายเคืองต่อผิวหนังของครีมขมิ้นชัน พบว่า ขมิ้นชันที่นำมาสกัดมีน้ำมันหอมระเหย 1.6 % (v/w) และเคอร์คูมินอยด์ 0.49% (w/w) โดยมีสารเคอร์คูมิน 10.21% (w/w) เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ โดยวิธี broth dilution พบว่าครีมขมิ้นที่มีน้ำมันขมิ้น 20% สามารถยับยั้งเชื้อกลาก 29 สายพันธุ์ แต่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ได้เล็กน้อย

9) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่าประสิทธิภาพการต้านเชื้อแบคทีเรียจะขึ้นกับสารที่นำมาสกัดขมิ้นชัน และความเข้มข้น พบว่าขมิ้นชันสามารถยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *S. albus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Str. pyogenes*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *Bacillus cereus* และ *Salmonella typhi* โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิดเป็นเชื้อที่อยู่ในทางเดินอาหาร (Farnsworth and Bunyapraphatsara, 1992)

Caichompoo (1999) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ด้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยและสารเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชัน พบว่าเมื่อนำขมิ้นชันสดและแห้งมาสกัดจะมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 1.88 และร้อยละ 7.02 (v/w) ตามลำดับ มีสารเคอร์คูมินอยด์ในเหง้าขมิ้นชันแห้งร้อยละ 6.95 (w/w) โดยมีสารสำคัญคือ เคอร์คูมิน (Curcumin) ร้อยละ 11.6 และเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ด้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยจะยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด รองลงมาคือยีสต์ และแบคทีเรียตามลำดับ โดยเชื้อ แบคทีเรียที่ให้ผลน่าพอใจคือ *Streptococcus pyogenes*

10) สามารถลดคอเรสเตอรอล จากการศึกษการให้ Curcumin ต่อระดับคอเรสเตอรอลในหนู พบว่าระดับของคอเรสเตอรอลของหนูที่ดื่มน้ำที่มีปริมาณลดลง โดยในหนูที่ให้ Curcumin และไม่ให้ Curcumin จะมีระดับคอเรสเตอรอล ใน serum ลดลงถึง 1:2 และ 1:3 พบว่า Curcumin สามารถย่อยคอเรสเตอรอลได้ (Rao *et al.*, 1970)

11) Meghal and Nath (1962) ศึกษาผลของเครื่องเทศต่อการสังเคราะห์วิตามินบีหนึ่งในหนูพบว่า ขมิ้นชันเป็นเครื่องเทศตัวหนึ่งที่สามารถกระตุ้นการสร้างวิตามินบีหนึ่งของแบคทีเรียในลำไส้หนูขาว และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในการจับวิตามินบีหนึ่งในปัสสาวะและอุจจาระ

12) ปฏิกริยาในการยับยั้งมะเร็ง พบว่าขมิ้นชันที่สกัดโดย methanol สามารถยับยั้งการเกิดเนื้องอก และโรคลูคีเมีย SN-36 ในหนูขาวที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Chang and Woo, 1980)

13) ปฏิกริยาต่อระบบภูมิคุ้มกัน Godhwani and Gupta (1980) ศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้กระเทียม ขมิ้นชัน ในสัตว์พบว่าขมิ้นชันมีคุณสมบัติคล้ายกับปฏิกริยาของ corticosteroid โดยยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันทั้งระบบ humoral และ cellular

14) ปฏิกริยาในการต่อต้านพยาธิ (Antiparasite activity) จากการใช้สารสกัดขมิ้นชันด้วยแอลกอฮอล์และน้ำในอัตราส่วน 1:1 ในขนาด 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีผลฆ่าอมีบา พยาธิไส้เดือน (Dhar *et al.*, 1968) และฆ่า anthelmintic tapeworm หดได้ภายใน 42 นาที (Banerjee and Nigam, 1978)

15) ปฏิกริยาต่อต้านไวรัสโดยเฉพาะเชื้อไวรัสเอดส์ Mazumber *et al.* (1995) ได้ศึกษาการยับยั้งโรคระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องจากไวรัส type -1 โดยการใช้น้ำมันชัน พบว่า curcumin สามารถยับยั้งเชื้อไวรัส HIV -1 ได้ครึ่งหนึ่ง (integrase inhibitor concentration at 50 %) มีค่าเท่ากับ 40 ไมโครโมล เช่นเดียวกับ Manuchair (2001) พบว่าสารสังเคราะห์จาก Curcumin ได้แก่ dicaffeolymethane และ rosmarinic acid สามารถยับยั้งเชื้อ HIV ที่  $IC_{50}$  ปริมาณ 10 ไมโครโมล

## 7. การทดสอบความเป็นพิษ

Dhar *et al.* (1968) กล่าวว่าในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดขมิ้นชัน พบว่าสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 50 เมื่อนำเข้าช่องท้องของหนูในขนาด 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถทำให้หนูตายได้ครึ่งหนึ่ง และหนูทนต่อสารสกัดนี้ได้ถึง 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนการสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ แอลกอฮอล์ และน้ำ สามารถทำให้หนูตายครึ่งหนึ่งเมื่อให้ สารสกัดขนาด 525, 398 และ 430 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

Shankar *et al.* (1980) รายงานว่าไม่พบพิษเฉียบพลันเมื่อให้ขมิ้นชันในหนูขนาด 2.5 กรัมต่อกิโลกรัมหรือสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ Sambainah *et al.* (1982) พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต, feed efficiency ratio, red blood Cell และ white blood Cell รวมถึงสารในเลือดอันได้แก่ ฮีโมโกลบิน, serum aminotransferase และ alkaline phosphate

ในการรักษาผู้ป่วยในประเทศไทยใช้ sodium curcuminat ปริมาณ 5, 10 และ 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าในปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีผลให้ความดันโลหิตลดลง และเพิ่มการหลั่งน้ำดี และที่ปริมาณ 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้มีการหายใจที่เร็วขึ้นเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากมีผลต่อกล้ามเนื้อหัวใจ แต่ก็สามารถกลับเข้าสู่สภาวะปกติได้อย่างรวดเร็ว ในปริมาณ 5 และ 10 มิลลิกรัม จะช่วยในการผ่อนคลายการเคลื่อนที่ของลำไส้ และยังมีผลต่อการเคลื่อนไหว ของถุงน้ำดีในสุนัข ลำไส้ใหญ่ในหมู ลำไส้เล็กและมดลูกของหนู (Prucksunnand *et al.*, 1987)

## 8. ผลการทดลองใช้ในสัตว์น้ำ

เต็มดวง และ สุริยันต์ (ม.ป.ป.) ศึกษาผลของการใช้สารสกัดขมิ้นชันผสมในอาหารสำเร็จรูปให้กุ้งกุลาดำกินเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดของลูกกุ้งกุลาดำไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) จากนั้นนำกุ้งกุลาดำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

และเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการหาค่า LC 50 ในระยะเวลา 96 ชั่วโมงพบว่า อัตรารอดของลูกกุ้ง กุลาคำที่กินอาหารสำเร็จรูปผสมขมิ้นชันเป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีอัตรารอดสูงกว่าลูกกุ้งที่ไม่ได้กินอาหารผสมขมิ้นชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

มัลลิกา (2547) ศึกษาผลของการผสมขมิ้นชันในระดับต่าง ๆ กันลงในอาหารเพื่ออนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนพบว่าไม่มีผลต่ออัตรารอด และอัตราการเจริญเติบโต แต่สำหรับในลูกกุ้งก้ามกรามที่คว่ำแล้วการผสมขมิ้นชันในระดับต่าง ๆ กันลงในอาหารสำเร็จรูปเพื่ออนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามพบว่าไม่มีผลต่ออัตรารอดเช่นกัน แต่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้งก้ามกรามที่สูงขึ้น เมื่อให้ขมิ้นชันที่ระดับ 5-10 กรัมต่อ อาหาร 1 กิโลกรัม

กิตติมา (2550) ทำการศึกษาการใช้สารสกัดขมิ้นชันในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยใช้กุ้งกุลาดำน้ำหนักเฉลี่ย 10-15 กรัม พบว่าความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งกุลาดำชุดที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 12.5 และ 25 ppm มีร้อยละการตายต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) นอกจากนี้เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันพบว่ากุ้งกุลาดำชุดที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 25 และ 50 ppm มีปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ส่วนค่า bactericidal activity ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันทุกชุดทดลองมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนปริมาณ total haemocytes และ percent phagocytosis ในกุ้งกุลาดำทุกชุดทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ สำหรับการประเมินจำนวนแบคทีเรียรวมและ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้พบว่าชุดทดลองที่ได้รับขมิ้นชันทุกชุดมีปริมาณแบคทีเรียและ *Vibrio* spp. ทั้งหมดต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

จิตวัฒนา (2550) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม โดยประเมินจากค่า phenoloxidase (PO) activity พบว่าสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm. ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* จำนวน 30 สายพันธุ์ได้ และเมื่อใช้สารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ผสมอาหารอัตราส่วน สารสกัดขมิ้นชัน 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และสารสกัดขมิ้นชัน 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ค่า phenoloxidase (PO) สูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อใช้สารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ผสมอาหารในอัตราส่วน สารสกัดขมิ้นชัน 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ค่า phenoloxidase (PO) ของกุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงในบ่อดินมีค่าสูงกว่าบ่อควบคุม สำหรับการศึกษาอัตราการตายและระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม พบว่ากุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารผสมสารสกัด



ไขมันชั้นในอัตราส่วน 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เมื่อได้รับเชื้อ *A. hydrophila* โดยวิธีให้กุ้งปกติ กินกุ้งที่ติดเชื้อ จะมีอัตราการรอดตาย และมีค่าระดับ phenoloxidase (PO) activity สูงที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดไขมันชั้นในอัตราส่วน 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

## กุ้งขาว

### 1. อนุกรมวิธาน

กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ถูกค้นพบโดย Boone ในปี ค.ศ. 1931 ชื่อวิทยาศาสตร์ของกุ้งชนิดนี้เมื่อก่อนไม่มีคำว่า “Lito” จะใช้เพียงคำว่า “Penaeus” ต่อมาในปี 1997 Dr. Isabel Perez Farfante และ Dr. Brian Kenley ได้ลำดับอนุกรมวิธานของกุ้งชนิดนี้โดยให้ใช้ชื่อเป็น *Litopenaeus vannamei*

อนุกรมวิธานของกุ้งขาว Perez Farfante and Kenley (1997) มีดังนี้

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Order Decapoda

Suborder Natantia

Family Penaeidae

Genus *Litopenaeus*

Species *vannamei*

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Litopenaeus vannamei*

## 2. ลักษณะทั่วไป

ลักษณะทั่วไปของกุ้งสกุลนี้ คือ กรี (rostrum) มีความยาวปานกลาง มีฟันกรีด้านล่าง 2-4 อัน ในวัยอ่อนกรีจะยาวกว่า antennular peduncle และเมื่อโตขึ้นจะมีขนาดสั้นลง บางครั้งอาจมีความยาวถึงครึ่งหนึ่งของปล้องที่ 2 หนวดคู่ที่ 1 (antennular) บริเวณ carapace มีหนวดคู่ที่ 2 (antenna) และ hepatic spine ชัดเจน ไม่มี orbital spine และ pterygostomial spine ไม่มี postocular sulcus ขนาดของ postrostral carina มีหลายขนาด ในบางครั้งอาจพบว่ายาวถึงขอบด้านหลังของเปลือกคลุมหัว ไม่มี branchiocardiac carina longitudinal sutures และ transverse sutures ลำตัวปล้องที่ 6 จะมีสันเรียงตัวตามขวางของลำตัวด้านบน (cicatrices) 3 อัน ร่องในแนวยาวลำตัวด้านบน (dorsolateral sulcus) แคบมากหรืออาจไม่มี ส่วนหาง (telson) เรียบ หนวดคู่ที่ 1 (antennule) ไม่มี parapenaeid spine antennular flagella สั้นกว่าส่วน carapace มาก แผ่นระยางค์ของ maxilla คู่ที่ 1 ยาวมี 3-4 ปล้อง ส่วนปลายเป็นเส้นเหมือน flagella ischial spine อยู่ปล้องที่ 1 และ basal spine ในปล้องที่ 2 ของขาเดิน (pereopod) คู่ที่ 1 (Perez Farfante and Kensley, 1997; จิรพร, 2547) ลักษณะที่สังเกตได้เด่นชัดของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* คือ สีของลำตัวเป็นสีขาว กรีด้านบนจะหยักและถี่ปลาย กรีดตรงโดยที่มีฟันกรีด้านล่าง 2 อัน และด้านบน 8 อัน ความยาวของกรีจะยาวกว่าลูกตาไม่มากและเห็นลำไส้ชัดเจนกว่ากุ้งขาวอื่น ๆ (ภิญโญ, 2545) กุ้งชนิดนี้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของน้ำ ตื่นตกใจง่าย ลักษณะที่พิเศษของกุ้งสายพันธุ์นี้คือสามารถปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงได้ โดยทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในน้ำที่มีระดับความเค็ม 0-35 ppt แต่ระดับความเค็มที่เจริญเติบโตได้ดีคือ 10-22 ppt อุณหภูมิของน้ำในระดับที่เหมาะสมคือ 26-29 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในบริเวณพื้นที่ชายฝั่งหรือบริเวณพื้นที่ในแผ่นดินที่เป็นเขตพื้นที่ความเค็มต่ำ (ปิยะบุตร, 2546ก)

## 3. ถิ่นที่อยู่อาศัยและการแพร่กระจาย

กุ้งขาวอาศัยอยู่ตามแนวชายฝั่งบริเวณที่เป็นพื้นโคลนลงไปจนถึงระดับความลึกประมาณ 72 เมตร หรือ 235 ฟุต พบบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันออกจากตอนเหนือของประเทศเม็กซิโกเรื่อยลงมาตามแนวชายฝั่งทะเลประเทศโคลัมเบีย เปรู เวเนซุเอลา เบลีซ กัวเตมาลา อเมริกาและเปอร์โตริโก (Dore and Frimodt, 1987) โดยมีการเลี้ยงเป็นจำนวนมากที่ประเทศเอกวาดอร์ (Holthuis, 1980)

#### 4. อาหารและการกินอาหาร

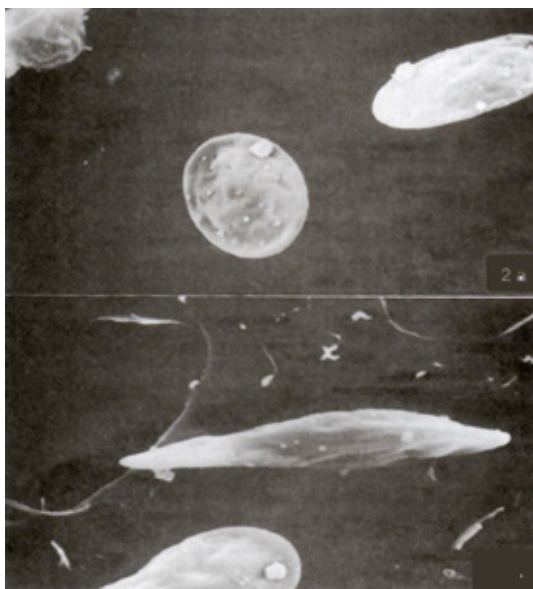
นิพนธ์ (2522) รายงานว่า อุปนิสัยของกุ้งสกุล *Penaeus* เป็นพวกที่กินซากพืชและซากสัตว์ สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่อยู่ในโคลนเลน กุ้งขาวในธรรมชาติจะกินอาหารที่มีชีวิตบริเวณพื้นโคลนทั้งพืช สัตว์ที่มีขนาดเล็ก และซากเน่าเปื่อย (Iversen and Hale, 1992) พฤติกรรมการกินอาหารของกุ้งชนิดนี้คือ หากินทุกระดับน้ำ แต่ชอบกินอาหารบริเวณกลางน้ำเป็นส่วนใหญ่สำหรับอาหารที่ตกลงไปอยู่บริเวณพื้นบ่อแล้วกุ้งจะโฉบลงไปตักขึ้นมาแทะกินในกรณีที่เม็ดอาหารยังไม่แตกตัว ส่วนกรณีที่อาหารแตกตัวแล้วกุ้งจะลงโฉบหรือคลานตามพื้นบ่อ ความต้องการอาหารและพฤติกรรมการกินอาหารของสัตว์น้ำเป็นสิ่งสำคัญที่ผู้เลี้ยงควรคำนึงถึงเพราะสัตว์น้ำแต่ละชนิดมีความต้องการอาหารแตกต่างกันและยังมีพฤติกรรมการกินอาหารที่แตกต่างกันด้วย กุ้งมีความต้องการอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของร่างกาย Lei *et al.* (1989) กล่าวว่า กุ้งที่เลี้ยงในความเค็มต่ำนั้นจะใช้โปรตีนเป็นแหล่งพลังงานมากกว่าไขมัน นอกจากนี้ปริมาณโปรตีนที่มากเกินไปก็ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว (Smith *et al.*, 1985) ในปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่มีคุณค่าทางโภชนาการตามความต้องการของกุ้ง โดยให้มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 30-32 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 16-17 ไขมันร้อยละ 3-4 ไขมันร้อยละ 3.5-4 และความชื้นร้อยละ 10-11 ซึ่งมีส่วนประกอบของ ปลาป่น เปลือกกุ้งป่น เปลือกหอยป่น กากถั่วลิสง กากถั่วเหลือง ไขมันสัตว์ วิตามิน แร่ธาตุ ไคคลอซีมฟอสเฟต และสารถนอมคุณภาพอาหารสัตว์ (ปิยะบุตร, 2546ข)

#### ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์กลุ่ม Crustaceans ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคแบบจำเพาะที่ทำงานโดยแอนติบอดี แต่มีการต่อต้านสิ่งแปลกปลอมเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immune response) ส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของเม็ดเลือด น้ำเลือดและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกาย (Soderhall and Cerenius, 1992) Ratcliffe *et al.* (1985) กล่าวว่าระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งแบ่งเป็น 2 ระบบ คือ ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ (cellular defenses) และระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ (humoral defenses)

เซลล์ที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกัน คือ เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) มีรายงานครั้งแรก โดย Haeckel ในปี ค.ศ. 1857 และได้จำแนกเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งทะเลออกเป็น 3 ชนิด (Martin and Graves, 1985; Hose *et al.*, 1990; Vargas-Albores, 1995) โดยใช้การมีหรือไม่มี จำนวน ขนาด การย้อมสีและโครงสร้างของ granule ในไซโทพลาสซึม และแบ่งชนิดเม็ดเลือดได้ดังนี้ คือ

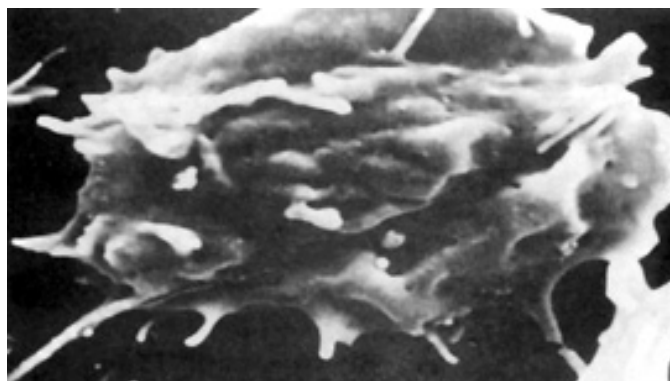
1. hyaline cells (non-granular cells, hyalinocyte หรือ hyalocytes) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด รูปร่างกลมแบน ผิวเรียบ ไม่มี granule นิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์มีขอบเขตของไซโตพลาสซึมน้อย มีหน้าที่ phagocytosis สิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย (Smith and Soderhall, 1986)



ภาพที่ 3 ลักษณะ hyaline cells ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ที่มา: กิจการ และคณะ (2543ก)

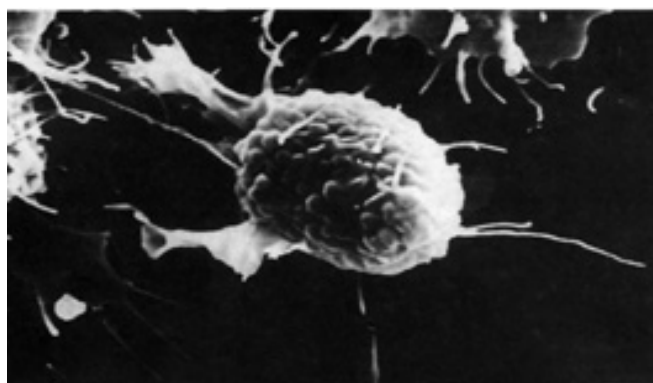
2. semi-granular cells (semigranulocyte) มีลักษณะกึ่งกลางระหว่าง hyaline cell และ granulocyte มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปกระสวย ขนาดของเซลล์มีความกว้าง 4.2-6.8 ไมครอน ยาว 9.0-14.2 ไมครอน (กิจการ และคณะ, 2543ข) นิวเคลียสมีขนาดเล็กตรงกลางเซลล์หรือขอบเซลล์ภายในไซโตพลาสซึมมี granule ขนาดเล็ก ลักษณะเซลล์ไม่แน่นอน มักแตกสลายตัวได้ง่าย เป็นเม็ดเลือดที่ทำหน้าที่รับรู้และมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม ในการสร้าง nodule formation และ encapsulation รวมทั้งใน phenoloxidase activating system



ภาพที่ 4 ลักษณะ semi-granular cells ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ที่มา: กิจการ และคณะ (2543ก)

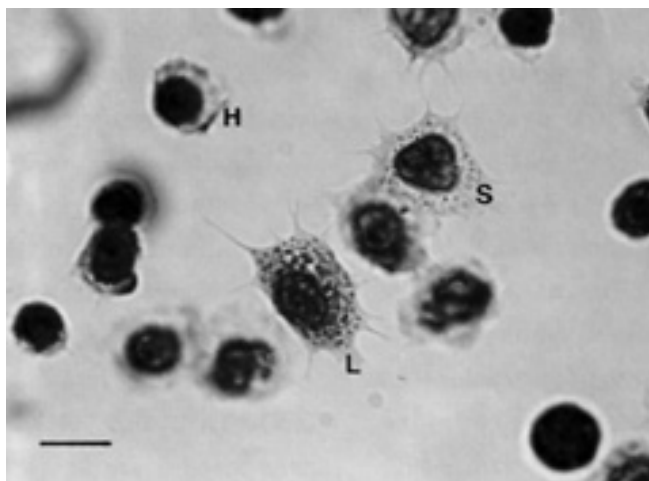
3. granular cell (granulocyte) เซลล์ชนิดนี้มีขนาดใหญ่ที่สุด รูปร่างเป็นรูปไข่ นิวเคลียสมีขนาดเล็ก รูปร่างโค้งคล้ายไต เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ 8-10 ไมครอน กว้าง 7.2-7.8 ไมครอน ยาว 12.2-14.6 ไมครอน (กิจการ และคณะ, 2543ข) ภายในไซโตพลาสซึมมี granule ขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับ semi-granulocyte (Bauchau, 1981) มีหน้าที่หลักเกี่ยวกับการทำงานของระบบ phenoloxidase activating system (Soderhall and Cerenius, 1992)



ภาพที่ 5 ลักษณะ granular cell ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ที่มา: กิจการ และคณะ (2543ก)

เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด ที่กล่าวจะไหลไปกับเลือดทั่วร่างกายและทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันเท่านั้น (Ratcliffe *et al.*, 1985) เม็ดเลือดจะเพิ่มจำนวนมาทดแทนส่วนที่แก่และตายไปจากเนื้อเยื่อที่สร้างเม็ดเลือดซึ่งเรียกว่า hemopoietic tissue ในกิ้งกบได้ตรงตำแหน่งด้านบนของกระเพาะอาหารและโคนขาเดิน โดยอยู่เป็นกลุ่มในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและอยู่ใกล้เอนโดเธล



ภาพที่ 6 ลักษณะเม็ดเลือดของกิ้งกบทั้ง 3 ชนิด ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (H = hyaline cells, S = semi-granular, L = granular และ Bar = 5 ไมครอน)

ที่มา: กิจการ และคณะ (2543ก)

## 1. ระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งกบที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยอาศัยเซลล์ (cellular defenses)

### 1.1 กระบวนการ Phagocytosis

Phagocytosis เป็นหน้าที่สำคัญของเม็ดเลือดในการทำลายสิ่งแปลกปลอมทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตที่เข้าไปในร่างกายซึ่งเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง (McKay and Jenkin, 1970) โดยมีการเคลื่อนที่ของ haemocytes ชนิด hyalinocyte ไปยังบริเวณที่มีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาในร่างกาย (Fontaine and Lightner, 1975) เริ่มจากการยึดกันระหว่างสิ่งแปลกปลอมกับผิวของเซลล์ จากนั้นผิวเซลล์เว้าเข้าไปเกิดเป็น phagosome และจะสัมผัสกับ lysosome เกิดเป็น phagolysosome มีเอนไซม์หลายชนิดใน lysosome ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเรียกว่า acid hydrolases ที่สามารถลดขนาดของสิ่งแปลกปลอมทั้งหลายให้เหลือเป็นหน่วยย่อย ๆ และมีการแตกตัวของออกซิเจนซึ่งออกซิเจน

เหล่านี้จะถูกรีดิวซ์เป็น superoxide anion ด้วย NADPH oxidase ต่อจากนั้นจากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide โดยการเร่งปฏิกิริยาด้วย superoxide dismutase และมีการทำลายอนุภาคภายใน phagolysosome (Klein, 1982)

## 1.2 Nodule formation และ encapsulation

ในกรณีที่สิ่งแปลกปลอมมีจำนวนเพิ่มขึ้นมากหรือมีขนาดใหญ่เกินกว่า haemocyte ไม่สามารถใช้วิธีการ phagocytosis จะเกิดการรวมกลุ่มกันของ haemocyte จนทำให้เกิดเป็น nodule ล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมเพื่อไม่ให้กระจายไปทั่วร่างกาย ซึ่งมีประสิทธิภาพในการจำกัดขอบเขตของการแพร่กระจายของเชื้อโรคได้มาก (Smith and Soderhall, 1986) โดย nodule formation จะเกิดขึ้นเมื่อสิ่งแปลกปลอมนั้นเข้ามาเป็นจำนวนมาก ส่วน encapsulation จะเกิดขึ้นเมื่อสิ่งแปลกปลอมนั้นมีขนาดใหญ่ เช่น เชื้อรา ไข่ของปรสิต มีการขยายจำนวนจนการสร้าง nodule ไม่สามารถควบคุมได้ เม็ดเลือดจำนวนมากจะเข้ามาล้อมรอบและมีการทำงานของระบบ prophenoloxidase เข้ามาทำลายสิ่งแปลกปลอมร่วมด้วย Persson and Soderhall (1987) รายงานว่า semigranulocyte เป็น haemocyte พวกแรกที่เข้ามาเรียงตัวล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่า 10 ไมครอน ทำให้เกิดเป็นรูปร่างคล้าย capsule

## 2. ระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งก่าที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ (humoral defenses)

### 2.1 การแข็งตัวของเลือด (hemolymph clotting)

เป็นกระบวนการแรกที่เกิดขึ้นภายหลังได้รับบาดแผล เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือด และป้องกันการติดเชื้อโรคผ่านบาดแผล เกิดขึ้นโดยเม็ดเลือดชนิด hyaline cell ซึ่งมี granule อยู่ภายใน และเมื่อ granule แตกออกสารเคมีที่ถูกปล่อยออกมาจะไปกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ coagulogen ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน การที่เลือดไม่สามารถแข็งตัวได้อาจเกิดจากที่เม็ดเลือดมีปริมาณลดลงเนื่องจากการติดเชื้อ (Martin *et al.*, 1993) และพบว่าการแข็งตัวของเลือดจะเกิดขึ้นกับการสร้างเม็ดสีดำ (melanin) ที่เกิดขึ้นในระบบ phenoloxidase (Johansson and Soderhall, 1985)

## 2.2 Phenoloxidase activating system

เป็นระบบการทำลายเชื้อโรคและควบคุมการกระจายของเชื้อโรคภายในตัวกุ้ง ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญ โดยมีเอนไซม์ prophenoloxidase (pPO) เป็นสารเริ่มต้นของระบบที่พบได้ใน granule ที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือด (Smith and Soderhall, 1986) Sung *et al.* (1996) พบว่า prophenoloxidase ของกุ้งกุลาดำ กุ้งก้ามกราม และกุ้งขาว ส่วนใหญ่จะอยู่ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดทั้ง semi-granulocyte และ granulocyte เช่นเดียวกับการรายงานของ Hose *et al.* (1987) ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในเม็ดเลือดมีค่าสูงกว่าในน้ำเลือด ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน inactive prophenoloxidase ไปเป็น active phenoloxidase ที่ไวต่อปฏิกิริยาที่จะเปลี่ยนสารกลุ่มฟีนอลจากกรดอะมิโนบางชนิดไปเป็นสารประกอบ quinone โดยกระบวนการ oxidation และเปลี่ยนไปเป็น melanin ในที่สุด โดย melanin จะช่วยยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย

## 2.3 สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (bactericidin)

สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียพบได้ในส่วนของซีรัมและส่วนใสของเซลล์เม็ดเลือดที่แตก (Noga *et al.*, 1996) สามารถถูกชักนำให้มีปริมาณสูงขึ้นได้เมื่อได้รับสารกระตุ้น มีความจำเพาะต่อเชื้อบางชนิดและไม่ทนต่อความร้อน (ชัยชาญ, 2545)

## 2.4 Agglutinin

พบโดยธรรมชาติในน้ำเลือดของ crustacean นอกจากจะเป็นสารก่อให้เกิดการจับตัวของสิ่งแปลกปลอมแล้วยังมีหน้าที่เป็น opsonin กระตุ้นกระบวนการ phagocytosis ในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ด้วย (Vargas-Albores, 1995)

## แบคทีเรียสกุล Vibrion ที่ก่อโรคในกุ้งขาว

*Vibrio* spp. จัดอยู่ใน family Vibrionaceae (Buamann *et al.*, 1971) ซึ่งมีหลายสปีชีส์ที่ก่อให้เกิดโรคทั้งในคนและสัตว์ทะเล โดยเฉพาะโรค bacterial septicemia ในกุ้งกุลาดำของประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Anderson *et al.*, 1988) *Vibrio* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีโครงสร้างของ DNA ประกอบด้วย Guanine และ Cytosine ร้อยละ 38-51 มีรูปร่างเป็นท่อนโค้ง (curved rods) หรือตรงขนาด  $0.3-0.5 \times 1.4-2.6$  ไมโครเมตร (Ingis *et al.*, 1993) เคลื่อนที่ด้วยเส้น



เพียงหนึ่งเส้น (polar flagellum) และมีถุงหุ้มอีกชั้น (sheathed flagella) ไม่สร้างสารที่มีฤทธิ์เป็นกรด และไม่สร้างสปอร์ (ขจร และคณะ, 2536) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 18-37 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่มีการเติมเกลือร้อยละ 1.5-3.5 แต่ลักษณะโคโลนีที่เห็นไม่แตกต่างจากแบคทีเรียกลุ่มอื่นทำให้ยากในการจำแนกชนิด จึงมีอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (selective media) คือ อาหารแข็ง Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) ซึ่งจะแยกลักษณะโคโลนีได้หลังจากเพาะเลี้ยงบน TCBS เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ที่ 35 องศาเซลเซียส กลุ่ม *Vibrio* spp. ที่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้จะมีโคโลนีขนาดปานกลาง ขอบเรียบ ทึบแสง ขอบโคโลนีเห็นเป็นสีเหลืองบน TCBS agar ส่วนกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสจะให้โคโลนีสีเขียวมะกอก (olive-green) (นันทนะ, 2537) *Vibrio* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) และสามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งอาหารและให้พลังงาน (chemoorganotrophs) ไวต่อสารประกอบ vibriostat 2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine phosphate (0/129) และ novobiocin สร้างเอนไซม์ออกซิเดส ในการใช้น้ำตาลกลูโคสให้กรด และส่วนใหญ่ไม่ให้ก๊าซ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในเตรดได้อีกด้วย (Ingis *et al.*, 1993)

*Vibrio* spp. เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในน้ำกร่อย หรือบริเวณแหล่งน้ำที่มีค่าความเค็มช่วงกว้าง ดังนั้นจึงสามารถพบ *Vibrio* spp. ในบ่อเลี้ยงกุ้ง เพ็ญศรี และ โสภณ (2540) ได้ทำการศึกษาปริมาณแบคทีเรียรวมและ *Vibrio* spp. รวมในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา และในคลองธรรมชาติบริเวณที่มีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำอย่างหนาแน่นในจังหวัดสตูล พบว่ามีปริมาณ *Vibrio* spp. ในบ่อเลี้ยงกุ้งและในคลองธรรมชาติอยู่ระหว่าง  $1.09 \times 10^2 - 5.5 \times 10^3$  cfu/ml (ลีลา และคณะ, 2539) นอกจากนี้ยังพบว่า การเลี้ยงกุ้งที่มี *Vibrio* spp. ตั้งแต่  $10^3$  cfu/ml ขึ้นไป มักจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กุ้งเกิดโรค ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณภาพน้ำในบ่อ เนื่องจาก *Vibrio* spp. เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคแบบฉวยโอกาส (opportunistic bacteria) ถ้าคุณภาพน้ำไม่เหมาะสมและการเลี้ยงที่หนาแน่นเกินไป ทำให้กุ้งเกิดความเครียดส่งผลให้กุ้งไม่แข็งแรง *Vibrio* spp. ก็จะฉวยโอกาสเข้าทำอันตรายกุ้ง เป็นผลให้กุ้งป่วยและตายได้ ลักษณะเช่นนี้เป็นการเกิดโรคแบบทุติยภูมิ (secondary infection) โดยมีปัจจัยเสริมในการเกิดโรค คือ เชื้อจะต้องมีความรุนแรงในการก่อโรคในกุ้งและขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อด้วย *Vibrio* spp. บางสายพันธุ์จะทำให้เกิดโรคต่อเมื่อกุ้งเครียดหรืออ่อนแอมาจากลักษณะการติดโรคแบบทุติยภูมินี้เป็นสาเหตุให้กุ้งมีอัตราการตายอย่างรุนแรง (Liao *et al.*, 1992) ผลการสำรวจชนิดของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำบริเวณอ่าวไทย ในช่วงปี ค.ศ. 1988-1990 พบว่า กุ้งที่เป็นโรคมิสาเหตุมาจาก *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. damsela*, *V. alginolyticus* และแบคทีเรียชนิดอื่น (Nash *et al.*, 1992) แต่จากผลการศึกษาของ Ruangpan (1995) ที่ทำการศึกษาเรื่องเดียวกันในประเทศไทย พบอีก 4 ชนิด คือ *V. harveyi*, *V. fluvialis* biovar I, *V. cholerae* non 01

และ *V. fischeri* เช่นเดียวกับ วารินทร์ และคณะ (2537) ที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง แบคทีเรียที่เป็น normal flora ของลูกกุ้งกุลาดำระยะ nauplius V-VI ถึง post larva II กับแบคทีเรียที่เป็น normal flora ของน้ำในบ่ออนุบาลและอาหารก็พบว่าแบคทีเรียที่ถูกตรวจพบจากภายนอกและ ภายในของลูกกุ้งเกือบทั้งหมดอยู่ในสกุล *Vibrio*

### ชนิดของ *Vibrio* spp. ที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งขาว

1. *Vibrio harveyi* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นท่อนสั้น เคลื่อนไหวด้วย polar flagellum ผลิตเอนไซม์ catalase, cytochrome oxidase, amylase, gelatinase, lipase และสามารถย่อย lysine และ ornithine แต่ไม่สามารถย่อย arginine ให้กรดจากการใช้เซลล์ไฮโปออส กลูโคส ซูโครส ทรีฮาโลส ฟรุคโตส มอลโตส ราฟฟิโนส และกาแลคโตส แต่ไม่ให้เกิดจากการใช้ อะราบินอส อินโนซิทอล และแลคโตส สามารถเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเติบโตที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และสามารถเติบโตในอาหารที่มี NaCl ร้อยละ 1.6 นอกจากนี้ยังมีความไวต่อ Vibriostatic agent (0/129) (Austin and Austin, 1987) *V. harveyi* จะมีปะปนในน้ำทะเล แต่ถ้ามีอยู่ในปริมาณสูงจะสามารถก่อให้เกิดโรคกุ้งเรืองแสงหรือโรคเพชรพลอย เมื่อเกิดโรคนี้ ลูกกุ้งจะอ่อนแอไม่ว่ายน้ำ ไม่กินอาหาร ตัวขุนขาว สังเกตลูกกุ้งในเวลากลางคืนที่มีดสนิทไม่มีแสงจะเห็นแสงสีเขียวลอยขึ้นลงตามการเคลื่อนไหวของน้ำ ซึ่งเป็นลูกกุ้งที่ตายและใกล้ตาย เมื่อนำกุ้งเรืองแสงเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSWC หรือ LM บ่มไว้ประมาณ 12-18 ชั่วโมง จะมีกลุ่มแบคทีเรียเรืองแสงเจริญขึ้นบนอาหารนั้น (ลิลา, 2530) โรคเรืองแสงทำอันตรายต่อกุ้งเศรษฐกิจ จำพวกกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguensis*) กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ในช่วงลูกกุ้งวัยอ่อนระยะ nauplius จะมีความไวมากที่สุด รองลงมาคือ ระยะ mysis และ post larva จะมีความทนทานดีกว่า (ปภาศิริ, 2538) พบเช่นเดียวกับรายงานของคารุณี และคณะ (2530) สำหรับแหล่งที่พบ *V. harveyi* ในตัวกุ้งมากที่สุดได้แก่บริเวณ midgut ที่อยู่ในตัวแม่กุ้ง ซึ่งมันจะหลุดออกมาพร้อมกับไข่ ในระหว่างที่มีการผสมพันธุ์วางไข่ (Lavilla – Pitogo *et al.*, 1992) Abraham and Manley (1995) ยังได้รายงานถึงการติด *V. harveyi* ของกุ้งขาวลายเสือ (*P. indicus*) ในประเทศอินเดีย ส่วนในกุ้งมัลลาย (*P. japonicus*) ก็พบการติดเชื้อเช่นกันในประเทศไต้หวัน (Liu *et al.*, 1996) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบการติด *V. harveyi* ครั้งแรกในระยะ nauplius ของกุ้งแชบ๊วย (*P. merguensis*) (คารุณี และคณะ, 2530)

2. *Vibrio cholerae* ค้นพบขึ้นครั้งแรกว่าเป็นเชื้อสาเหตุของ อหิวาตกโรค (cholera) โดยนักกายวิภาคชาวอิตาลี ชื่อว่า Filippo Pancini ในปี 1854 แต่การค้นพบครั้งนี้ก็ยังไม่เป็นที่รู้จักมากนัก

จนกระทั่ง Robert Koch ได้ทำการศึกษาใน 30 ปี ต่อมา ข้อมูลของเชื้อ *Vibrio cholerae* ได้รับการยอมรับและเผยแพร่สู่สาธารณะชนทำให้มีความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับเชื้อและโรคนี้มากขึ้น โดยเชื้อ *V. cholerae* มีรูปร่างเป็นท่อนโค้งสั้น มีขนาด 1.5-3.0 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ด้วยเส้นสร้างกรดจากการใช้น้ำตาลซูโครสและมอลโตส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส แต่ก็สามารถเจริญได้ตั้งแต่ 16 - 42 องศาเซลเซียส สามารถเลี้ยงได้สภาพ pH ตั้งแต่ 9.6 และเจริญได้ดีที่ pH เป็นเบส คือ 7.8 - 8.0 อาศัยอยู่บริเวณเขตนํ้ากร่อย บริเวณปากแม่น้ำติดทะเล และพบได้ในน้ำจืดและอาหารทะเลจำพวก กุ้ง หอย ปู เป็นต้น (Ryan and Ray, 2004; Faruque and Nair, 2008) นิโคล และคณะ (ม.ป.ป.) ได้รายงานว่าการที่เชื้อ *V. cholerae* มีความสามารถก่อโรคในลูกกุ้งก้ามกรามและแม่พันธุ์และได้รุนแรงกว่าเชื้อ *Vibrio* ชนิดอื่น

3. *Vibrio parahaemolyticus* มีลักษณะเป็นโคโลนีสีเขียว แท่งสั้น (short rod) ติดสีแกรมลบ เคลื่อนที่ได้ ออกซิเดสเป็นบวกสามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีอากาศ เจริญได้ในระดับความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ร้อยละ 3-10 และสามารถดำรงชีวิตอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) ที่มีค่า pH ระหว่าง 5-11 แต่ที่ pH 7.2 เหมาะที่สุดสำหรับการเจริญเติบโต (สภาพและ อุษณีย์, 2535) และการศึกษาของเกรียงศักดิ์ และคณะ (2524 ก) พบว่าการแพร่กระจายของเชื้อนี้ในบริเวณอ่าวไทยตอนบนของทะเลอันดามัน เชื้อมีการแพร่กระจายทั่วไปตามแนวชายฝั่งของบริเวณที่ศึกษา โดยเฉพาะในตะกอนดิน และยังพบทั่วไปตามธรรมชาติจากน้ำทะเล และสัตว์ทะเล เช่น กุ้ง หอย ปู นอกจากนี้ Escartan and Sinolinding (1996) ได้ทำการศึกษาโรค vibriosis (vibriosis) ในกุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยง พบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นชนิดที่พบมากที่สุดถึงร้อยละ 82.9 เช่นเดียวกับ Ruangpan and Kitao (1991) ที่พบว่ากุ้งที่เป็นโรค 204 ตัวอย่างนั้นสามารถแยกเชื้อได้เป็น *Vibrio* spp. ร้อยละ 83 ซึ่งประกอบด้วย *V. parahaemolyticus* ร้อยละ 47 และ *V. vulnificus* ร้อยละ 36 และจากการแยกเชื้อ vibriosis จากตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำที่ป่วยเป็นโรคจากฟาร์มกุ้งทั่วประเทศ พบว่าเป็น *V. parahaemolyticus* มากที่สุดคือร้อยละ 27.03 (อมรชัย, 2536) นอกจากนี้ *V. parahaemolyticus* ยังก่อให้เกิดการตายในอัตราสูงใน brown shrimp ที่จับได้ในอ่าว Galveston อีกด้วย (Sinderman, 1977) ผลการศึกษาของเกรียงศักดิ์ และคณะ (2522) ยังได้รายงานว่าจากอาหารทะเล 276 ตัวอย่าง พบ *V. parahaemolyticus* ร้อยละ 8.28 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS พบเชื้อคิดเป็นร้อยละ 63 จากอาหารทะเล 110 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Leistner และร้อยละ 35 จากอาหารทะเล 106 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารเลี้ยง Sakazaki เช่นเดียวกับการศึกษาของ Luangtongkum et al. (1983) ที่พบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นชนิดเด่น (dominant species) จากการสุ่มตัวอย่าง 52 ตัวอย่างจากกุ้ง ปลา หมึก และปู เช่นเดียวกับการพบ *V. parahaemolyticus* ในหอย 4 ชนิด คือ หอยลาย หอยแครง หอยกะพง และหอยแมลงภู่ (เกรียงศักดิ์ และคณะ, 2524 ข)

นอกจากนี้ *V. parahaemolyticus* ยังเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคท้องร่วงในคน ซึ่งโรคติดเชื้อชนิดนี้จะพบได้ตลอดปี สามารถตรวจพบเชื้อชนิดนี้ในหอยมากกว่าสัตว์ทะเลชนิดอื่น

4. *Vibrio vulnificus* เป็นแบคทีเรียดิดีแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น เคลื่อนที่ได้ด้วยเส้นสร้างสารลื่นเยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS อุณหภูมิที่เหมาะสม 30-35 องศาเซลเซียส ความเค็ม 10 - 20 ppm สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือร้อยละ 1-2 ผลิตเอนไซม์ catalase cytochrome oxidase, orthonitrophenyl galactosidase, lysine decarboxylase, tryptophane deaminase และ gelatinase ไม่ผลิตเอนไซม์ arginine dehydrogenase และ urease สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แมนนิทอล และ amygdalin ไม่ใช้น้ำตาล อินโนซิทอล แรมโนส ซูโครส มีลาบีโนส และอะราบีโนส ไม่สามารถเปลี่ยนไนไตรท์ ( $\text{NO}_2^-$ ) เป็นไนเตรท ( $\text{NO}_3^-$ ) ได้ DNA ประกอบด้วย guanine และ cytosine ร้อยละ 45.7 – 47.8 (Austin and Austin, 1987)

*V. vulnificus* สามารถพบได้ทั่วไปในทะเลและบริเวณปากแม่น้ำ นอกจากนี้ยังพบว่ามีความสูงในหอยนางรมที่อาศัยอยู่ในบริเวณเหล่านี้ด้วย (Tamplin and Capers, 1992) Smith and Markel (1982) ยังพบว่า *V. vulnificus* นั้น สามารถสร้างเอนไซม์ collagenase มาสลายคอลลาเจน (collagen) ได้ ดังนั้นการที่เชื้อสามารถแทรกเข้าสู่เนื้อเยื่อได้อาจเนื่องมาจากฤทธิ์ของเอนไซม์ collagenase ที่ย่อยสลายคอลลาเจนในเนื้อเยื่อ ทำให้เห็นลักษณะเป็นเส้นฝักในกล้ามเนื้อกุ้ง สอดคล้องกับการรายงานที่พบในประเทศไทย โดยชลอ (2531) พบโรคเส้นดำในกุ้งขนาดใหญ่ ก่อนจับขาย โดยมีสาเหตุมาจาก *V. vulnificus* เช่นกัน การพบโรคนี้นักพบในช่วงฤดูฝน ทำให้น้ำในนาุ้งมีสภาพค่อนข้างจืด ทั้งสภาพการเลี้ยงที่หนาแน่น โดยมักพบโรคในบ่อเลี้ยงที่มีความเค็มต่ำกว่า 10 ppt

5. *Vibrio fluvialis* เป็นแบคทีเรียดิดีแกรมลบ สามารถเจริญได้ อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หรือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการผสม NaCl ร้อยละ 1-6 สร้างกรดจาก Sucrose, Arabinose, Maltose และ Mannitol แต่ไม่สร้างจาก Lactose จากรายงานของ Lawhavit et al. (2006) พบว่าสามารถแยกเชื้อ *Vibrio fluvialis* ได้จากกุ้งกุลาดำที่ป่วยในประเทศไทย และสามารถพบ *V. fluvialis* ได้บริเวณตามชายฝั่งทะเลและในอาหารทะเล ซึ่งเชื้อ *V. fluvialis* เป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (Carol et al., 1982)

6. *Vibrio alginolyticus* มีรูปร่างเป็นท่อนตรงหรือโค้ง ดิดีแกรมลบพบในตัวอย่างกุ้งแช่บ๊วย (*Penaeus indicus*) จากบ่อเลี้ยงในบริเวณใกล้ๆ Tuticorin ของอินเดียที่เกิดโรคระบาด

ในช่วงเดือนธันวาคม ปี ค.ศ. 1992 นั้น พบว่า *V. alginolyticus* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคระบาดในครั้งนี้ (Abraham and Shanmugan, 1996) ในช่วงฤดูร้อนปี ค.ศ. 1993 ที่ประเทศอิหร่าน ได้เกิดโรค white spotted syndrome (WSS) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการตายของกุ้งมัลลายที่เลี้ยงอยู่เป็นจำนวนมาก จากการตรวจสอบพบว่า *V. alginolyticus* มีส่วนเกี่ยวข้องด้วย (Lee *et al.*, 1996a) เช่นเดียวกับใน ปี ค.ศ. 1994 ประเทศอิหร่านก็พบลักษณะเช่นเดียวกันนี้กับกุ้งกุลาดำ (Lee *et al.*, 1996b) สอดคล้องกับรายงานของ Karunasagar *et al.* (1998) ที่พบ *V. alginolyticus* ในกุ้งกุลาดำ ที่เลี้ยงบริเวณชายฝั่งด้านตะวันออกของอินเดียในระหว่างกลางปี ค.ศ. 1994 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการระบาดของโรค White spot ด้วย นอกจากนี้ จากการตรวจสอบตัวอย่างอาหารทะเลและปลา 330 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นอาหารสด 149 ตัวอย่าง และอาหารที่ผ่านกรรมวิธีการประกอบอาหารแล้ว 181 ตัวอย่าง ในระหว่างเดือนธันวาคม ปี ค.ศ. 1994 และมีนาคม ปี ค.ศ. 1996 ที่ประเทศเยอรมัน ก็สามารถตรวจพบ *V. alginolyticus* ในตัวอย่างด้วยเช่นกัน (Janssen, 1996)

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

1. ไม้พันสำลี
2. หลอดทดลอง
3. จานเพาะเชื้อ
4. Autoclave
5. หลอด eppendorf
6. Vortex mixer
7. ไมโครปิเปต
8. ทิป
9. ปากคีบ
10. กระดาษ Whatman size 6 mm. grade AA disc
11. กระบอกฉีดยา
12. เข็มฉีดยาเบอร์ 26G 1½ TW
13. Hemacytometer
14. กล้องจุลทรรศน์
15. ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส
16. เครื่องเหวี่ยงตกตะกอน
17. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์
18. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
19. กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)
20. สารสกัดขมิ้นชัน
21. ปอซีเมนต์
22. อาหารกุ้งสำเร็จรูป
23. เครื่องให้อากาศพร้อมอุปกรณ์
24. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

## 25. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 25.1 TCBS (Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar)
- 25.2 NA (Nutrient agar)
- 25.3 MHA (Mueller Hinton agar)
- 25.4 PCA (Plate Count agar)

## 26. สารเคมี

- 26.1 L-DOPA (L-3, 4-dihydroxyphenyl alanine)
- 26.2 10% Tri-Sodium Citrate Dihydrate
- 26.3 cacodylate buffer pH 7.4
- 26.4 1% trypsin
- 26.5 Trypan blue
- 26.6 NaCl
- 26.7 DMSO (Dimethyl sulfoxide)
- 26.8 KCl
- 26.9 MgCl
- 26.10  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
- 26.11  $\text{CaCl}_2$
- 26.12 L-glutamin
- 26.13 M-199
- 26.14 Hepes

## วิธีการ

### 1. การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่ก่อโรคในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ของสารสกัดขมิ้นชัน : โดยวิธี Kirby-Bauer method (Bauer *et al.*, 1966)

1.1 เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. 6 ชนิด ได้แก่ *V. harveyi*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. fluvialis* ที่แยกจากกุ้งกุลาดำที่ป่วยโดย Lawhavinit *et al.* (2006) ทำการเก็บรักษาเชื้อบนอาหาร Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (TCBS) อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นำมาเตรียมเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีการ streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) ที่มีการเติม NaCl ลงไปร้อยละ 1.5 บ่มเชื้อที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

1.2 เพาะเชื้อจากข้อ 1.1 ใส่ลงในอาหาร brain heart infusion ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอด 4 มิลลิลิตร นำไปบ่มเชื้อในตู้บ่ม 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 ชั่วโมง

1.3 ทำการ standardize เชื้อแบคทีเรียใน peptone water ให้มีความขุ่นมาตรฐานเท่ากับ McFarland No. 0.5

1.4 สารสกัดขมิ้นชันจากเหง้าที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC (วิเคราะห์โดย Natural Products and Organic Syntheses Research Unit (NPOS)) พบว่ามีปริมาณสาร curcumin ร้อยละ 20.83 สารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเฮกเซนเมื่อวิเคราะห์ด้วย GC-MS (วิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร : เลขที่รายงาน TR 49/13419) พบว่ามีปริมาณสาร  $\beta$ -Turmerone ร้อยละ 59.91,  $\alpha$ -Turmerone ร้อยละ 11.76 และ Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane ร้อยละ 7.10 ตามลำดับ ส่วนสารเคอร์คูมินอยด์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตและและดกผลึกด้วยเอทานอล พบว่ามีองค์ประกอบหลักเป็น curcumin เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC (วิเคราะห์โดย Natural Products and Organic Syntheses Research Unit (NPOS)) พบว่ามี Curcumin ร้อยละ 85.75 Demethoxycurcumin ร้อยละ 10.13 และ Bisdemethoxycurcumin ร้อยละ 0.41 ซึ่งสารสกัดขมิ้นชันทั้ง 3 ชนิดสกัดโดย Natural Products and Organic Syntheses Research Unit (NPOS) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



1.5 ใช้ไม้พ่นสาธิตที่อบฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในหลอดเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 1.3 หากชุ่มเกินไป ให้แตะไม้ พ่นสาธิตแล้วหมุนปลายสาธิตกับข้างหลอด แล้วนำไปป้ายบนผิวหน้าอาหารเป็น 3 ระบาย ให้ทั่ว ผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton agar (MHA)

1.6 ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าแห้งพอสมควร แล้วจึงใช้ปากกิบ คีบแผ่น disc (Whatman grade AA discs size 6 mm in diameter) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปิเปตสารสกัดเข้มข้นใส่ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร/disc วางบนผิวหน้าอาหาร กดเบา ๆ เพื่อให้แผ่น disc ติดกับผิวหน้าอาหาร โดย positive control ใช้ disc ยา tetracycline ที่มีตัวยาบรรจุ 30 ไมโครกรัม/disc และ negative control ใช้ disc ที่ปิเปต DMSO ใส่ปริมาตร 30 ไมโครลิตร/disc วางบนผิวหน้าอาหาร กดเบา ๆ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.7 เมื่อบ่มครบเวลาแล้ว นำจานอาหารมาตรวจผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เป็นมิลลิเมตรด้วย vernier caliper โดยวัดคร่อมแผ่น disc รายงานผลเป็น susceptible intermediate หรือ resistant เมื่อเทียบความกว้างของ inhibition zone กับยา tetracycline ในมาตรฐานของ CLSI (2008) ดังรายละเอียดในภาคผนวก

## 2. การศึกษาปริมาณสารต่ำสุดของสารสกัดเข้มข้น (MIC) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวibriโอที่ก่อโรคในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) : โดยวิธี agar disk diffusion test (Firouzi *et al.*, 1998)

2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. เก็บรักษานบนอาหาร Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS) อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นำมาเตรียมเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีการ streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) ที่มีการเติม NaCl ลงไปร้อยละ 1.5 บ่มเชื้อที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.2 เพาะเชื้อจากข้อ 2.1 ใส่ลงในอาหาร brain heart infusion ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอด 4 มิลลิลิตร นำไปบ่มเชื้อในตู้บ่ม 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 ชั่วโมง

2.3 เตรียมสารสกัดเข้มข้น 1 กรัม ในสารละลาย DMSO 1 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากันจะได้ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางแบบ 2-fold dilution ในสารละลาย DMSO จนถึงระดับความเจือจางที่ 1:1024 เพื่อนำไปหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

2.4 ทำการ standardize เชื้อแบคทีเรียใน peptone water ให้มีความเข้มข้นมาตรฐานเท่ากับ McFarland No. 0.5

2.5 ใช้ไม้พีดสำลีที่อบฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในหลอดเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 2.4 หากชุ่มเกินไปให้แตะไม้พีดสำลีแล้วหมุนปลายสำลิกับข้างหลอด แล้วนำไปป้ายบนผิวหน้าอาหารเป็น 3 ระบายให้ทั่ว ผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton agar (MHA)

2.6 ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที นำแผ่น paper discs (Whatman grade AA discs size 6 mm in diameter) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเปิดสารสกัดขมขึ้นชั้นที่เตรียมไว้ปริมาตร 30 ไมโครลิตร/disc วางบนผิวหน้าอาหาร กดเบา ๆ เพื่อให้แผ่น disc ติดกับผิวหน้าอาหาร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2.7 การตรวจผลโดยบันทึกความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิด inhibition zone เป็นค่า MIC

### 3. การศึกษาเปรียบเทียบอัตราการรอด และอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่เลี้ยงด้วยสารสกัดจากขมขึ้นชั้นผสมอาหารในอัตราส่วนที่ต่างกัน

#### 3.1 การเตรียมลูกกุ้งขาว

เริ่มเลี้ยงกุ้งขาวจากกุ้งระยะ post larva 15 จนกุ้งขาวมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.2511 กรัม และแยกกุ้งเพาะเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เมตร จำนวน 8 บ่อ บ่อละ 50 ตัว ในน้ำที่มีความเค็ม 10 ppt แต่ละบ่อคลุมด้วยผ้าพลาสติกสีดำเพื่อลดปริมาณแสงให้อากาศอย่างเพียงพอ ตลอดการทดลอง ตลอดระยะการเลี้ยงกุ้งขาวจะได้รับอาหาร 3 มื้อต่อวัน ในปริมาณร้อยละ 2.5 ของน้ำหนักตัว และมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำโดยดูดปล่อยน้ำเก่าออกครึ่งหนึ่งแล้วเติมน้ำใหม่เข้าไปเท่ากัน ทุกสัปดาห์ ทำการเลี้ยงกุ้งทดลองจนมีอายุครบ 9 สัปดาห์

#### 3.2 แบบแผนการทดลอง: ดัดแปลงจากแบบแผนการทดลองของมัลลิกา (2547)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) ใช้อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมขึ้นชั้น โดยเลือกชนิดของสารสกัดขมขึ้นชั้นที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดจากผล

การทดลองหาค่า MIC โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลอง การทดลองละ 4 กลุ่ม กลุ่มละ 2 ซ้ำ นำกุ้งใส่ซ้าละ 50 ตัว โดยมีกลุ่มการทดลองดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมให้อาหารสำเร็จรูปไม่มีการผสมสารสกัดขมิ้นชันตลอดการเลี้ยง

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วน 3.75 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ระหว่างการเลี้ยง

กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วน 7.5 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมระหว่างการเลี้ยง

กลุ่มที่ 4 กลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วน 15 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ระหว่างการเลี้ยง

### 3.3 เปรียบเทียบน้ำหนักเพิ่มของกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

น้ำหนักของลูกกุ้งเฉลี่ย (กรัมต่อตัว) เมื่อเริ่มทดลองหาโดยการสุ่มตัวอย่างเก็บตัวอย่างลูกกุ้งบ่อทดลองทุกบ่อ บ่อละ 10 ตัว ชั่งเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง แล้วรายงานผลเป็นน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้ง

จากนั้นหาน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้ง (กรัม/ตัว) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างลูกกุ้งในบ่อทดลองทุกบ่อ บ่อละ 10 ตัว และชั่งเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง แล้วนำไปคำนวณหาน้ำหนักที่เพิ่มของกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลองโดยใช้สูตร

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น = น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งหลังทดลอง – น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งก่อนการทดลอง

### 3.4 เปรียบเทียบร้อยละของน้ำหนักที่เพิ่มต่อวัน ตามสูตร ดังนี้

$$\text{ร้อยละของน้ำหนักที่เพิ่มต่อวัน (\%/วัน)} = \frac{W_t - W_o}{T} \times 100$$

|       |       |   |                              |
|-------|-------|---|------------------------------|
| เมื่อ | $W_t$ | = | น้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลอง  |
|       | $W_o$ | = | น้ำหนักเมื่อเริ่มต้นการทดลอง |
|       | $T$   | = | ระยะเวลาของการทดลอง          |

### 3.5 เปรียบเทียบอัตราการรอดตาย

คำนวณหาอัตราการรอดตายของลูกกุ้งในบ่อ โดยนับจำนวนกุ้งทั้งหมดแล้วเทียบเป็นร้อยละกับจำนวนกุ้งที่ปล่อยจากสูตร ดังนี้

$$\text{อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนกุ้งเมื่อเริ่มการทดลอง}} \times 100$$

### 3.6 เปรียบเทียบอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ

คำนวณหาอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อโดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารแห้งที่กุ้งกิน}}{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น}}$$

### 3.7 การศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงลูกกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ใช้อาหารผสมขมิ้นชัน

บันทึกคุณสมบัติของน้ำก่อนปล่อยลูกกุ้งขาวลงบ่อและทุก 7 วันระหว่างการเลี้ยงจนครบ 9 สัปดาห์ โดยศึกษาคุณสมบัติของน้ำดังต่อไปนี้

- 3.7.1 อุณหภูมิของน้ำโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์
- 3.7.2 ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) วัดโดยใช้ชุดทดสอบ
- 3.7.3 ความเค็มของน้ำ โดยใช้เครื่องวัดความเค็ม
- 3.7.4 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen) วัดโดยใช้ชุดทดสอบ
- 3.7.5 ความเป็นด่าง (Alkalinity) วัดโดยใช้ชุดทดสอบ
- 3.7.6 ปริมาณแอมโมเนีย วัดโดยใช้ชุดทดสอบ
- 3.7.7 ค่าความกระด้างของน้ำวัดโดยใช้ชุดทดสอบ

ชุดทดสอบใช้ของบริษัท นาซ่า แล็บ จำกัด

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One - way Analysis of variance) ส่วนการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test

### 3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลทั้ง 4 ชุดการทดลอง ได้แก่ น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการรอด อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One - way Analysis of variance) ส่วนการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ตามหลักของสุรพล (2521)

## 4. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการเสริมสร้างความสามารถของเลือดกุ้งขาวในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ของเลือดกุ้งขาว : จัพนัน (2549)

หลังจากให้อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันครบตามระยะเวลาดังกล่าวข้างต้น ทำการสุ่มกุ้งแต่ละซ้ำ ซ้ำละ 15 ตัว เจาะเลือดจาก ventral sinus ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยา ภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร (อัตราส่วนเลือดต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 1:2) นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocytes count), กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอกซิเดส (phenoloxidase specific activity), กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งขาว (bactericidal activity) ตามลำดับ ดังนี้

#### 4.1 การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดกึ่งขาว (total hemocytes count)

นำเลือดที่เจาะได้มาตรวจนับเม็ดเลือดโดยใช้ hemacytometer และคำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็นจำนวนเซลล์/ลบ.มล. ดังรายละเอียดในภาคผนวก

#### 4.2 การแยกเซลล์เม็ดเลือด และเตรียม Hemocyte lysate (HLS)

นำเลือดที่เจาะได้มาแยกเซลล์เม็ดเลือด โดยนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมการทำลายแบคทีเรีย (bactericidal activity) ของน้ำเลือดตามวิธีข้อ 4.4 ส่วนตะกอนที่ได้ นำมาล้างใน K-199 และละลายในสารละลาย cacodylate buffer pH 7.4 ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตกและตกตะกอนโดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกส่วนใสซึ่งเป็น HLS ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ตามวิธีดัดแปลงจากรายงานของ Soderhall and Hall (1984)

#### 4.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ( phenoloxidase specific activity )

4.3.1 นำ HLS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลายทริปซิน (0.1% ทริปซิน ใน cacodylate buffer ) 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 30 นาที

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

4.3.3 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุก ๆ 2 นาที เป็นระยะเวลา 30 นาที โดยเปรียบเทียบกับสารละลายควบคุม (blank) สารละลายควบคุมใช้ ทริปซิน ผสมกับ L-DOPA และ cacodylate buffer แทน HLS

4.3.4 นำค่าที่ได้มาคำนวณหน่วย (Unit) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ดังรายละเอียดในภาคผนวก

4.4 การศึกษากิจกรรมการทำลายแบคทีเรีย (bactericidal activity) ของน้ำเลือดกุ้งขาวตามวิธีของ Tunkijjanukij and Olafsen (1998)

ศึกษากิจกรรมของสารต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย 6 ชนิด คือ *Vibrio harveyi*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. fluvialis* นำตัวอย่างน้ำเลือดของกุ้งขาวที่แยกได้จากข้อ 4.2 ไปศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดๆ ละ 3 ซ้ำ ส่วนชุดควบคุมใช้ 0.85% NaCl แทนตัวอย่างน้ำเลือดของกุ้งขาว ด้วยวิธีการดังนี้

4.4.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีการเติม NaCl ลงไปร้อยละ 1.5 บ่มเชื้อที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.4.2 นำเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 4.4.1 ทำการ standardize ใน peptone water ให้มีความเข้มข้น  $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร (OD 660 nm = 0.1) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวที่กรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.22 ไมครอน ปริมาตร 80 ไมโครลิตร บ่มส่วนผสมนาน 1 ชั่วโมง ในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.4.3 ตรวจสอบการลดลงของจำนวนเชื้อโดยวิธี total plate count ภายหลังการเตรียม serial dilutions ที่เหมาะสม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่มีการเติม NaCl ลงไปร้อยละ 1.5

4.4.4 คำนวณหาร้อยละของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำเลือดของกุ้งขาว ตามสูตร

$$\text{ร้อยละของการยับยั้ง} = \frac{\text{จำนวน colonies (ชุดควบคุม - ชุดทดลอง)}}{\text{จำนวน colonies ในชุดควบคุม}} \times 100$$

#### 4.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของชุดการทดลอง โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (สุรพล, 2521)

## 5. การศึกษาผลของปริมาณสารสกัดขมิ้นชันที่ผสมในอาหารในระดับที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวได้สูงที่สุดต่อความต้านทานของกุ้งขาวเมื่อได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi*

### 5.1 การเตรียมแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และการทำให้กุ้งขาวติดโรค : สุมลรัตน์ (2549)

เลี้ยง *V. harveyi* ในอาหาร nutrient broth ผสม NaCl ร้อยละ 1.5 เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อมาวัดค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD เท่ากับ 1 (มีจำนวนเซลล์ประมาณ  $1 \times 10^9$  cell/ml) จากนั้นปรับความเข้มข้นเชื้อโดยการเจือจางให้ได้เท่ากับ  $5 \times 10^6$  cell/ml ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ทำการเลี้ยงกุ้งขาวโดยการให้อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่มีระดับความเข้มข้น 15 กรัม เป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำให้กุ้งติดเชื้อโดยการแช่กุ้งในสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำกุ้งขาวกลับไปเลี้ยงในตู้กระจกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ส่วนชุดควบคุมใช้กุ้งขาวที่เลี้ยงโดยการให้อาหารที่ไม่มีการผสมสารสกัดขมิ้นชัน เป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ ทำให้ติดเชื้อโดยการแช่กุ้งในสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำกุ้งขาวกลับไปเลี้ยงในตู้กระจกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เช่นเดียวกัน

### 5.2 การหาอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว

หาอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว โดยการนับจำนวนกุ้งที่เหลือรอดในการทดลอง และนำมาคำนวณหาการรอดชีวิตโดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนกุ้งขาวที่เหลือ}}{\text{จำนวนกุ้งขาวที่เริ่มต้น}} \times 100$$

### 5.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

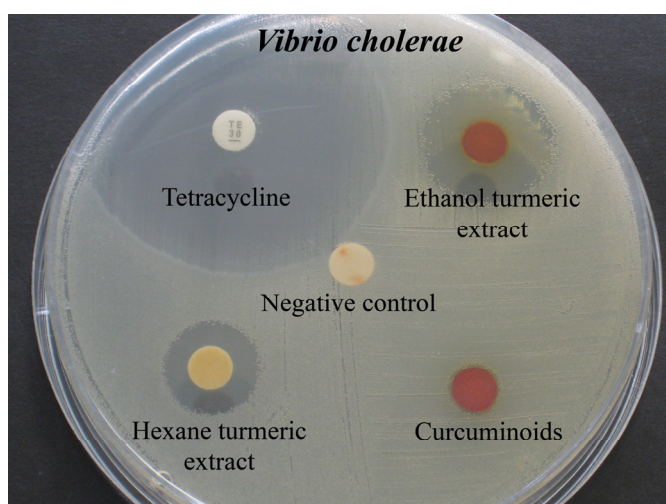
วิเคราะห์ความแตกต่างของชุดการทดลอง โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (สุรพล, 2521)



## ผลและวิจารณ์

### 1. การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่ก่อโรคในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ของสารสกัดขมิ้นชัน

ผลการศึกษาเพื่อคัดเลือกลำดับสารสกัดขมิ้นชันด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ เฮกเซน และสารเคอร์คูมินอยด์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio* spp. 6 สายพันธุ์ (*V. harveyi*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. fluvialis*) โดยวัดความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) จากการทดสอบด้วยวิธี Kirby-Bauer (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. cholerae* โดยสารสกัดขมิ้นชัน

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพสารสกัดจากขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio* spp. โดยวิธี Kirby-Bauer test

(ค่า : ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

| เชื้อแบคทีเรีย             | ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (mm) |                               |                               |                |
|----------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------|
|                            | Tetracycline                                    | Ethanol<br>turmeric extract   | Hexane<br>turmeric extract    | Curcuminoids   |
| <i>V. harveyi</i>          | 47.17 $\pm$ 0.12 <sup>S</sup>                   | 23.33 $\pm$ 0.09 <sup>S</sup> | 15.72 $\pm$ 0.16 <sup>I</sup> | 0 <sup>R</sup> |
| <i>V. cholerae</i>         | 43.00 $\pm$ 0.12 <sup>S</sup>                   | 21.37 $\pm$ 0.49 <sup>S</sup> | 14.28 $\pm$ 0.15 <sup>I</sup> | 0 <sup>R</sup> |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | 40.93 $\pm$ 0.47 <sup>S</sup>                   | 21.50 $\pm$ 0.29 <sup>S</sup> | 14.72 $\pm$ 0.79 <sup>I</sup> | 0 <sup>R</sup> |
| <i>V. alginolyticus</i>    | 42.77 $\pm$ 0.39 <sup>S</sup>                   | 22.37 $\pm$ 0.26 <sup>S</sup> | 14.73 $\pm$ 0.15 <sup>I</sup> | 0 <sup>R</sup> |
| <i>V. vulnificus</i>       | 40.91 $\pm$ 0.36 <sup>S</sup>                   | 22.23 $\pm$ 0.12 <sup>S</sup> | 15.00 $\pm$ 0.26 <sup>I</sup> | 0 <sup>R</sup> |
| <i>V. fluvialis</i>        | 43.67 $\pm$ 0.43 <sup>S</sup>                   | 24.17 $\pm$ 0.03 <sup>S</sup> | 15.39 $\pm$ 0.07 <sup>I</sup> | 0 <sup>R</sup> |

หมายเหตุ R = Resistant

I = Intermediate

S = Susceptible

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และเฮกเซนสามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio* spp. ได้ทั้ง 6 สายพันธุ์เมื่อเทียบความกว้างของ inhibition zone กับยา tetracycline สารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์อยู่ในระดับ susceptible ส่วนสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเฮกเซนอยู่ในระดับ intermediate สอดคล้องกับกิจกรรมและคณะ (2548) ที่พบว่าขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Vibrio* spp. ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยที่อยู่ในสารสกัดขมิ้นชันยังมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิดอีกด้วย (Lutomoski *et al.*, 1974; Bhavanishankar and Murthy, 1986)

สารเคอร์คูมินอยด์เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่าสารเคอร์คูมินอยด์ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เช่นเดียวกับรายงานของ พรชัย และคณะ (2552) ที่รายงานว่าสารเคอร์คูมินอยด์ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม *Vibrio* spp. และ *Salmonella* spp. แต่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด เช่น *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *Bacillus subtilis* และ *B. cereus* สอดคล้องกับรายงานของ Caichompoo (1999) ที่รายงานว่าสาร

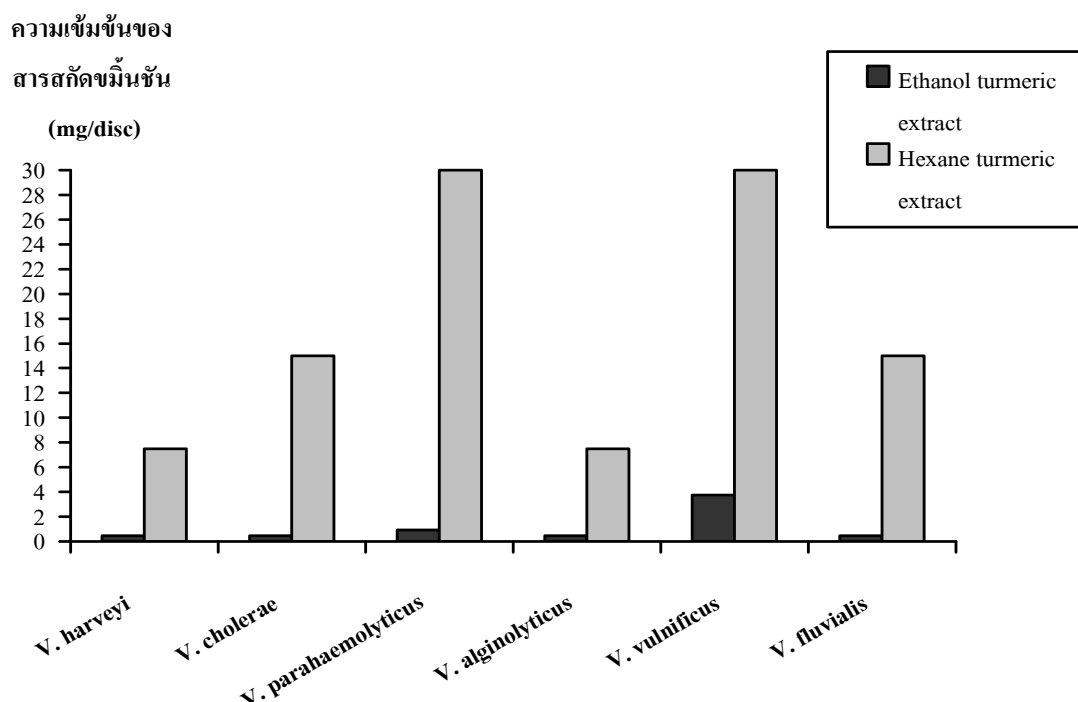
เคอร์คูมินอยด์ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบแต่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด เช่น *S. aureus* และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี ซึ่งตรงกับรายงานของ WHO (1999) ที่รายงานว่าสารเคอร์คูมินอยด์ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบเช่นเดียวกัน

## 2. การศึกษาปริมาณสารต่ำสุดของสารสกัดขมิ้นชัน (MIC) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่ก่อโรคในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

ในการทดลองนี้ได้เลือกสารสกัดขมิ้นชันที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 2 ชนิด ได้แก่ สารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเฮกเซน เพื่อศึกษาความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio* spp. ในอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ที่มีการเติม NaCl ลงไปร้อยละ 1.5 โดยวิธี agar disk diffusion

**ตารางที่ 3** ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และเฮกเซนในการยับยั้ง *Vibrio* spp. โดยวิธี Agar disk diffusion

| เชื้อแบคทีเรีย             | ค่าความเข้มข้นสารสกัดขมิ้นชัน (mg/disc) |                         |
|----------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|
|                            | Ethanol turmeric extract                | Hexane turmeric extract |
| <i>V. harveyi</i>          | 0.47                                    | 7.5                     |
| <i>V. cholerae</i>         | 0.47                                    | 15                      |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | 0.94                                    | 30                      |
| <i>V. alginolyticus</i>    | 0.47                                    | 7.5                     |
| <i>V. vulnificus</i>       | 3.75                                    | 30                      |
| <i>V. fluvialis</i>        | 0.47                                    | 15                      |



ภาพที่ 8 ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และเฮกเซน ในการยับยั้ง *Vibrio* spp. โดยวิธี Agar disc diffusion

2.1 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio* spp. ของสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์สามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.47, 0.47, 0.47, 0.47 0.94 และ 3.75 mg/disc ตามลำดับ

2.2 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio* spp. ของสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเฮกเซน

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเฮกเซนสามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 7.5, 7.5, 15, 15, 30 และ 30 mg/disc ตามลำดับ

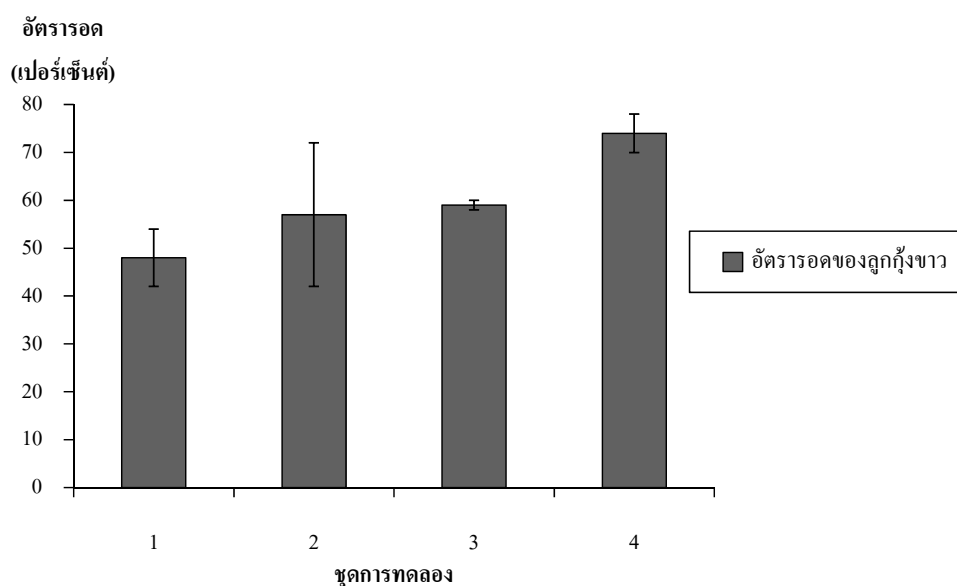
### 3. การศึกษาเปรียบเทียบอัตราการรอด และอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) โดยใช้สารสกัดจากขมิ้นชันผสมอาหารในอัตราส่วนที่ต่างกัน

จากการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่ก่อโรคในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ของสารสกัดขมิ้นชัน และการศึกษาปริมาณสารต่ำสุดของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่ก่อโรคในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) พบว่าสารสกัดขมิ้นชันที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp. คือสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่เป็นเอทิลแอลกอฮอล์ จากนั้นจึงนำสารสกัดขมิ้นชันที่ได้จากการใช้ตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์ทดลองผสมอาหารสำเร็จรูปในอัตราส่วนต่าง ๆ โดยวัดผลความเข้มข้นของขมิ้นชันในการผสมอาหารจากรายงานของมัลลิกา (2547) จากนั้นนำอาหารที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ไปทดลองเลี้ยงลูกกุ้งขาวพบว่าได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

#### 3.1 อัตรารอด

ตารางที่ 4 จำนวนกุ้งที่เหลือรอดและอัตราการรอดของลูกกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่ต่างกัน

| ชุดการทดลอง                                   | (ค่า : ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) |                      |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------|
|                                               | จำนวนกุ้งที่เหลือ<br>(ตัว/บ่อ)              | ร้อยละของอัตราการรอด |
| 1. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 0 กรัม    | 24.0 $\pm$ 3.0                              | 48 $\pm$ 6           |
| 2. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 3.75 กรัม | 28.5 $\pm$ 7.5                              | 57 $\pm$ 15          |
| 3. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 7.5 กรัม  | 29.5 $\pm$ 0.5                              | 59 $\pm$ 1           |
| 4. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 15 กรัม   | 37.0 $\pm$ 2.0                              | 74 $\pm$ 4           |



**ภาพที่ 9** อัตราดูดของลูกกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

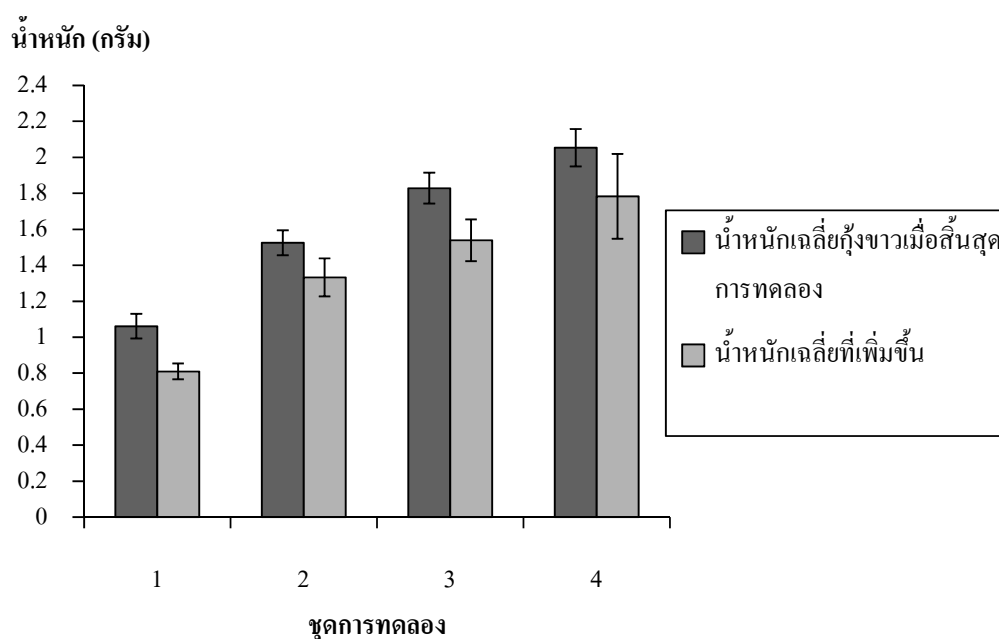
จากการทดลองเลี้ยงลูกกุ้งขาวที่จำนวน 50 ตัว/บ่อ เมื่อสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าเมื่อนำข้อมูลอัตราดูดของทั้ง 4 ชุดการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One - way Analysis of variance) พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p>0.05$ ) ดังที่แสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 9 แต่เมื่อนำข้อมูลอัตราดูดของทั้ง 4 ชุดการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแตกต่างแบบจับคู่ (Pair t-Test) พบว่าอัตราดูดของชุดการทดลองที่ 4 แตกต่างจากอัตราดูดของชุดการทดลองที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p>0.05$ ) จากผลการศึกษาการเลี้ยงลูกกุ้งขาวด้วยอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันในระดับต่าง ๆ กันเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One - way Analysis of variance) พบว่ามีผลการทดลองเช่นเดียวกับมัลลิกา (2547) ศึกษาผลของการผสมขมิ้นชันในระดับต่าง ๆ กันลงในอาหารเพื่ออนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนเป็นเวลา 15 วันพบว่าอัตราดูดให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติ และจากผลการทดลองของเต็มดวง และ สุริยัน (ม.ป.ป.) ซึ่งได้ทำการศึกษาผลของขมิ้นชันที่ผสมอาหารให้กุ้งกุลาดำกินเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าอัตราดูดให้ผลทางสถิติไม่แตกต่างเช่นเดียวกัน

### 3.2 น้ำหนักของกุ้งขาวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ตารางที่ 5 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวและน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของกุ้งขาวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกันเป็นเวลา 9 สัปดาห์

| ชุดการทดลอง                                   | (ค่า : ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) |                                 |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------|
|                                               | น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุด                   | น้ำหนักเฉลี่ย                   |
|                                               | การทดลอง<br>(กรัม/ตัว)                      | ที่เพิ่มขึ้น<br>(กรัม/ตัว)      |
| 1. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 0 กรัม    | 1.061 $\pm$ 0.069 <sup>a</sup>              | 0.81 $\pm$ 0.044 <sup>a</sup>   |
| 2. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 3.75 กรัม | 1.525 $\pm$ 0.069 <sup>b</sup>              | 1.332 $\pm$ 0.106 <sup>ab</sup> |
| 3. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 7.5 กรัม  | 1.829 $\pm$ 0.085 <sup>bc</sup>             | 1.539 $\pm$ 0.117 <sup>b</sup>  |
| 4. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 15 กรัม   | 2.054 $\pm$ 0.105 <sup>c</sup>              | 1.784 $\pm$ 0.236 <sup>b</sup>  |

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกัน ( $p < 0.05$ ) โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ( $p < 0.05$ )



**ภาพที่ 10** น้ำหนักเฉลี่ยของกึ่งขาวและน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของกึ่งขาวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกันเป็นเวลา 9 สัปดาห์

เลี้ยงลูกกึ่งขาวที่จำนวน 50 ตัว/บ่อ ที่น้ำหนักเริ่มต้น 0.2511 กรัม เป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำข้อมูลน้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลองและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในกึ่งขาวมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ชุดการทดลองทั้ง 4 ชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 10 แสดงว่าการเลี้ยงกึ่งขาวด้วยอาหารที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่สูงขึ้นดังการทดลองทำให้กึ่งมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ผสมสารสกัดขมิ้นชันหรือผสมสารสกัดขมิ้นชันในปริมาณที่น้อย

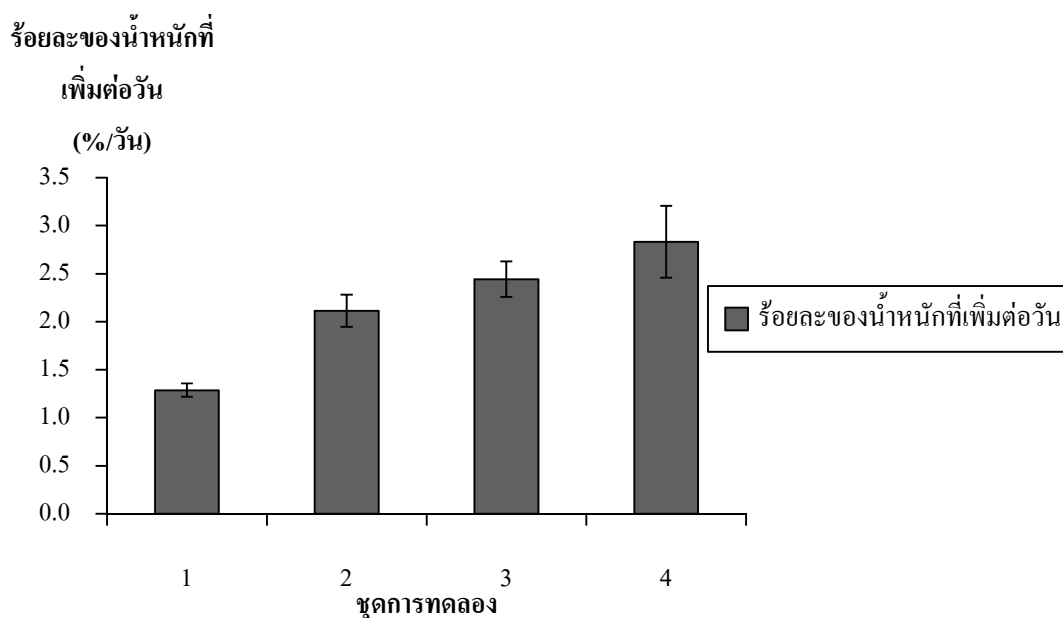


### 3.3 ร้อยละของน้ำหนักที่เพิ่มต่อวัน

ตารางที่ 6 ร้อยละของน้ำหนักที่เพิ่มต่อวันของลูกกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่ต่างกัน

| ชุดการทดลอง                                   | (ค่า : ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)      |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------|
|                                               | ร้อยละของน้ำหนักที่เพิ่มต่อวัน<br>(ร้อยละต่อวัน) |
| 1. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 0 กรัม    | 1.286 $\pm$ 0.070 <sup>a</sup>                   |
| 2. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 3.75 กรัม | 2.114 $\pm$ 0.168 <sup>ab</sup>                  |
| 3. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 7.5 กรัม  | 2.442 $\pm$ 0.185 <sup>b</sup>                   |
| 4. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 15 กรัม   | 2.831 $\pm$ 0.374 <sup>b</sup>                   |

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกัน ( $p < 0.05$ ) โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 11 ร้อยละของน้ำหนักที่เพิ่มต่อวันของลูกกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่ต่างกัน

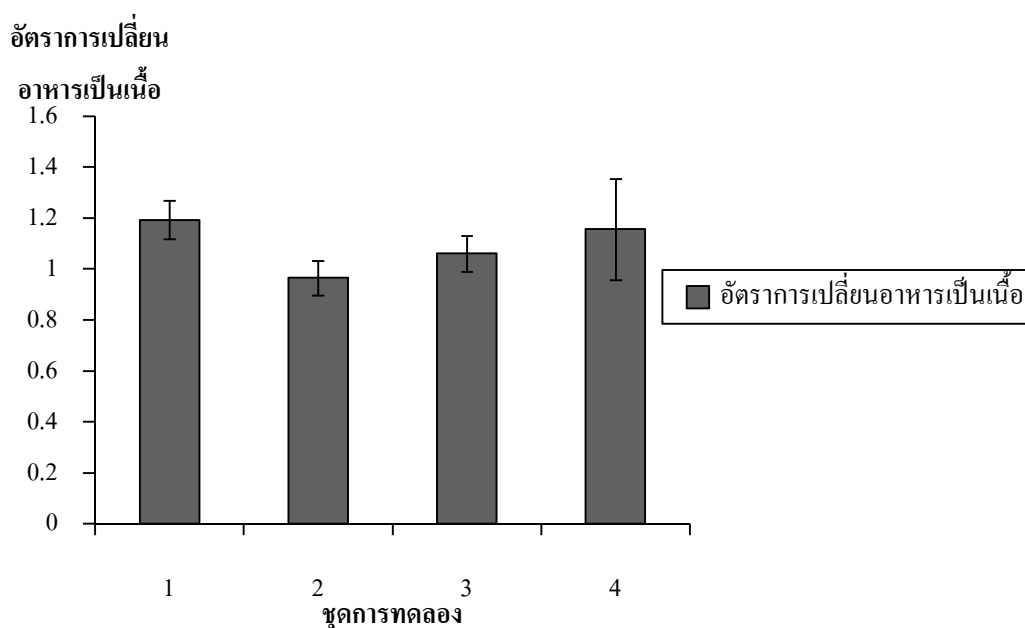
พบว่าร้อยละของน้ำหนักที่เพิ่มต่อวันของชุดการทดลองทั้ง 4 ชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 11 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของมัลลิกา (2547) ที่กล่าวว่าสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 5 และ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ส่งผลให้มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อตัวสูงแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

### 3.4 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ บางทีเรียกว่า อัตราการแลกเนื้อ หมายความว่า ในการเจริญเติบโตหรือเพิ่มน้ำหนักตัวของสัตว์ 1 กิโลกรัมจะต้องใช้อาหารกี่กิโลกรัม ยิ่งใช้อาหารน้อยแต่ได้เนื้อมาก แสดงว่าอาหารนั้นมีคุณภาพดี ดังนั้นจากการทดลองการเลี้ยงกุ้งขาวด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่ต่างกัน ได้ผลของอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดังนี้

**ตารางที่ 7** อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของลูกกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่ต่างกัน

| (ค่า : ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)   |                               |
|-----------------------------------------------|-------------------------------|
| ชุดการทดลอง                                   | อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ |
| 1. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 0 กรัม    | 1.194 $\pm$ 0.076             |
| 2. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 3.75 กรัม | 0.965 $\pm$ 0.068             |
| 3. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 7.5 กรัม  | 1.060 $\pm$ 0.069             |
| 4. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 15 กรัม   | 1.156 $\pm$ 0.199             |



**ภาพที่ 12** อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของลูกกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่ต่างกัน

พบว่าอัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของกุ้งขาวของชุดการทดลองทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p>0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 7 และภาพที่ 12

### 3.5 คุณสมบัติของน้ำระหว่างการทดลอง

คุณสมบัติของน้ำในระหว่างการทดลองพบว่าชุดการทดลองทั้ง 4 ชุดไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p>0.05$ ) โดยมีค่าที่ได้และค่าเฉลี่ยตามตารางที่ 8

ตารางที่ 8 คุณสมบัติของน้ำในการเลี้ยงลูกกุ้งขาวด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

(ค่า : ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

| คุณสมบัติของน้ำ                         | ค่าที่ได้   | ค่าเฉลี่ย           |
|-----------------------------------------|-------------|---------------------|
| ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร) | 6.75 – 7.45 | 7.030 $\pm$ 0.047   |
| ความเค็มของน้ำ (ส่วนในพัน)              | 10 – 12     | 10.680 $\pm$ 0.329  |
| ความเป็นด่าง (มิลลิกรัม/ลิตร)           | 100 – 155   | 122.920 $\pm$ 5.782 |
| ค่าความเป็นกรดด่าง                      | 6.8 – 7.6   | 7.070 $\pm$ 0.070   |
| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)                 | 25.4 – 28.2 | 26.930 $\pm$ 0.268  |
| ปริมาณแอมโมเนียรวม (มิลลิกรัม/ลิตร)     | 0 – 1.1     | 0.180 $\pm$ 0.066   |
| ไนไตรท์ (มิลลิกรัม/ลิตร)                | 0 – 0.2     | 0.050 $\pm$ 0.015   |

จากการทดลองพบว่า คุณสมบัติของน้ำมีความเหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งขาว สอดคล้องกับรายงานของปิยะบุตร (2545) รายงานเกี่ยวกับคุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวว่าควรมีค่าต่าง ๆ ดังนี้ ระดับออกซิเจนละลายน้ำ 5 - 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความเค็ม 10 - 12 ส่วนในพัน ส่วน และค่าความเป็นด่าง 100 - 180 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากรายงานของ Lui *et al.* (2004) ศึกษาผลของแอมโมเนียที่ระดับความเข้มข้น 0, 1.10, 5.24, 11.10 และ 21.609 ppm ต่ออัตราการเจริญของกุ้ง และทดสอบการติดเชื้อ *V. alginolyticus* พบว่ากุ้งที่เลี้ยงในบ่อทดลองที่มีปริมาณแอมโมเนียมากกว่า 5.24 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ Phenoloxidase ซึ่งเป็นสาระสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันกุ้งลดลงภายใน 7 วัน มีการหลั่ง Superoxide anion เพิ่มขึ้นในกุ้ง หมายความว่า แอมโมเนียในน้ำเป็นสาเหตุให้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งลดลงและทำให้กุ้งตายเพิ่มขึ้น แต่จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าค่าปริมาณแอมโมเนียในน้ำยังไม่ถึงระดับที่เป็นอันตรายต่อลูกกุ้งขาวดังนั้นปริมาณแอมโมเนียในน้ำจึงไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการตายของลูกกุ้งขาว

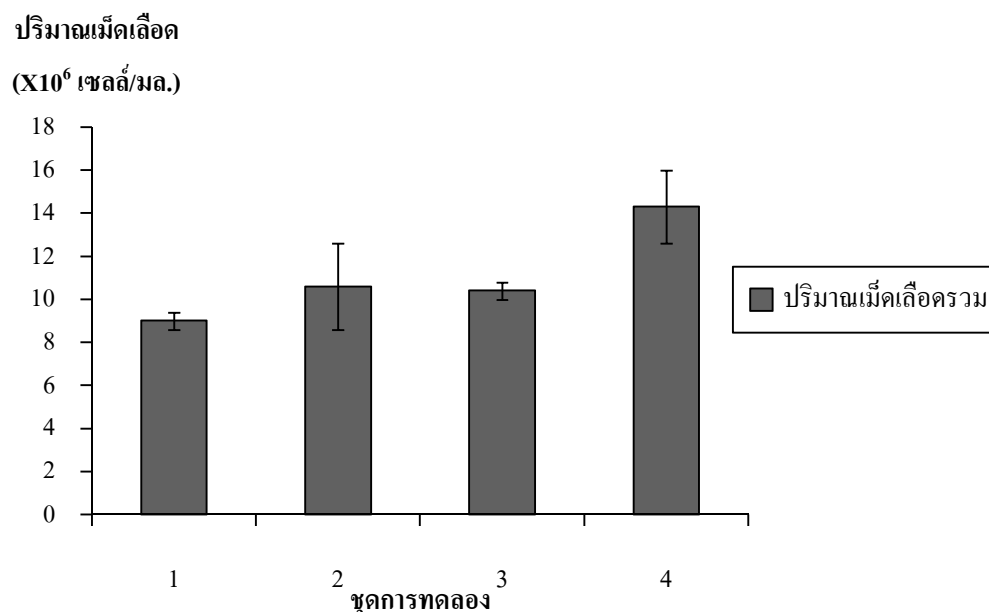
#### 4. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการเสริมสร้างความสามารถของเลือดกุ้งขาวในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp.

##### 4.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocytes)

พบว่าปริมาณเม็ดเลือดในกุ้งกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขมิ้นชันปริมาณ 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ มีค่าสูงที่สุดคือ  $14.3 \pm 1.7 \times 10^6$  เซลล์/มล. ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p > 0.05$ ) จากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขมิ้นชันปริมาณ 3.75 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และ 7.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม (ตารางที่ 9 และภาพที่ 13)

ตารางที่ 9 ปริมาณเม็ดเลือดรวมของลูกกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่ต่างกัน เป็นเวลา 9 สัปดาห์

| (ค่า : ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)   |                                               |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| ชุดการทดลอง                                   | ปริมาณเม็ดเลือดรวม ( $\times 10^6$ เซลล์/มล.) |
| 1. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 0 กรัม    | $9 \pm 0.4$                                   |
| 2. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 3.75 กรัม | $10.6 \pm 2$                                  |
| 3. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 7.5 กรัม  | $10.4 \pm 0.4$                                |
| 4. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 15 กรัม   | $14.3 \pm 1.7$                                |



ภาพที่ 13 ปริมาณเม็ดเลือดของลูกกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

#### 4.2 Phenoloxidase specific activity

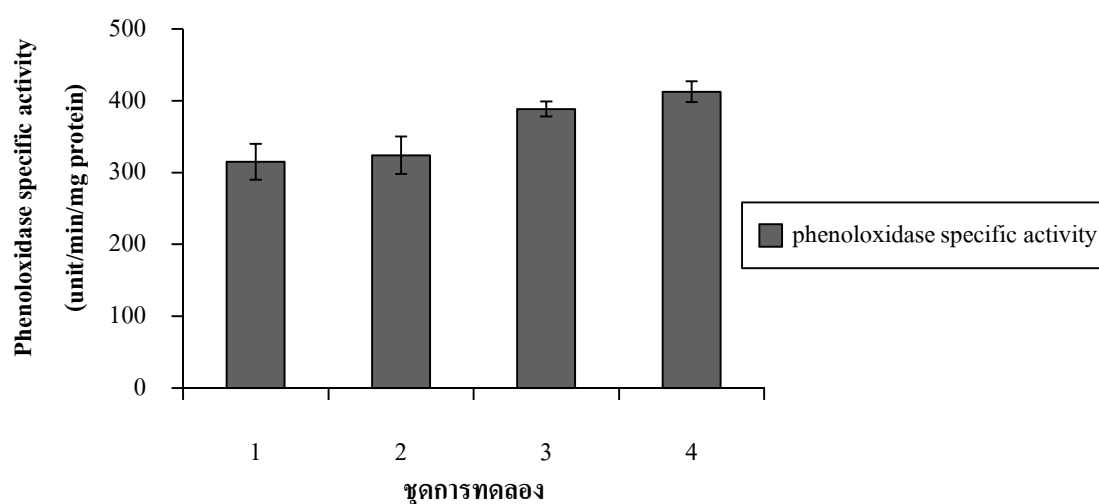
การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (unit/min/mg protein) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวที่ได้รับสารสกัดขมิ้นชันปริมาณ 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ มีค่าสูงที่สุดคือ  $412.5 \pm 14.5$  unit/min/mg protein ไม่แตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p > 0.05$ ) จากกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขมิ้นชันปริมาณ 7.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase เฉลี่ย  $388.5 \pm 10.5$  unit/min/mg protein แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) กับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขมิ้นชันปริมาณ 3.75 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase เฉลี่ย  $315 \pm 25$  และ  $324 \pm 26$  unit/min/mg protein ตามลำดับ (ตารางที่ 10 และภาพที่ 14)

**ตารางที่ 10** กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (unit/min/mg protein) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

(ค่า : ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

| ชุดการทดลอง                                   | Phenoloxidase specific activity<br>(unit/min/mg protein) |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 1. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 0 กรัม    | 315 $\pm$ 25 <sup>a</sup>                                |
| 2. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 3.75 กรัม | 324 $\pm$ 26 <sup>a</sup>                                |
| 3. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 7.5 กรัม  | 388.5 $\pm$ 10.5 <sup>ab</sup>                           |
| 4. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 15 กรัม   | 412.5 $\pm$ 14.5 <sup>b</sup>                            |

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกัน ( $p < 0.05$ ) โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ( $p < 0.05$ )



**ภาพที่ 14** กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (unit/min/mg protein) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

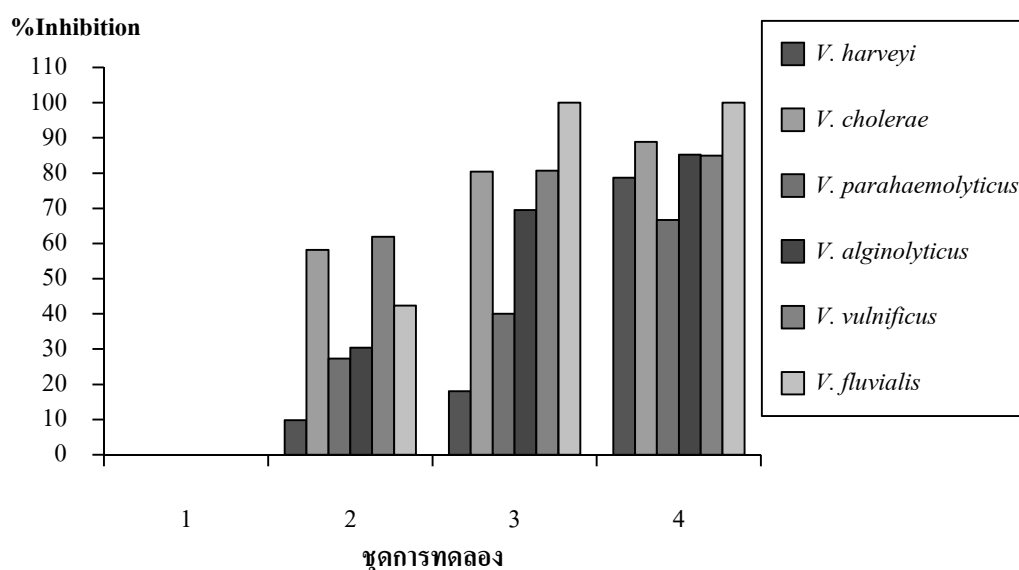
### 4.3 Bactericidal activity

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิด *Vibrio harveyi*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, และ *V. fluvialis* ของลูกกุ้งขาว เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีค่าดังแสดงในตารางที่ 11 และภาพที่ 15

**ตารางที่ 11** ค่ากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ของเลือดกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

| เชื้อแบคทีเรีย             | %Inhibition                   |                              |                                 |                                |
|----------------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
|                            | อาหารสำเร็จรูป                | อาหารสำเร็จรูปผสม            | อาหารสำเร็จรูป                  | อาหารสำเร็จรูป                 |
|                            | ผสมสารสกัด<br>ขมิ้นชัน 0 กรัม | สารสกัดขมิ้นชัน<br>3.75 กรัม | ผสมสารสกัด<br>ขมิ้นชัน 7.5 กรัม | ผสมสารสกัด<br>ขมิ้นชัน 15 กรัม |
| <i>V. harveyi</i>          | 0                             | 9.84                         | 18.03                           | 78.69                          |
| <i>V. cholerae</i>         | 0                             | 58.17                        | 80.39                           | 88.89                          |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | 0                             | 27.33                        | 40                              | 66.67                          |
| <i>V. alginolyticus</i>    | 0                             | 30.43                        | 69.57                           | 85.22                          |
| <i>V. vulnificus</i>       | 0                             | 61.86                        | 80.72                           | 84.95                          |
| <i>V. fluvialis</i>        | 0                             | 42.42                        | 100                             | 100                            |





ภาพที่ 15 ค่ากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ของลูกกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม สารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

จากการทดลองเกี่ยวกับระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวเมื่อได้รับสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน พบว่าในชุดการทดลองที่มีการให้อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันกุ้งขาวจะมีระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มสูงขึ้นซึ่งได้ผลสอดคล้องกับรายงานของกิตติมา (2550) ที่ได้ทำการศึกษาการใช้สารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำพบว่า กุ้งกุลาดำชุดที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่มีปริมาณเอ็นไซม์ phenoloxidase สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ส่วนค่า bactericidal activity และปริมาณ total hemocytes ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันทุกชุดทดลองมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

##### 5. การศึกษาผลของปริมาณสารสกัดขมิ้นชัน 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมต่อความต้านทานของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เมื่อได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi*

จากการทดลองการศึกษาผลของปริมาณสารสกัดขมิ้นชันในการเสริมสร้างความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. พบว่าที่สารสกัดขมิ้นชันที่ผสมในอาหารปริมาณ 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการเสริมสร้างประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเลือดกุ้งขาว หลังเลี้ยงกุ้งขาวด้วยการให้อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วน 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 9 สัปดาห์ จึงทำให้กุ้งขาวติดเชื้อ *V. harveyi*

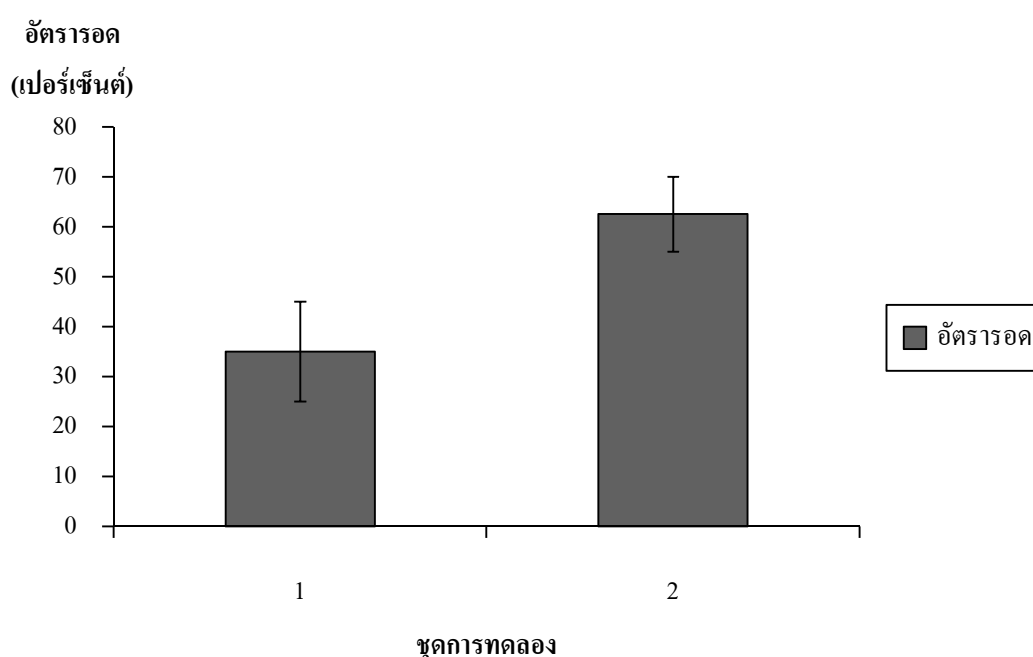
(ปริมาณเชื้อ  $5 \times 10^6$  cell/ml) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการเลี้ยงกุ้งขาวต่ออีก 1 สัปดาห์ และบันทึกจำนวนกุ้งที่รอดตายเพื่อคำนวณหาร้อยละของอัตราการรอด

**ตารางที่ 12** อัตรารอดของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันระดับ 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 9 สัปดาห์ หลังจากได้รับเชื้อ *V. harveyi*

(ค่า : ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

| ชุดการทดลอง                                 | จำนวนกุ้งที่เหลือ (ตัว/ตู้) | ร้อยละอัตราการรอด |
|---------------------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| 1. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 0 กรัม  | $7 \pm 2^a$                 | $35 \pm 10^a$     |
| 2. อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 15 กรัม | $12.5 \pm 1.5^b$            | $62.5 \pm 7.5^b$  |

**หมายเหตุ** ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกัน ( $p < 0.05$ ) โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ( $p < 0.05$ )



**ภาพที่ 16** อัตรารอดของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชันระดับ 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 9 สัปดาห์ หลังจากได้รับเชื้อ *V. harveyi*

จากผลการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่ 1 (ให้อาหารสำเร็จรูปธรรมดา) และชุดการทดลองที่ 2 (ให้อาหารสำเร็จรูปผสมสารสกัดขมิ้นชัน 15 กรัม) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง มีจำนวนลูกกุ้งขาวรอดตายเฉลี่ยเป็นร้อยละ 35 และ 62.5 ตามลำดับ เมื่อนำค่าไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่าทั้งชุดการทดลองทั้งสองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (ตารางที่ 12 และภาพที่ 16) ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับรายงานของเต็มดวง และ สุริยันต์ (ม.ป.ป.) ที่ศึกษาผลของการใช้สารสกัดขมิ้นชัน ผสมอาหารสำเร็จรูปให้ลูกกุ้งกุลาดำกินเป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วนำลูกกุ้งกุลาดำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการหาค่า LC50 ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำที่กินอาหารสำเร็จรูปผสมขมิ้นชัน 3 สัปดาห์ มีอัตราอดสูงกว่าลูกกุ้งที่ไม่ได้กินอาหารผสมขมิ้นชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้สารสกัดจากขมิ้นชันเพื่อการป้องกันรักษาเพิ่มความแข็งแรง เสริมสร้างสุขภาพ และภูมิคุ้มกัน ให้กับกุ้งขาวแวนนาไม โดยทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. หาค่าความเข้มข้นต่ำสุด ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของสารสกัดขมิ้นชัน ศึกษาเปรียบเทียบอัตราการรอด อัตราการเจริญเติบโต และระดับภูมิคุ้มกันของลูกกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) โดยใช้สารสกัดจากขมิ้นชันผสมอาหารในระดับต่างๆกัน ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการเสริมสร้างความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ของเลือดกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) และศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันในระดับความเข้มข้นที่สามารถกระตุ้นระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวได้สูงที่สุดต่อความต้านทานของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เมื่อมีการได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi*

ผลจากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. พบว่าสารสกัดขมิ้นชันที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp. ได้แก่ สารสกัดขมิ้นชันที่สกัดจากเอทิลแอลกอฮอล์ ส่วนสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเฮกเซนมีระดับในการยับยั้งเชื้อเป็น intermediate

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์โดยวิธี agar disk diffusion พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ *V. harveyi*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. fluvialis* ได้แก่ 0.47, 0.47, 0.94, 0.47, 3.75 และ 0.47 mg/disc ตามลำดับ ส่วนสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเฮกเซน พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ *V. harveyi*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. fluvialis* ได้แก่ 7.5, 15, 30, 7.5, 30 และ 15 mg/disc ตามลำดับ

ผลของการนำขมิ้นชันไปผสมอาหารพบว่าลูกกุ้งขาวสามารถกินอาหารที่ผสมขมิ้นชันได้ และจากการศึกษาผลของการผสมขมิ้นชันในระดับต่าง ๆ กันลงในอาหารเพื่อเลี้ยงลูกกุ้งขาว ไม่มีผลต่ออัตราการรอด แต่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้งขาวสูงขึ้นเมื่อให้ขมิ้นชันที่ระดับ 7.5 - 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม คุณภาพน้ำในการเลี้ยงลูกกุ้งขาวโดยใช้ขมิ้นชันผสมอาหารให้ผลว่าขมิ้นชันที่ผสมลงในอาหารไม่ทำให้คุณสมบัติของน้ำเปลี่ยนแปลงไป

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการเสริมสร้างความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ของเลือดกุ้งขาว พบว่าปริมาณเม็ดเลือด กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และกิจกรรมของสารต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย มีค่าเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนของสารสกัดขมิ้นชันที่เพิ่มขึ้นในการผสมอาหาร โดยมีค่าสูงที่สุดในอัตราส่วนที่ผสมอาหาร 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ในการศึกษาผลของปริมาณสารสกัดขมิ้นชัน 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ต่ออัตราการรอดของกุ้งขาวเมื่อมีการได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* พบว่า กุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วน 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีอัตราการรอดที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าสารสกัดขมิ้นชันที่มีความเหมาะสมที่สุดต่อการเลี้ยงลูกกุ้งขาว คือ ระดับที่ผสมขมิ้นชันในอาหาร 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เนื่องจากการใช้สารสกัดขมิ้นชันในอัตราส่วนที่สูงขึ้นจะเป็นผลทำให้กุ้งมีอัตราการกินอาหารที่ลดลงและทำต้นทุนในการเลี้ยงที่สูงขึ้นด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้เป็นประโยชน์อย่างมากต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงลูกกุ้ง ในการตัดสินใจใช้ขมิ้นชันทดแทนสารปฏิชีวนะ เพื่อเป็นการเสริมสร้างสุขภาพลูกกุ้งให้แข็งแรง ทนต่อสาเหตุการโน้มนำให้เกิดโรค และเป็นการเพิ่มคุณค่าผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งของไทยในตลาดการค้าต่างประเทศ

### ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาการใช้สารสกัดขมิ้นชันที่ระดับและระยะเวลาดังกล่าวเพิ่มเติม สำหรับการเลี้ยงในบ่อดิน เนื่องจากในสภาพการเลี้ยงจริงมีปัจจัยทางสภาพแวดล้อมบางประการที่ส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันที่ผู้เลี้ยงไม่สามารถควบคุมได้เหมือนในการทดลอง ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อการปรับวิธีการใช้สารสกัดขมิ้นชันเพื่อการป้องกันรักษา เพิ่มความแข็งแรง เสริมสร้างสุขภาพ และภูมิคุ้มกัน ให้กับกุ้งขาวแวนนาไม ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กานดา วณิชกาญจนกุล. 2540. การผลิตและการใช้ประโยชน์จากขมิ้นชันผง และโอลีโอเรซิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กิจการ ศุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุตินา ตันติกิตติ และ Rudolf Hoffmann. 2543ก. เชลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกึ่งกลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์ วิทยาศาสตร์. 22 (ฉบับพิเศษ): 581–588.
- \_\_\_\_\_, อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์, T. Itami และ จิราพร เกษรจันทร์. 2543ข. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกึ่งกลาดำ: I. เทคนิคในการศึกษาภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกึ่งกลาดำ. สงขลานครินทร์ (ฉบับพิเศษ 2543: กึ่งกลาดำ). 22: 567-580.
- \_\_\_\_\_, นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, มะลิ บุญยรัตผลิน, จีรพร เรืองศรี, ฐานันดร ทัดตานนท์ และ ธนาวุฒิ กล่าวเกลี้ยง. 2548. ผลของสมุนไพรต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค การเจริญเติบโต สุขภาพ และความต้านทานโรคในกึ่งกลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์ (ฉบับพิเศษ 1). 27: 55-70.
- กิตติมา วณิชกุล, นนทวิทย์ อารีย์ชน และ งามพอง คงคาทิพย์. 2550. การใช้สารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ในการเลี้ยงกึ่งกลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius ), น. 212-220. ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 (สาขาประมง). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เกรียงศักดิ์ สายธนู, สงคราม เหลืองทองคำ และ เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2522. การสำรวจหาเชื้อไวรัสโอพาราสีโมไลติคัสจากอาหารทะเลต่างๆ. ใน บทความย่อยรายงานการประชุมวิชาการ (สาขาสัตวแพทย์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เกรียงศักดิ์ สายธนู, สงคราม เหลืองทองคำ และ เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2524ก. การแพร่กระจายของ เชื้อไวรัสโอ พาราอีโมไลติคัส ในนําน้ำไทย ผลการสำรวจ 2521-2524, น. 255-261. ใน การสัมมนาครั้งที่ 2 การวิจัยคุณภาพน้ำและทรัพยากร สิ่งมีชีวิตในนําน้ำไทย. สำนักงาน คณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ และ \_\_\_\_\_. 2524ข. การตรวจหาเชื้อไวรัสโอ พาราอีโมไลติคัส จากหอย 4 ชนิดในกรุงเทพฯ, น. 272-284. ใน บทคัดย่อสัมมนาเรื่องคุณภาพน้ำและสิ่งมีชีวิตใน นําน้ำไทย. สำนักคณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

ขจร เจริญศิริ และ นัตรชัย ศรีไชย. 2536. แบคทีเรียพื้นฐาน. มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

จิตวัฒนา เหลืองบำรุง. 2550. ประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ในการ กระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) เพื่อยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิรพร สิงห์พันธ์. 2547. ผลของ Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) ต่อการเจริญเติบโตและการรอดของกุ้งขาวแอฟฟีก (*Litopenaeus vannamei*; Boone, 1931). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นัทชนัน ศรีไพศาล. 2549. การใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลำปางรักษ์สมุนไพร. 2550. สมุนไพรขมิ้นชัน. ลำปางรักษ์สมุนไพร. แหล่งที่มา: <http://www.herblpg.com/thai/node/33.htm>, 20 เมษายน 2552.

ชลอ ลิมสุวรรณ. 2531. สาเหตุและการป้องกันโรคเลี่ยนดำในกุ้งกุลาดำ, น. 5. ใน เอกสาร ประกอบการสัมมนาเรื่องโรคจุดดำในก้ามเนื้อกุ้งและแนวทางการแก้ไขปัญห, ธันวาคม 2531. กองประมงน้ำกร่อย, กรมประมง และสมาคมผู้เพาะเลี้ยงแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

ชลอ ลิมสุวรรณ และ พรเลิศ จันทรรักษ์ชกุล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. บริษัทเมจิฟฟบลีเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.

ชัยชาญ ไตรศรีศิลป์. 2545. ฟีนอลออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

คารุณี แซ่อู่, อนันต์ ต้นสุตะพานิช และ ลีลา เรืองแป้น. 2530. *Vibrio harveyi* สาเหตุของโรคแบคทีเรียเรืองแสงของลูกกุ้งแช่บ๊วย (*Penaeus merguensis*), น. 1-8. ใน โรคกุ้งทะเลและการใช้สารเคมีภัณฑ์. เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่องการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ครั้งที่ 1, ตุลาคม 2530. ชมรมวิทยาศาสตร์การประมงและคณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เต็มดวง สมศิริ และ สุริยันต์ สุนทรวิทย์. ม.ป.ป. ผลการศึกษาประสิทธิภาพการใช้มันชันผสมอาหารลูกกุ้งกุลาดำต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* และเชื้อตัวแดงดวงขาว. กรมประมง, กรุงเทพฯ.

ทวีศักดิ์ ศรีชนะ. 2547. องค์ประกอบบางประการของระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นันทะ อรุณฤกษ์. 2537. การจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปัส. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

นันทวัน บุญยะประภัศร และ อรุณ โชคเจริญพร. 2539. สมุนไพรพื้นบ้าน. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ. หน้า 366-380.

นิพนธ์ เหมาะประสิทธิ์. 2522. ผลของอาหารผสมซึ่งมีโปรตีนระดับต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ, น. 86. ใน รายงานปีหน่วยอาหารกุ้งและปลา. งานทดลองและวิจัยเพื่อเพาะเลี้ยง. กองประมงน้ำกร่อย. กรมประมง, กรุงเทพฯ.

นิรนาม. 2542. มะระขี้นกและขมิ้นชันจัดสารไดออกซินเพื่อสุขภาพ. แหล่งที่มา:

<http://www.geocities.com/capecanaveral/cockpit/6475/health.htm#3>, 11 มีนาคม 2547



นิลนิต กิจอันเจริญ, เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว, นงนุช สุวรรณเพ็ง และ ณัฐวดี เหล่าพงศ์ไพศาล. การ  
ตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อรังในโรงพยาบาลกึ่งกักกันกรรม โดยการใช้เทคนิค PCR. แหล่งที่มา:

[http://ora.kku.ac.th/res\\_kku/Abstract/AbstractView.asp?Qid=73.htm](http://ora.kku.ac.th/res_kku/Abstract/AbstractView.asp?Qid=73.htm), 7 พฤษภาคม 2552

ปภาศิริ ศรีโสภากรณ์. 2538. โรคและพยาธิของสัตว์น้ำ. ภาควิชาวชิรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

ปิยะบุตร วิษพงษ์พันธุ์. 2545. ศาสตร์ของกุ้งขาลีโทพีเนียส แวนนาไม. สัตว์น้ำ 158: 87 - 90.

\_\_\_\_\_. 2546ก. ศาสตร์ของกุ้งขาลีโทพีเนียสแวนนาไม. สัตว์น้ำ 14 (161): 109 - 112.

\_\_\_\_\_. 2546ข. ศาสตร์ของกุ้งขาลีโทพีเนียสแวนนาไม. สัตว์น้ำ 14 (162): 119 - 122.

พร้อมจิต ศรีลัมพ์, วงศ์ถิตย์ นั่วกุล และ สมภพ ประธานธรรักษ์. 2542. สารานุกรมสมุนไพร  
เล่มที่ 1 สมุนไพรสวนสิริรุกขชาติ. ภาควิชาเภสัชศาสตร์, คณะเภสัชศาสตร์,  
มหาวิทยาลัยมหิดล.

เพ็ญศรี บุญตามช่วย และ โสภณ อ่อนคง. 2540. ปริมาณแบคทีเรียรวมและไวรัสรวมในบ่อเลี้ยง  
กุ้งกุลาดำแบบพัฒนาและในคลองธรรมชาติ จังสตุล. เอกสารวิชาการฉบับที่ 36 ศูนย์  
พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสตุล กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ กรมประมง, กรุงเทพฯ.

พนมพร ภาณุทัต และ สาวิตรี วทัญญูไพศาล. 2546. การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในอาหารด้วยสารสกัด  
จากพืชเครื่องเทศและสมุนไพรไทยบางชนิด. น. 218-222. ใน การประชุมวิชาการอุตสาหกรรมเกษตร ครั้งที่ 5: นวัตกรรมผลิตอาหารเพื่อสุขภาพ, ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค, กรุงเทพฯ ฯ.

พรชัย สันเจริญโกไคย, งามอาจ เลหาวินิจ, พชร สุทรนนท, งามพ่อง คงคาทิพย์, สุริยัน สุทธิประภา  
และ บุญส่ง คงคาทิพย์. 2552. ผลการยับยั้งของสารสกัดขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.)  
ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในคนและสัตว์บางชนิด. น. 244-253. ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 (สาขาวิทยาศาสตร์).  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พรเลิศ จันทร์รัชกุล, นกคณ สุกระกาญจน์ และ สัมพันธ์ ปานจรัตน์. 2541. ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมบางประการต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). น. 35-42. ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ ฯ.

ภิญโญ เกียรติภิญโญ. 2545. **วิธีปฏิบัติสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว แอล. แวนนาม (Practical Technology for *Litopenaeus vannamei* Culture)**. สำนักพิมพ์เมืองเกษตรแม่กาจีน, สมุทรปราการ.

มัลลิกา วรณประภา. 2547. ผลของสารสกัดจากขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ต่ออัตราการรอดและอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน (*Macrobrachium rosenbergii* de Man). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ยุทธนา ศิริวัธนกุล. ม.ป.ป. **สมุนไพร: ภูมิปัญญาไทยสู่อนาคตการเลี้ยงสัตว์**. แหล่งที่มา: <http://natres.psu.ac.th/e-book/herb1.pdf>, 16 กันยายน 2551.

รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล, พร้อมจิตต์ ศรีลัมพ์, สมภพ ประธานธรรักษ์, วิจิต เปานิล, นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และ วงศ์สถิตย์ นั้วกุล. 2545. **สมุนไพร ยาที่ควรรู้**. หนังสืออนุสรณ์งานพระราชทานเพลิงศพ นายวัฒนา ชานนท์. ศักดิโสภณ การพิมพ์. หน้า 55-56.

ฤทัย สกุลแรมรุ่ง. 2539. **วิทยาภูมิคุ้มกัน**. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ลิลา เรืองแป้น. 2530. โรคกุ้งทะเล: โรคที่มีสาเหตุมาจากปรสิต และตัวเกาะอาศัยภายนอก, น. 27-36. ใน **โรคกุ้งทะเลและการใช้สารเคมีภัณฑ์**. เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่องการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ครั้งที่ 1, ตุลาคม 2530. ชมรมวิทยาศาสตร์การประมงและคณะประมงมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

\_\_\_\_\_, ชัยวุฒิ สดกทอง และ ยุบลรัตน์ ศรีแก้ว. 2539. แบคทีเรียเรืองแสงในแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำจังหวัดสงขลา. น. 9-11. ใน **บทคัดย่อ รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2539**, กันยายน 2539. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.

วันดี กฤษณพันธ์. 2537. สมุนไพรน่ารู้. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.  
หน้า 81-85.

\_\_\_\_\_. 2538. สมุนไพรสารพัดประโยชน์. ภาควิชาเภสัชวินิจัย, คณะเภสัชศาสตร์,  
มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 48-49.

วารินทร์ ธนาสมหวัง, ทวีชัย สุไพรวัย และ สมประสงค์ ชันถม. 2537. แบคทีเรียฟลอราของลูก  
กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). เอกสารวิชาการฉบับที่ 11. ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์  
น้ำชายฝั่งสมุทรสาคร กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง, กรุงเทพฯ.

สถาพร ดิเรกบุษราคม และ อุษณีย์ เอกปนิธานพงศ์. 2535. ผลของสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งต่อ  
เชื้อไวรัสโอที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค. น. 259-262. ใน รายงานการสัมมนาวิชาการ  
ประจำปี 2535, 16-18 กันยายน 2535. กรมประมง, กรุงเทพฯ.

สุคนธ์ พูนพัฒน์. 2542. ก้าวไปกับสมุนไพร. คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล.  
หน้า 66-67.

สุมลรัตน์ กระพีแแดง. 2549. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อการยับยั้งการเติบโตของ  
เชื้อไวรัสโอในกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภาภรณ์ ปิณฑิร. 2544. ขมิ้นชัน. สมุนไพรอภัยภูเบศร์ สืบสารภูมิปัญญาไทย. โรงพยาบาล  
เจ้าพระยาอภัยภูเบศร์, ปราจีนบุรี. หน้า 30-31.

สุรพล อุปศิษฐกุล. 2521. สถิติการวางแผนการตลาดเบื้องต้น. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

องค์การเภสัชกรรม. 2542. ขมิ้นชัน. องค์การเภสัชกรรม. แหล่งที่มา:  
<http://www.gpo.or.th/herbal/curcuma/curcuma.htm>, 1 พฤษภาคม 2552.

อมรชัย สมเจตน์เลิศเจริญ. 2536. การศึกษาชนิดของเชื้อไวรัสโอ และการตกค้างของยาออกโซลิโนน  
แอซิด ในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อาทร ธีวไพบูลย์. 2545. รายงานวิจัยโครงการวิจัยตลาดขมิ้นชันและกวาวเครือ. ภาควิชา  
เภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 6-8.

Abraham, T.J. and R. Manley. 1995. Luminous and non-luminous *Vibrio harveyi*  
associated with shell disease in cultured *Penaeus indicus*. **J. Aqualculture in  
the Tropics**. 10(3): 273-276.

\_\_\_\_\_ and S.A. Shanmugam. 1996. Bacteriological investigations in pond reared *Penaeus  
indicus* with multiple disease syndrome. **Cheiron** 25 (1-2): 9-17.

Anderson, I.G., M.N. Shadmudin, M. Shariff and G. Nash. 1988. Bacterial septicemia in  
juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, culture in Malaysia brackishwater pond. **Asia  
Fish Sci.** 2: 93-103.

Anonymous. 2003. Anticancer Potential of Turmeric. **Alternative Medicine Alert**. Sept.

Antony, S., R. Kuttan and G. Kuttan. 1999. Immunodulatory activity of curcumin.  
**Immunol.Invest.** 28 (5-6): 291-303.

Araújo, C.A.C. and L.L. Leon. 2001. Biological Activity of Curcuma longa L. **Mem. Inst.  
Oswaldo Cruz**. 96 (5): 723-728.

Austin, B. and D.A. Austin. 1987. **Control of Bacterial Fish Diesase**. Ellis Horwood,  
Chichester.

Banerjee, A. and S.S. Nigam. 1978. In Vitro Anthelmintic Activity of the Essential Oil Derived  
from the Various Species of the Genus Curcuma Linn. **Sci. Cult.** 44: 503.

Bauchau, A.G. 1981. Crustaceans. pp. 385-420. *In* N.A. Ratcliffe and A.F. Rowley,(eds.).  
Invertebrate Blood Cells. **Vol. 2, Academic Press**, London.

- Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris and M. Tenckhoff. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **J. Clinical Pathology**. 45: 493-496.
- 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.
- Buamann, P., L. Baumann and M. Mandell. 1971. Taxonomy of marine bacteria: the genus *Benekea*. **J. Bacteriol.** 107: 268-294.
- Caichompoo, W. 1999. **Antimicrobial Activity of Volatile Oil and Curcuminoids from *Curcuma longa***. M.S. thesis, Mahidol University.
- Carol, O.T., F. Hickman, G.V. Pierce and L.F. Mendoza. 1982. Diarrhea Associated with *Vibrio fluvialis* in the United States. **J. Clinical Microbiology**. 16 (5): 991-992.
- Chang, I.M. and W.S. Woo. 1980. Screening of Korean Medicinal Plant for Antitumor Activity. **Arch. Pharm.Res.** 3 (2): 75-78.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement**. 28 (1).
- 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. Exp.Biol.** 6: 232-247.
- Dixit, R.S. and S.L. Perti. 1963. Indigenous Insecticide III Insecticidal Properties of some Medicinal and Aromatic Plants. **Bull.Reg.Res.Lab.**, Jammu, India 1: 169-172.
- Dore, I. and C. Frimodt. 1987. **An Illustrated Guide to Shrimp of the World**. Osprey Books.
- Egusa, S. 1992. **Infectious Diseases of Fish**. Oxonian Press, New Delhi, India.

- Escarlan, D.P. and E.O. Sinolinding. 1996. Vibriosis in black tiger shrimps (*Penaeus monodon*) at DOLE Seafresh [Sarangani Province, Philippines], pp. 135-147. *In Philippine Society of Microbiology Annual Convention*, Iligan (Philippines).
- Farnsworth, N.R. and N. Bunyapraphatsara. 1992. **Thai Medicinal Plants :Recommended for Primary Health Care System**. Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok. P. 130-138
- Faruque, S.M. and G.B. Nair (editors). 2008. ***Vibrio cholerae: Genomics and Molecular Biology***. Caister Academic Press.
- Firouzi, R., M. Azadbakht and A. Nabinedjad. 1998. Anti-listerial activity of essential oils of some plants. **J. Appl. Animal Res.** 14 (1): 75-80.
- Fontaine, C.T. and D.V. Lightner. 1975. Cellular response to injury in penaeid shrimp. **Mar. Fish. Rev.** 37: 4-19.
- Frerichs, G.N. and S.D. Millar. 1993. **Manual for the Isolation and Identification of Fish Bacterial Pathogens**. Pisces Press, Stirling.
- Ganiger, S., H.N. Malleshappa, H. Krishnappa, G. Rajashekhar, V. Ramakrishna Rao and F. Sullivan. 2007. A two generation reproductive toxicity study with curcumin, turmeric yellow, in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**. 45: 64–69.
- Godhwani, J.L. and J.B. Gupta. 1980. **Modification of Immunological Response by Garlic Guggal and Turmeric: an Experimental Study in Animal**. Abstract 13 th Ann. Conf. Indian Pharmacol. Soc., Jammu-Tami.
- Govindarajan, V.S. 1980. Turmeric – Chemistry, Technology and Quality. **Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.** 12 (3): 199-103.

- Gupta, R.K., L. Balasubrahmanyam. 1998. The turmeric effect. **World Patent Information**. 20: 185-191.
- Haeckel, E. 1857. Über die Gewebe des Fluskrebses. **Archives Anatomy and Physiology**. 24: 469-568.
- Hikino, H. 1985. Antitheatotoxic Activity of Crude Drugs. **Yakugaku Zasshi**. 105 (2): 109-118.
- Holthuis, L.B. 1980. **FAO A species Catalogue Vol.1, Shrimp and Prawns of the World**. Food and Agriculture Organization of the United Nation.
- Hose, J.E., G.E. Martin, V.A. Nguyen, J. Lucas and T. Rusentein. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocytes. **Biol. Bull. Mar. Biol.** 173 (1): 178-187.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and A.A. Gerard. 1990. A decapoda hemocyte classification scheme integrating morphology cytochemistry and function. **Biol. Bull.** 178: 53-45.
- Ingis, V., R.J. Roberts and N.R. Bromage. 1993. **Bacterial Diseases of Fish**. Institute of Aquaculture. The University Press, Cambridge.
- Iversen, E. and K. Hale. 1992. **Aquaculture sourcebook. A guide to North American Species**. 1<sup>st</sup> ed. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Jackson, C.L. and A.E. Menke. 1882. XXVIII – Turmeric oil – Turmerol. *Cited J.W,*  
Purseglove, E.G. Brown C.L. Green and S.R.J. Robbins. 1981. **Turmeric.,Species Vol II. Tropical Agriculture Series**. Longman Inc., New york.
- Janssen, U. 1996. **Investigations on Vibrionaceae in Wholesale and Retail Seafood and their Importance for Human Health**. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Germany.

- Jayaprakasha, G.K., L. Jagan Mohan Rao, K.K. Sakariah. 2005. Chemistry and biological activities of *C. longa*. **Trends in Food Science & Technology**. 16: 533–548.
- Johansson, M.W. and K. Soderhall. 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish hemocytes. **J. Comp. Physiol. B**. 156: 175-181.
- Karunasagar, I., S.K. Otta and I. Karunasagar. 1998. Monodon baculovirus (MBV) and bacterial septicemia associated with mass mortality of cultivated Shrimp (*Penaeus monodon*) from the east coast of India. **Indian J. Virol**. 14 (1): 27-30.
- Klein, J. 1982. **Immunology: The Science of Self-nonsell Discrimination**. USA: A Willes interscience publication.
- Lavilla-Pitogo, C.R., L.J. Albright, M.G. Paner and N.A. Sunaz. 1992. Studies on the source of luminescent *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon* hatcheries, pp. 157-164. In M. Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Arthur (eds.). **Diseases in Asian Aquaculture K**. Fish Health Section Asian Fisheries Society, Bali, Indonesia.
- Lawhavinit, O., W. Surachetpong, B. Inthasri1 and N. Areechon. 2006. Efficiency of chitosan to *Vibrio* spp. isolated from diseased black tiger shrimp, *Penaeus monodon* fabricius in Thailand. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**. 40: 235 – 241.
- Lee, K.K., S.R. Yu, T.I. Yang, P.C. Liu and F.R. Chen. 1996a. Isolation and Chracterization of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. **Lett. Appl. Microbiol**. 22 (2): 111-114.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1996b. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Curr. Microbiol**. 32 (4): 229-231.



- Lei, C.H., L.Y. Hsieh and C.K. Chen. 1989. Effect of salinity on the oxygen consumption and ammonia-N excretion of young juvenile of the grass shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. **Bull. Zool. Acad. Sinica**. 28: 245-256
- Liao, C., S. Mao-Sen and C. Cheng-Fang. 1992. Diseases of *Penaeus monodon* in Taiwan : a review from 1977 to 1991. pp. 132-133. In W. Fulks and K.L. Main (eds.). **Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States**. Proceedings of workshop in Honolulu, Hawaii.
- Liu, P.C., K.K. Lee, K.C. Yui, G.H. Kou and S.N. Chen. 1996. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. **Curr. Microbiol.** 33 (2): 129-132.
- Liu, C.H. and Jiann-Chu Chen. 2004. Effect of Ammonia on Immune Response of White Shrimp *Litopenaeus vannamei* and Its Susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunol.** 16: 321-334.
- Luangtongkum S., K. Saitanu and K. Poonsuk. 1983. Investigation of *Vibrio* spp. in marine animals. **J. Vet. Res.** 14: 157-158.
- Lutomoski, J., B. Kezia and W. Debska. 1974. Effect of alcohol extract and active ingredient from *Curcuma longa* on bacteria and fungi. **Planta Med.** 26 (1): 9-19.
- Manuchair, E. 2001. **Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine**. CRC Press, New York. P. 159-160.
- Martin, G.G. and L. Graves. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. **J. Morphol.** 185: 339-348.
- \_\_\_\_\_, D. Poole, 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 Relation of important Natural Pigments.** Reinhold Publishing.

Mazumber, A., K. Raghavan, J. Weinstein, K.W. Kohn and Y. Pommer. 1995. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type - 1 Integrase by Curcumin. **Biochem Pharmacol** 49: 1165-1170.

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.

Meghal, S.K. and M.C. Nath. 1962. Effect of Spice Diet on the Intestinal Synthesis of Thiamine in the Rats. Indian. **J. Exp. Biol.** 9 (2): 167-169.

Mohammad, K. Putting Today's Finest Herbal and Nutritional Supplements in the Hands of the Medical Professional. **MEDI-PLEX quarterly report volume 4 | edition 1.**

Nash, G., C. Nithimathachoke, C. Tungmandi, A. Arkarjamorn, P. Prathapipat and P. Rumthaveesub. 1992. Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in Thailand, pp. 143-155. In I.M.Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Arthur (eds.). **Disease in Asian Aquaculture I.** Fish Health Section, Asia fisheries Society, Manila, Philippines.

Noga, E.J., T.A. Arroll and Z. Fan. 1996. Specificity and some physicochemical characteristics of the antibacterial activity from blue crab *Callinectes sapidus*. **Fish & Shellfish Immuno.** 6: 403-412.

Paolinelli, S.T., R. Reen and T. Moraes-Santos. 2006. *Curcuma longa* ingestion protects *in vitro* hepatocyte membrane peroxidation. **Journal of Pharmaceutical Sciences.** 42: 429-435.

Pederson, K., I. Dalsgaard and J.L. Larsen. 1997. *Vibrio damsela* associated with disease fish in Denmark. **Appl. Environ. Microbiol.** 63 (9): 3711-3715.

- Perazzolo, L.M. and M.A. Baracco. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. **Dev. Comp. Immunol.** 21: 385-395.
- Perez Farfante, I. and B. Kensley. 1997. **Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World. Key and Diagnoses for the Families and Genera.** Memories du Museum National. Paris, France.
- Persson, M., A. Ver and K. Soderhall. 1987. Encapsulation of foreign particles in vitro by separated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus*. **Cell. Tiss. Res.** 247: 409-415.
- Pitakvongsaporn, P. 2000. **The Study of Antifungal Activity, Stability and Skin Irritation of Tuemic Cream.** M.S. thesis, Mahidol University.
- Prucksunnand, C., S. Wimolwatanapun, N Nilvises, A. Prijavudhi and B. Wannavirakul. 1987. **Effect of Long Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) on Blood Chemistry before and after Four Weeks Period of Treatment.** Mahidol University Annual Research Abstracts and Bibliography of Non Formal Publication. 14: 159.
- Purseglove, J.W., E.G. Brown, C.L. Green and S.R.J. Robbins. 1981. **Turmeric., Species Vol II. Tropical Agriculture Series.** Longman Inc., New york.
- Radha, K. M., A. K. Singh, J. Gaddipati, R. C. Srimal. 2006. Multiple biological activities of curcumin: A short review. **Life Sciences.** 78: 2081–2087.
- Raintree Nutrition. 2004. Turmeric (*Curcuma longa*). Tropical plant database. Available source: <http://www.rain-tree.com/tumeric.htm>. March 27, 2009.
- Rao, D.S., N.C. Sekhara, M.N. Satyanarayana and M. Srinivasan. 1970. Effect of Curcumin on Serum and Liver Cholesterol Levels in the Rat. **J. Nutr.** 100 (11):1307-1315.

- 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.
- Reddy, A.C. and B.R. Lokesh. 1994. Effect of dietary tumeric (*Curcuma longa*) on iron induced lipid peroxidation in rat liver. **Food Chem. Toxicol.** 32 (3): 279-283.
- Rouseff, R.L. 1988. High Performance Liquid Chromatographic Separation and Spectral Characterization of the pigment in Turmeric and Annatto. **J. Food.Sci.** 53 (6): 1823-1826.
- Ruby, A.J., G. Kuttan, K. Dinesh Babu, K.N. Rajasekharah and R. Kuttan. 1995. Anti-Tumor and Antioxidant Activity of Natural Curcuminoid. **Cancer Letters**. 94: 79-83.
- Ruangpan, L. and T. Kitao. 1991. *Vibrio* Bacteria Isolated from Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. **J. Fish Diseases**. 14: 383-388.
- Ruangpan, L. 1995. **Studies on Marine *Vibrio* Isolated from Cultured Shrimp (*Penaeus monodon*) In Thailand**. Kagoshima University, Kagoshima, Japan.
- Ryan, K.J. and C.G. Ray (editors). 2004. **Sherris Medical Microbiology**. 4<sup>th</sup> ed. McGraw Hill.
- Samarasinghe, K. and C. Weng. 2002. Tumeric (*Curcuma longa*) and mannaoligosaccharide as antibiotic replacers in broiler diets. Available Source: <http://www.zil.ethz.ch/news/posterpresentation%2005/5%20C%20Wenk-INWpdf>. Jan 17, 2005.
- 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.

- Shankar, T.N.B., N.V. Shantha, H.P. Remesh, I.A.S Murthy and V.S. Murthy. 1980. Toxicity Studies on Turmeric (*Curcuma longa*) Acute Toxicity Studies in Rat, Guinea Pigs and Monkey. **Indian J. Exp. Biol.** 18 (1): 73-75.
- Sharma, R.A., A.J. Gescher and W.P. Steward. 2005. Curcumin: The story so far. **European Journal of Cancer.** 41: 1955–1968.
- Sindermann, C.J. 1977. **Disease Diagnosis and Control in American Marine Aquaculture.** Amsterdam Oxford, New York.
- Smith, G.C. and J.R. Merkel. 1982. Collagenolytic activity of *Vibrio vulnificus* : Potential contribution to its invasiveness. **Infect. Immun.** 35 (3): 1155-1156.
- Smith, L.L., P.G. Lee, A.L. Lawrence and K. Strawn. 1985. Growth and digestibility by three size of *Penaeus vannamei* Boone: effect of dietary protein and protein source. **Aquaculture.** 46: 85-96.
- Smith, V.J. and K. Soderhall. 1986. Cellular immune mechanism in the crustacea. **Symposium of the Zoological Society of London.** 56: 59-79.
- Soderhall, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. **Annu. Rev. J. Fish. Dis.** 2: 3-23.
- Soderhall, K. and L. Hall. 1984. Lipopolysacchride induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish hemocyte lysate. **Biochem. Biophys. Acta.** 797: 99-104.
- Srinivasan, K.R. 1953. **A Chromatographic Study of the Curcuminoids in *Curcuma longa* Linn.** Cited J.W. Purseglove, E.G. Brown, C.L. Green and S.R.J. Robbins. Turmeric, Spices Vol II. Longman Inc., New York.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1980. Principle and procedures of Statistics 2<sup>nd</sup> Edition. **McGraw-Hill Book Co Inc.**, New York, USA.

- Sung, H., Y.L. Yung and Y.L. Song. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the black tiger prawn *Penaeus monodon* via immunostimulation. **J. Crust. Biol.** 16 (2): 278-284.
- Supamattaya, K., J. Kasornchadra and S. Boonyaratpalin. 1994. Comparative study of simple methods for the diagnosis of yellow head baculovirus in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 16 (1): 37-48.
- Tamplin, M.L. and G.M. Capers. 1992. Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of Gulf Coast oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to seawater disinfected with U.V. light. **Appl. Environ. Microbiol.** 58 (5): 1506-1510.
- Tunkijjanukij, S. and J.A. Olafsen. 1998. Sialic acid-binding lectin with antibacterial activity from the Horse mussel: further characterization and immunolocalization. **Dev. Comp. Immunol.** 22 (2): 139-150.
- Vargas-Albores, F. 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular response. **J. Mar. Biotechnol.** 3: 153-156.
- Wannaprapha, M. **Effects of Turmeric Extract (*Curcuma longa* Linn.) on Survival and Growth Rates of Giant Freshwater Prawn Larvae (*Macrobrachium rosenbergii* de Man).** Kasetsart University 20
- Wichit, A. 2001. **Effect of Curcumin and Coenzyme Q10 as Antioxidants in Red Blood Cells of  $\beta$  – Thalassemia/HbE Patients.** M.S. thesis, Mahidol University.
- World Health Organization (WHO). 1999. **WHO monographs on selected medicinal plants.** Vol. 1.
- Yutaka, Y., M. Satomi and H. Oikawa. 2006. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. **International Journal of Food Microbiology.** 111: 6–11.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก  
สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ



## อาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (Difco™)

Nutrient Agar (NA) + 1.5% NaCl

|              |    |      |
|--------------|----|------|
| Beef extract | 3  | กรัม |
| Peptone      | 5  | กรัม |
| NaCl         | 15 | กรัม |
| Agar         | 15 | กรัม |
| น้ำกลั่น     | 1  | ลิตร |
| pH 6.5       |    |      |

ละลายส่วนผสมแต่ละส่วนเข้าด้วยกัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

Thiosulphate citrate bile Salt Sucrose Agar (TCBS)

|                    |      |      |
|--------------------|------|------|
| Yeast extract      | 5    | กรัม |
| Tryptone           | 5    | กรัม |
| Peptone            | 5    | กรัม |
| Sodium citrate     | 10   | กรัม |
| Sodium thiosulfate | 10   | กรัม |
| Oxgall             | 8    | กรัม |
| Sucrose            | 20   | กรัม |
| Sodium chloride    | 10   | กรัม |
| Ferric citrate     | 1    | กรัม |
| Thymol blue        | 0.04 | กรัม |
| Bromothymol blue   | 0.04 | กรัม |
| Agar               | 15   | กรัม |
| น้ำกลั่น           | 1    | ลิตร |

ต้มอาหารเลี้ยงเชื้อให้เดือดและละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยไม่ต้องนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

#### Mueller Hinton Agar (MHA)

|                       |      |      |
|-----------------------|------|------|
| Beef Extract Powder   | 2    | กรัม |
| Acid Digest of Casein | 17.5 | กรัม |
| Starch                | 1.5  | กรัม |
| Agar                  | 17   | กรัม |
| น้ำกลั่น              | 1    | ลิตร |

ละลายส่วนผสมแต่ละส่วนเข้าด้วยกัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

#### Plate Count Agar (PCA)

|                     |     |      |
|---------------------|-----|------|
| Peptone from casein | 5   | กรัม |
| Yeast extract       | 2.5 | กรัม |
| Glucose             | 1   | กรัม |
| Agar                | 14  | กรัม |
| น้ำกลั่น            | 1   | ลิตร |

ละลายส่วนผสมแต่ละส่วนเข้าด้วยกัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

## 2. อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด K-199 และสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

### 2.1 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ K-199

#### 2.2.1 M-199

อาหารเลี้ยงเชื้อ Medium-199 1 ซอง +  $\text{NaHCO}_3$  2.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น  
ปรับปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร

### 2.2.2 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   | กรัม |

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

### 2.2.3 NaCl

ละลาย NaCl 1 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

### 2.2.4 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

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

### 2.2.5 L-glutamine

L-glutamine 0.015 กรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง  
0.22  $\mu\text{m}$

## 2.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ K-199 จำนวน 100 มิลลิลิตร

### 2.3.1 ผสมสารละลายตามลำดับดังนี้

|              |    |           |
|--------------|----|-----------|
| M-199        | 50 | มิลลิลิตร |
| Salt mixture | 10 | มิลลิลิตร |
| NaCl         | 10 | มิลลิลิตร |

|                                      |       |           |
|--------------------------------------|-------|-----------|
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 10    | มิลลิลิตร |
| L-glutamine                          | 1     | มิลลิลิตร |
| Hepes                                | 0.238 | กรัม      |

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

2.3.2 ปรับ pH ด้วย HCl หรือ NaOH ให้อยู่ในช่วง 7.3 – 7.6

2.4 การเตรียมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

10% tri-Sodium Citrate Dyhydrate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ K-199

### 3. การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ Phenoloxidase specific activity

3.1 สารละลาย cacodylate buffer pH 7.4

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

3.2 L-dihydroxyphenyl alanine (L-DOPA)

L-dihydroxyphenyl alanine 4 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

3.3 สารละลายทริปซิน

เตรียมจาก 0.1% ทริปซินใน cacodylate buffer

#### ภาคผนวก ข

การคำนวณปริมาณเม็ดเลือดและการคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase

## 1. การคำนวณปริมาณเม็ดเลือด

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

## 2. การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase

$$\begin{aligned}
 \text{กำหนดให้ ค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลง 0.001} &= 1 \text{ unit} \\
 \text{Phenoloxidase specific activity} &= \text{unit/min/mg protein}
 \end{aligned}$$

#### ภาคผนวก ก

การเตรียมความชุ่มชื้นมาตรฐานและความกว้างของ inhibition zone เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบการทดสอบความไวต่อการถูกทำลายของเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะ

## 1. การเตรียมความขุ่นมาตรฐาน (McFarland nephelometer Standards)

การเตรียมความขุ่นมาตรฐานตามวิธีของ McFarland (McFarland nephelometer) โดยใช้กรดซัลฟูริก และแบเรียมคลอไรด์ มีขั้นตอนการเตรียมดังต่อไปนี้

1.1 เตรียม 1% ของ  $\text{H}_2\text{SO}_4$  บริสุทธิ์

1.2 เตรียม 1% aqueous solution ของ  $\text{BaCl}_2$

1.3 ผสมสารในข้อ 1 และ 2 ในหลอดทดสอบใหม่ๆ ที่ไม่มีรอยฝ้าขาว และต้องล้างให้สะอาด การผสมสารทั้ง 2 ในปริมาณเท่าใดขึ้นอยู่กับความต้องการว่าจะเตรียมเป็น McFarland tube number ที่เท่าใด ถ้าเตรียม tube number สูงขึ้นก็จะมีความขุ่นมากขึ้น ซึ่งจะเทียบได้กับปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียมากขึ้น

ในการผสม 1%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  และ 1%  $\text{BaCl}_2$  ปริมาณเท่าใดในตารางข้างล่าง

ตารางผนวกที่ ค1 การเตรียมความขุ่นมาตรฐาน (McFarland Standards)

| Tube number                               | 0.5  | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10 |
|-------------------------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| 1% $\text{BaCl}_2$ (ml)                   | 0.05 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1  |
| 1% $\text{H}_2\text{SO}_4$ (ml)           | 9.95 | 9.9 | 9.8 | 9.7 | 9.6 | 9.5 | 9.4 | 9.3 | 9.2 | 9.1 | 9  |
| Approx.cell density ( $\times 10^8$ / ml) | 1.5  | 3   | 6   | 9   | 12  | 15  | 18  | 21  | 24  | 27  | 30 |



## 2. ความกว้างของ inhibition zone เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบการทดสอบความไวต่อการถูกทำลายของเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะ

ตารางผนวกที่ ค2 ความกว้างของ inhibition zone เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบการทดสอบความไวต่อการถูกทำลายของเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะ (CLSI, 2008)

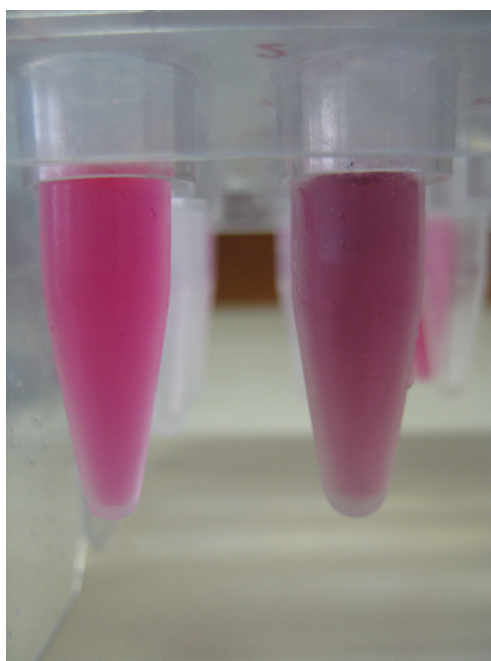
| Group                     | Antimicrobial Agent           | Disk content     | Zone Diameter,Nearest |         |      |
|---------------------------|-------------------------------|------------------|-----------------------|---------|------|
|                           |                               |                  | Whole mm              |         |      |
|                           |                               |                  | R                     | I       | S    |
| Penicillins               |                               |                  |                       |         |      |
| A                         | Ampicillin                    | 10 μg            | ≤ 13                  | 14 - 16 | ≥ 17 |
| Tetracyclines             |                               |                  |                       |         |      |
| C                         | Tetracycline                  | 30 μg            | ≤ 14                  | 15 - 18 | ≥ 19 |
| Folate pathway inhibitors |                               |                  |                       |         |      |
| B                         | Trimethoprim-sulfamethoxazole | 1.25/23.75 μg    | ≤ 10                  | 11 - 15 | ≥ 16 |
| C                         | Sulfonamides                  | 250 μg or 300 μg | ≤ 12                  | 13 - 16 | ≥ 17 |
| Phenicol                  |                               |                  |                       |         |      |
| C                         | Chloramphenicol               | 30 μg            | ≤ 12                  | 13 - 17 | ≥ 18 |

### ภาคผนวก ง

ภาพการเก็บตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาว



ภาพผนวกที่ ๑1 การเก็บตัวอย่างเลือดจากบริเวณ ventral sinus



ภาพผนวกที่ ๑2 ตัวอย่างน้ำเลือดที่อยู่ในสารป้องกันการแข็งตัว (ซ้าย: K-199 ที่มีการเติมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด, ขวา: น้ำเลือดที่อยู่ใน K-199 ที่มีการเติมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด)

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

|                                |                                         |
|--------------------------------|-----------------------------------------|
| ชื่อ –นามสกุล                  | นายพรชัย สิ้นเจริญโกไคย                 |
| วัน เดือน ปี ที่เกิด           | วันที่ 30 มกราคม 2528                   |
| สถานที่เกิด                    | จังหวัดสระบุรี                          |
| ประวัติการศึกษา                | วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน   | -                                       |
| สถานที่ทำงานปัจจุบัน           | -                                       |
| ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ | -                                       |
| ทุนการศึกษาที่ได้รับ           | -                                       |