ผลของการเสริมใบมะรุมในอาหารต่อการเติบโต การรอด
และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*

นางสาวฤทัย โลทะกะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EFFECTS OF DRUMSTICK (*Moringa oleifera*) LEAVES SUPPLEMENTED DIETS ON GROWTH, SURVIVAL AND RESISTANCE AGAINST *Vibrio harveyi* OF WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei*

Miss Rutai Lotaka

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการเสริมใบมะรุมในอาหารต่อการเติบโต การรอด และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*
โดย	นางสาวฤทัย โลทะกะ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ)

ฤทัย โลทะกะ : ผลของการเสริมใบมะรุมในอาหารต่อการเติบโต การรอด และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*. (EFFECTS OF DRUMSTICK (*Moringa oleifera*) LEAVES SUPPLEMENTED DIETS ON GROWTH, SURVIVAL AND RESISTANCE AGAINST *Vibrio harveyi* OF WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei*. อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, 81 หน้า

ทำการสกัดใบมะรุม (*Moringa oleifera*) ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* ด้วยวิธี Disc diffusion assay ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดใบมะรุมด้วย 95% เอทานอล สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* ได้ที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุม 6.25 mg/ml และสามารถต้านการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุม 800 mg/ml หลังจากนั้นทำการศึกษาผลของอาหารที่เสริมใบมะรุมที่ระดับต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงกุ้งขาวเพื่อศึกษาผลของใบมะรุมต่อการเติบโต การรอด การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* ผลการศึกษาหลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ พบว่า กุ้งในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารที่ระดับ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการเติบโตสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อัตราการรอดของกุ้งขาวในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ค่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม และค่าการทำงานของฟีนอลออกซิเดส มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 9 แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในการทดลองครั้งที่ 2 เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วสุ่มกุ้งเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* ที่ความเข้มข้นเชื้อ 1×10^7 cfu/ml พบว่า กุ้งในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหาร มีค่าอัตราการตายสะสมต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากการศึกษานี้ สามารถสรุปได้ว่าการเสริมใบมะรุมในอาหาร ทำให้กุ้งขาวมีความต้านทานต่อการติดเชื้อ *V. harveyi* ได้

สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา : 2555 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5272513023 : BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : *Litopenaeus vannamei* / *Moringa oleifera* / growth / immune response

RUTAI LOTAKA : EFFECTS OF DRUMSTICK (*Moringa oleifera*) LEAVES SUPPLEMENTED DIETS ON GROWTH, SURVIVAL AND RESISTANCE AGAINST *Vibrio harveyi* OF WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei*. ADVISOR : ASSOC.PROF. SOMKIAT PIYATIRATITIVORAKUL, Ph.D., CO-ADVISOR : ASSOC.PROF. SIRIRAT RENGPIPAT, Ph.D., 81 pp.

In vitro antibacterial activity of ethanol extract of *Moringa oleifera*' s leaves was conducted. Disc diffusion assay was used to assess effect of the extract on *Vibrio harveyi*. The result showed that ethanol extract could inhibit growth of *V. harveyi* at 6.25 mg/ml. Effect of *M. oleifera*' s leaves powder was studied by supplementing to diets on growth, immune response and disease resistant of white shrimp were investigated *in vivo*. Shrimp were fed diets containing 0, 1, 5 and 10 percent *M. oleifera*' s leaves powder after 9 weeks rearing period. Results showed the final weights and growth performance of shrimp fed diets containing 5 and 10 percent *M. oleifera*' s leaves powder were significantly higher than those of the control. Survival rates of shrimp fed diets containing 10 percent *M. oleifera*' s leaves powder were not different from the control group. However, shrimp raised on diets supplemented with *M. oleifera*' s leaves powder 5 and 10 percent showed slightly improvement in immune parameters, such as Total Hemocyte Count and Phenoloxidase activity after 9 weeks of rearing. In a separate experiment, shrimp were challenged with *V. harveyi* after 6 weeks of diets testing. The results showed the cumulative mortality of shrimp that fed diets containing *M. oleifera*' s leaves powder were significantly lower than that of control group. Base on the present data, *M. oleifera*' s leaves powder supplemented diet is a potential prophylactic agent against *V. harveyi* infection in white shrimp.

Field of Study : BIOTECHNOLOGY Student's Signature ……

Academic Year : 2012 Advisor's Signature ……

Co-advisor's Signature ……..

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม เป็นอย่างสูง ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ส่งผลให้การทำวิทยานิพนธ์นี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา และดร.ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาจุลชีววิทยา และศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณเสรี ดอนเหนือ เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้านตลอดมา

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเลทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวก และแนะนำการใช้เครื่องมือต่างๆ

ขอขอบพระคุณ คุณรัจนา บุญมี คุณกมล รอดอยู่ คุณแอนนา วัฒนาสัจจา และเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ห้อง 408 ตึกแถบ นีละนิธิ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงาน และให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบคุณ คุณวรพรรณ มณีอินทร์ ผู้เป็นเพื่อนร่วมงาน ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณทุกๆท่าน ที่ช่วยเหลือในการทำงาน และให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้าเสมอมา กระทั่งการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงด้วยดี และความดีอันเกิดจากการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้แด่ บิดา มารดา อาจารย์ทุกท่าน ญาติพี่น้อง และผู้มีพระคุณทั้งหลาย ข้าพเจ้ามีความซาบซึ้งในความกรุณาอันดียิ่งจากทุกท่าน ทั้งที่กล่าวนามและไม่กล่าวนาม ขอขอบพระคุณทุกท่านมา ณ โอกาสนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย……	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……..	จ
กิตติกรรมประกาศ……	ฉ
สารบัญ……..	ช
สารบัญตาราง……...	ฌ
สารบัญรูป……	ฎ
บทที่	
1 บทนำ…….	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…….	4
2.1 ชีววิทยาของกุ้งขาว……	4
2.2 โรค Vibriosis……	6
2.3 ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน…….	7
2.4 มะรุม (*Moringa oleifera*)……..	10
3 วิธีดำเนินการวิจัย…….	18
3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่สำคัญ……..	18
3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย……	18
3.1.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย…….	19
3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย…….	20
3.3 สถานที่ที่ใช้ในการทำงานวิจัย……	20
3.4 การดำเนินงานวิจัย…….	20
3.4.1 รวบรวมใบมะรุมและเตรียมสารสกัดใบมะรุมด้วย 95% เอทานอล……	20
3.4.2 หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดใบมะรุมที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ในระดับหลอดทดลอง……	21
3.4.3 ศึกษาผลของใบมะรุมต่อการเติบโต การรอด และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวในระดับตู้ทดลอง……	23
3.4.4 ศึกษาผลของใบมะรุมต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว หลังจากเหนี่ยวนำให้กุ้งเกิดโรค Vibriosis ด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ในระดับตู้ทดลอง...	29

หน้า

บทที่

3.4.5 วิเคราะห์ผลทางสถิติ…….. 29
4 ผลการทดลอง…….. 30
4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดใบมะรุม (Screening Test; disc diffusion assay)…… 30
4.2 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบมะรุมในการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC)…… 32
4.3 ผลการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบมะรุมในการกำจัด *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (Minimum Bactericidal Concentration: MBC)… 33
4.4 ผลของการเสริมใบมะรุม (*Moringa oleifera*) ในอาหารต่อการเติบโตและการรอดของกุ้งขาว (การทดลองที่ 1)…… 35
4.5 ผลของการเสริมใบมะรุม (*Moringa oleifera*) ในอาหารต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว (การทดลองที่ 1)…… 39
4.6 ผลของการเสริมใบมะรุม (*Moringa oleifera*) ในอาหารต่อการเติบโตและการรอดของกุ้งขาว (การทดลองที่ 2)…… 40
4.7 การทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (Challenge test)…….. 43
5 วิจารณ์ผลการทดลอง……... 48
6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ……. 57
รายการอ้างอิง…… 60
ภาคผนวก…….. 71
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์…….. 81

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	วิเคราะห์สารอาหารในฝักมะรุม ใบมะรุมสดและใบมะรุมแห้ง แสดงปริมาณที่มีอยู่ใน 100 ส่วน……	11
2-2	สรรพคุณทางยาในแต่ละส่วนของต้นมะรุม……..	13
2-3	Phytochemical constituents ที่แยกได้จากส่วนต่างๆของต้นมะรุม……..	15
3-1	ส่วนประกอบในอาหารทดลอง(g kg-1) สำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)……....	24
3-2	ค่าปัจจัยที่เหมาะสมในการตรวจสอบคุณภาพน้ำและการตรวจวัด…….	26
4-1	ประสิทธิภาพของสารสกัดใบมะรุมต่อการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (Screening Test; disc diffusion assay)……..	31
4-2	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร……...	32
4-3	จำนวนเชื้อที่เวลา 24 ชั่วโมง Percent reduction of microorganism และค่า log reduction…….	34
4-4	น้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม) ของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์……..	35
4-5	อัตราการเติบโตโดยน้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) การเพิ่มขึ้นโดยน้ำหนักเฉลี่ยและอัตราการเติบโตโดยน้ำหนักต่อสัปดาห์ของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง…..	36
4-6	อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง……	38
4-7	อัตราการรอดของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์….	38
4-8	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมใบมะรุมในระดับที่แตกต่างกัน…….	39
4-9	การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg protein) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมใบมะรุมในระดับที่แตกต่างกัน……...	40
4-10	น้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม) ของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์……	41

หน้า

ตารางที่

4-11	อัตราการเติบโตโดยน้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) การเพิ่มขึ้นโดยน้ำหนักเฉลี่ยและอัตราการเติบโตโดยน้ำหนักต่อสัปดาห์ของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง…..	41
4-12	อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง……..	42
4-13	อัตราการรอดของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์….	43
4-14	ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมใบมะรุมในระดับที่แตกต่างกัน ทั้งก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค……..	44
4-15	การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg protein) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมใบมะรุมในระดับที่แตกต่างกัน ทั้งก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค……..	45
4-16	การตายสะสมของกุ้งขาว ที่ได้รับอาหารที่เสริมใบมะรุมในระดับที่แตกต่างกัน หลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค……..	46
5-1	เปรียบเทียบสภาวะการเลี้ยงกุ้งขาวในการทดลองครั้งที่ 1 และ 2…….	52

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2-1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกุ้งขาว……	5
2-2	โครงสร้างของ phytochemical ที่ได้จากส่วนต่างๆของต้นมะรุม……..	16
3-1	ผงมะรุมบดละเอียด……	21
3-2	สารสกัดใบมะรุมด้วย 95% เอทานอล……	21
4-1	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่เปลี่ยนแปลงไป ระหว่าง 0 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง……..	33
4-2	กราฟแสดงจำนวนเชื้อที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อให้สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้นต่างๆ…….	34
4-3	น้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม) ของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง…….	36
4-4	การตายสะสมของกุ้งขาว ที่ได้รับอาหารที่เสริมใบมะรุมในระดับที่แตกต่างกันหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639……..	46

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบัน ธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแปซิฟิก(*Litopenaeus vannamei*) ได้รับความนิยมจากเกษตรกรมาก หลังจากที่กรมประมงได้อนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อเข้ามาทดลองเลี้ยงในปี พ.ศ. 2545 เพื่อเป็นทางเลือก นอกเหนือจากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ประสบปัญหาผลผลิตตกต่ำอันเป็นผลมาจากการเกิดโรคระบาดในช่วงก่อนปี พ.ศ. 2545 ซึ่งถือเป็นการเพิ่มโอกาสทางการตลาดของกุ้งไทยอีกทางหนึ่ง แต่ในความเป็นจริง แม้ว่ากุ้งขาวแปซิฟิกได้ถูกคัดเลือกพันธุ์ให้ปลอดจากโรคบางชนิด และคาดว่ากุ้งขาวแปซิฟิกจะไม่เป็นโรคเหมือนในกุ้งพื้นเมืองของไทย แต่เมื่อมีการนำมาเลี้ยงในสภาพแวดล้อมเดียวกับกุ้งพื้นเมืองแล้ว ก็มีโอกาสได้รับเชื้อโรคเช่นเดียวกัน (ชัยวุฒิ และคณะ, 2550) นอกจากนี้ ระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของประเทศไทย มีการพัฒนาระบบเป็นการเลี้ยงแบบหนาแน่น (intensive culture) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2530 ซึ่งทำให้เกิดการสะสมของสารอินทรีย์ต่างๆ เกิดความเสื่อมโทรมในระบบการเลี้ยง กุ้งที่เลี้ยงเกิดความเครียดรวมถึงภูมิคุ้มกันลดลง เป็นผลให้เชื้อโรคต่างๆเข้าทำอันตรายต่อกุ้งได้ จึงมีการใช้สารปฏิชีวนะทั้งเพื่อป้องกัน ควบคุมและรักษาโรคที่อาจเกิดขึ้น แต่การใช้สารปฏิชีวนะหรือสารเคมีในระบบการเพาะเลี้ยงก่อให้เกิดการตกค้างในเนื้อสัตว์ ซึ่งสามารถสะสมในตัวกุ้งและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ (นิตยา และคณะ, 2549; วิศิษย์ เกตุปัญญาพงศ์, 2550) เกิดปัญหาด้านการค้ากับต่างประเทศซึ่งให้ความใส่ใจกับปัญหาผลิตภัณฑ์ที่มีสารตกค้างและมีการเฝ้าระวังอย่างเข้มงวด นอกจากนี้การใช้สารปฏิชีวนะหรือสารเคมียังส่งผลเสียต่อคุณภาพน้ำ ทำให้ผลผลิตลดลง ดังนั้นการใช้สมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาจึงเป็นทางเลือกที่ดีที่สุดอีกทางหนึ่งเพื่อทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ เป็นประเภทของยาที่ได้รับการศึกษามากที่สุดในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย ดังนั้นในการพัฒนาสมุนไพรที่มีศักยภาพเพื่อใช้แทนสารปฏิชีวนะ จึงมุ่งเน้นสมุนไพรชนิดที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

(Antibacterial activity) ซึ่งจะเห็นได้จากงานวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรต่อการต้านเชื้อต่างๆเช่น การศึกษาการใช้สารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในการต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* (กิตติมา และคณะ,2550) การศึกษาการใช้อาหารที่เสริมสารสกัดจากใบกระเม็งต่อการต้านเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในปลานิลแดง (Christybapita *et al*., 2007) การศึกษาผลของ carragenans ต่อระบบภูมิคุ้มกันและการต้านทานเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ในกุ้งขาว (Yeh and Chen, 2008) การศึกษาฤทธิ์ในการต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ในกุ้งขาวแปซิฟิกเมื่อให้สารสกัดจากการบูร (Yeh *et al*., 2009) การศึกษาผลของสารสกัด ฟ้าทะลายโจรในการต้านเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล(Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2009) การศึกษาการฉีดสารสกัดจาก *Spirulina platensis* เข้าสู่กุ้งขาวต่อการต้านเชื้อ *Vibrio alginolyticus* (Tayag *et al*.,2010) เป็นต้น

จากการค้นคว้าหาข้อมูลเบื้องต้นพบว่ามะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) เป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการพัฒนาเพื่อใช้ทดแทนสารปฏิชีวนะได้ เนื่องจากมีคุณค่าทางด้านเภสัชศาสตร์ที่น่าสนใจ และมีคุณสมบัติทางยาเกือบทุกส่วนของต้น โดยสรรพคุณทางยาของมะรุมได้แก่ ช่วยในการกระตุ้นระบบหัวใจและการไหลเวียนเลือด ลดระดับคลอเรสเตอรอล มีศักยภาพในการต้านเซลล์มะเร็ง ต้านอาการความดันโลหิตสูง ป้องกันตับจากสารพิษ ต้านโรคแผลในกระเพาะอาหาร ใช้เป็นยาระบาย การอักเสบ อาการปวดตามข้อ มีฤทธิ์ต้านจุลชีพและเชื้อรา และเป็นแหล่งของ antioxidant ธรรมชาติ เช่น Ascorbic acid, Flavonoids, Phenolic และ Carotenoid (Anwar *et al*., 2007) การที่มะรุมมีสาร antioxidant ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการทำหน้าที่รักษาภูมิคุ้มกันโรค โดยจะป้องกันไม่ให้อนุมูลอิสระเข้าทำลายเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ส่งผลให้มะรุมจัดเป็นสมุนไพรที่เสริมภูมิคุ้มกันอีกชนิดหนึ่ง

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้มะรุมในการเลี้ยงวัวเพื่อเพิ่มผลผลิตนมและช่วยให้ระบบการย่อยดีขึ้น (Sánchez *et al*., 2005) จากสรรพคุณข้างต้นจะเห็นว่ามะรุมมีประโยชน์ทั้งต่อมนุษย์และสัตว์ อีกทั้งมะรุมเป็นไม้ยืนต้นที่ปลูกง่าย โตเร็ว ทนแล้ง สามารถปลูกได้ตามบ้านเรือน เนื่องจากยังไม่มีงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้มะรุมในการต้านทานต่อการเกิดโรคและเสริมภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ งานวิจัยจะเสริมใบมะรุมและศึกษาผลต่อกุ้งในสภาพการเลี้ยงจริงเพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็น

ประโยชน์แก่เกษตรกรและเป็นแนวทางการจัดการด้านสุขภาพในการพัฒนาระบบการเลี้ยงกุ้งขาวแปซิฟิกให้ปลอดจากสารตกค้างเพื่อผู้บริโภคต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

ได้อาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมของใบมะรุมที่เหมาะสมในการสร้างภูมิคุ้มกัน การเติบโต และต้านทานต่อโรค Vibriosis ในกุ้งขาวได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาของกุ้งขาว

การจัดลำดับทางอนุกรมวิธานของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Order Decapoda

Suborder Dendrobrachiata

Superfamily Penaeoidea

Family Penaeidae

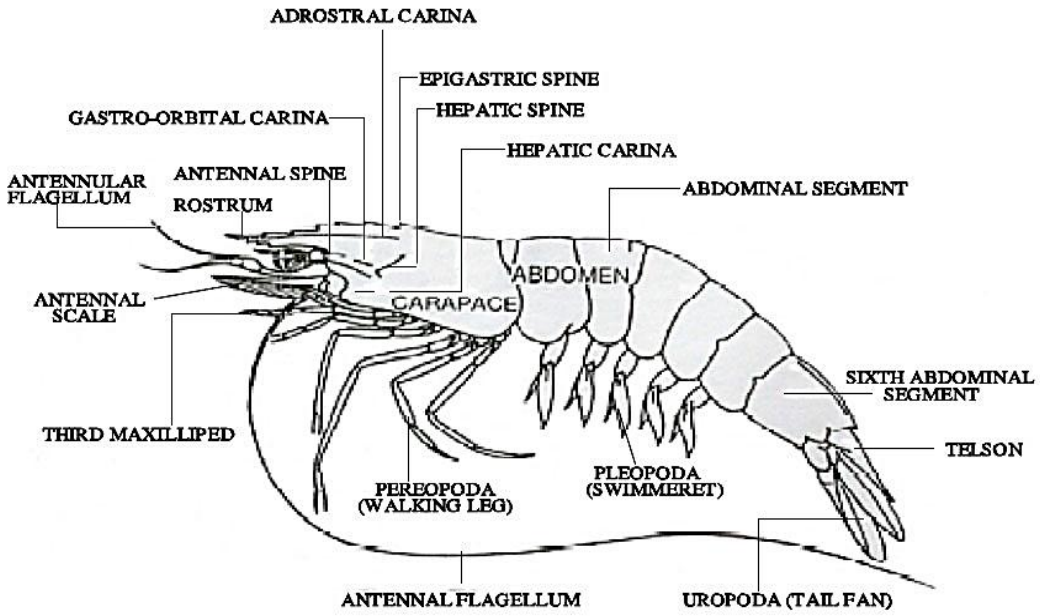
Genus *Penaeues*

Subgenus *Litopenaeus*

Species *vannamei*

กุ้งขาวเป็นสายพันธุ์กุ้งทะเลในกลุ่มแปซิฟิก (Pacific white shrimp) มีชื่อเรียกในหลายภาษา เช่นในภาษาอังกฤษ เรียก Whiteleg Shrimpภาษาฝรั่งเศส เรียก Crevette Pattes Blanches ภาษาสเปน เรียก Camaron Patiblance นอกจากนี้ยังมีชื่อทางการค้าตามสถานที่ที่พบและลักษณะที่ปรากฏ เช่น ในสหรัฐอเมริกา เรียก West coast white shrimp ประเทศเม็กซิโก เรียก Camaron Blance ประเทศโคลัมเบีย เรียก Camaron Caf ประเทศอินโดนีเซีย เรียก Vannamei เป็นต้น ในธรรมชาติ กุ้งขาวมีการกระจายตัวตามแนวชายฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก จากรัฐโซโนรา ประเทศเม็กซิโกไปจนถึงตอนเหนือของประเทศเปรู (Perez-Farfante and Kensley, 1997)ซึ่งภูมิภาคในแถบนี้มีความลึกจากเส้นแนวชายฝั่งประมาณ 70 เมตร ลักษณะของพื้นเป็นโคลนเหมาะแก่การเติบโตและอยู่อาศัยของกุ้งขาว (Dore and Frimodt, 1987) กุ้งขาวที่โต

เต็มวัยจะวางไข่ที่ชายฝั่งเขตร้อน โดย planktonic postlarvae จะอพยพเข้าสู่บริเวณน้ำกร่อย จนกระทั่งทีความยาว 10 - 20 มิลลิเมตร และจะทนต่อความเค็มและอุณหภูมิได้ในช่วงกว้าง (Wickins, 1976) มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายเนื่องจากเป็นกุ้งที่มีความทนทานและแข็งแรง



รูปที่ 2-1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกุ้งขาว

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกุ้งขาว (รูปที่ 2-1) จะมีลำตัว 6 ปล้อง ส่วนหัวและส่วนหางอย่างละ 1 ปล้อง ลำตัวมีลักษณะขาวใส ขามีสีขาว ส่วนปลายหางจะมีสีแดง เปลือกบาง มีขาว่ายน้ำ 5 คู่ เป็นสีขาวข้างในที่ปลายมีสีแดง ส่วนปลายของกรีจะงุ้มลงเล็กน้อย ด้านบนของกรีมีซี่ฟันอยู่ 8 ซี่ และด้านล่างอีก 2 ซี่ กรีจะมีความยาวมากกว่าตาแต่ไม่มากนัก เมื่อนำขึ้นมาจากน้ำ ลำตัวของกุ้งขาวค่อนข้างจะแห้งเร็ว สิ่งที่สังเกตได้เด่นชัดคือ กุ้งขาวจะมีส่วนของลำไส้ที่ชัดเจนเมื่อเทียบกับกุ้งชนิดอื่น (ภิญโญ เกียรติภิญโญ, 2545) กุ้งขาวที่โตเต็มวัยจะมีขนาดที่วัดจากกรีถึงแพนหางประมาณ 230 มิลลิเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 120 กรัม (มัณฑนา ใจเย็น, 2552)

2.2 โรค Vibriosis

โรค Vibriosis หรือ black shell disease, septic hepatopancreatic necrosis, brown gill disease, swollen hindgut syndrome และ luminous bacteria disease (โรคเรืองแสง) เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio*. ได้แก่ *V. harveyi, V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. splendidus* เป็นต้น ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้กุ้งตายในระหว่างการเลี้ยง ซึ่งตามธรรมชาติ เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio*. จะเป็นเชื้อปกติที่พบได้ในตัวกุ้งที่มีสุขภาพดีทั่วไป (Hameed, 1993; Vandenberghe *et al*., 1998) พบได้ตามเหงือก และทางเดินอาหาร แต่จะก่อให้เกิดโรคได้เมื่อสภาวะแวดล้อมต่างๆไม่เหมาะสม เช่น กุ้งเกิดความเครียด สุขภาพกุ้งอ่อนแอ น้ำในบ่อเลี้ยงเน่าเสีย คุณภาพน้ำไม่ดี เป็นต้น สำหรับการแพร่กระจายของโรค Vibriosis มีรายงานการติดเชื้อในหลายประเทศ เช่น ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย ไต้หวัน ออสเตรเลีย (กรวิกา และคณะ, 2551)

Luminous *Vibrio* เป็นสาเหตุของการเกิดโรค luminous vibriosis หรือโรคเรืองแสง (Domrongpokkaphan and Wanchaitanawong, 2006) *V. harveyi* จัดเป็น Luminous *Vibrio* ที่ก่อให้เกิดความเสียหายเป็นอย่างมาก ทำให้อัตราการตายของลูกกุ้งระหว่างการเพาะฟักสูง (Karunasagar *et al*., 1994) *V. harveyi* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นแท่งตรงท่อนสั้น หรือโค้งเล็กน้อย ด้านปลายมน เคลื่อนที่โดยใช้ flagellaที่อยู่บริเวณรอบลำตัว สีโคโลนีของเชื้อเป็นสีเขียวเมื่อเลี้ยงบน Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS) เชื้อชนิดนี้สามารถให้สีเขียวแกมเหลืองโดยปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดจากเอนไซม์ luciferase ซึ่งทำให้เกิดการเรืองแสง *V. harveyi* จะเพิ่มจำนวนตัวอย่างรวดเร็วที่ความเค็ม 10-40 ppt อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส และค่า pH 7-9

อาการของโรค กุ้งจะกินอาหารน้อยลง ลำตัวขุ่น ซี่เหงือกดำ กุ้งจะว่ายน้ำบริเวณผิวน้ำหรือเกยตามขอบบ่อ เมื่อนำเนื้อเยื่อของกุ้งที่ป่วยหรือติดเชื้อมาตรวจจะพบว่าส่วนตับและตับอ่อนถูกทำลายอย่างรุนแรง เกิดความผิดปกติในระบบการย่อยอาหาร นอกจากนี้ยังสังเกตอาการได้ในช่วงกลางคืน เนื่องจากจะพบการเรืองแสงของกุ้งที่ติดเชื้อ

2.3 ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน

ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน เป็นภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติที่มีมาแต่โดยกำเนิด (innate immunity) ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวเองกับสิ่งแปลกปลอม (McKay *et al*., 1969; Ratchiffe *et al*., 1985) แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งแปลกปลอมได้อย่างจำเพาะเจาะจงและจะไม่มีการปรับเปลี่ยนการตอบสนองแม้ว่าจะสัมผัสกับสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นมาหลายครั้งแล้วก็ตาม (Lackie, 1980; Smith and Chisholm, 1992) ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน แบ่งออกเป็น 2 ระบบหลัก (Ratchiffe *et al*., 1985) ได้แก่

- ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ (cellular defenses)
- ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ (humoral defenses)

ซึ่งทั้งระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ (cellular defenses)และระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ (humoral defenses) นี้ จำเป็นต้องทำงานร่วมกัน

2.3.1 ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ (cellular defenses)

ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ จะเกิดขึ้นในทันทีเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ตัวเซลล์ ซึ่งเป็นการตอบสนองแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific defense) และไม่ต้องการการชักนำ (Johansson and Söderhäll, 1989; Lackie, 1980; Smith and Söderhäll, 1983) โดยระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์นี้มักใช้เซลล์เม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมเป็นหลัก ซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ การแข็งตัวของเลือด กระบวนการกลืนทำลาย การสร้างโนดูล การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม และระบบโปรฟีนอลออกซิเดส โดยเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดเล็กและมีจำนวนน้อยเข้าสู่เซลล์ จะถูกกำจัดโดยกระบวนการกลืนทำลาย แต่ถ้าสิ่งแปลกปลอมมีขนาดเล็กแต่มีจำนวนมาก จะอาศัยการสร้างโนดูล และถ้าสิ่งแปลกปลอมมีขนาดใหญ่จะเกิดกระบวนการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม เป็นต้น

2.3.1.1 การแข็งตัวของเลือด (hemolymph clotting)

เป็นกระบวนการแรกที่เกิดขึ้นภายหลังจากการได้รับบาดแผล เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือด และเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคเข้าสู่บาดแผล(Johansson and Söderhäll, 1989) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดและโปรตีนในเลือดบริเวณบาดแผล กระบวนการแข็งตัวของเลือด เกิดจากการทำงานร่วมกันระหว่างเม็ดเลือดไฮยาลินเซลล์ (hyaline) และโคแอคกลูโลเจน (coagulogen) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารน้ำ โดยมีแคลเซียมเป็นโคเอนไซม์ให้เกิดปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชัน (Hose *et al*., 1990; Ratchiffe *et al*., 1985) นอกจากนี้ยังพบว่ากระบวนการแข็งตัวของเลือดเกิดขึ้นพร้อมกับกระบวนการสร้างเม็ดสีดำ (melanisation) ในระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Johansson and Söderhäll, 1989)

2.3.1.2 กระบวนการกลืนทำลาย (phagocytosis)

เป็นกระบวนการสำคัญอีกกระบวนการหนึ่ง ซึ่งจะทำงานร่วมกับสารน้ำ เกิดจากการทำงานของเม็ดเลือดในการทำลายสิ่งแปลกปลอมทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต (Reade,1968; McKay and Jenkin, 1970) ขั้นตอนของกระบวนการกลืนทำลาย เริ่มจากการที่มีสิ่งแปลกปลอมมาเกาะบริเวณเซลล์เมมเบรนของเม็ดเลือด เซลล์เม็ดเลือดจะยื่นไซโตพลาสซึมไปล้อมสิ่งแปลกปลอมนั้นแล้วเพิ่มการนำออกซิเจนเข้าสู่ตัวเซลล์ (respiratory burst) นอกจากนี้ เปอร์เซ็นต์การกลืนทำลาย (% phagocytosis) ยังเป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพของกระบวนการกลืนทำลาย จับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด และพบว่าแอคกลูตินินในน้ำเลือดสามารถกระตุ้นการทำงานของกระบวนการกลืนทำลายได้ เรียกว่า opsonin (Thörnqvist and Söderhäll, 1997)

2.3.1.3 การสร้างโนดูล (nodule formation)

กระบวนการนี้เกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กและมีจำนวนมาก ซึ่งเกินความสามารถของกระบวนการกลืนทำลาย โดยเซลล์จะรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนล้อมรอบสิ่ง

แปลกปลอมเพื่อไม่ให้สิ่งแปลกปลอมเหล่านี้กระจายไปทั่วร่างกาย เป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการจำกัดขอบเขตการแพร่กระจายของสิ่งแปลกปลอมได้ดี (Smith and Söderhäll, 1986) มักพบการสร้างโนดูลบริเวณเหงือกและตับ (hepatopancreas) (Ratchiffe *et al*., 1985) นอกจากนี้ยังพบว่ากระบวนการสร้างโนดูลเกิดขึ้นพร้อมกับกระบวนการสร้างเม็ดสีดำ (melanisation) ในระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Johansson and Söderhäll, 1989)

2.3.1.4 การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation)

การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้นเมื่อสิ่งแปลกปลอมมีขนาดใหญ่มากกว่า 10 ไมโครเมตร (Lackie, 1980) เช่น พยาธิ เชื้อรา สัตว์เซลล์เดียวขนาดใหญ่ ซึ่งเกินจากความสามารถของกระบวนการกลืนทำลาย จำเป็นต้องใช้เม็ดเลือดจำนวนมากในการกักล้อมสิ่งแปลกปลอม (Ratchiffe *et al*., 1985) โดยเซลล์ที่มีหน้าที่ในการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม ได้แก่ เซมิแกรนูลาร์เซลล์ (semi-granular cell) และแกรนูลาร์เซลล์ (granular cell) การกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่ถูกห่อหุ้มต้องอาศัยองค์ประกอบในระบบโปรฟีนอลออกซิเดส พร้อมกับกระบวนการสร้างเม็ดสีดำ (melanisation) (Ratchiffe *et al*., 1985)

2.3.1.5 ระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase system)

ระบบโปรฟีนอลออกซิเดส เป็นระบบที่มีเอนไซม์ต่างๆเป็นองค์ประกอบ (Johansson and Söderhäll, 1989) โดยมีเซมิแกรนูลาร์เซลล์ (semi-granular cell) และแกรนูลาร์เซลล์ (granular cell) เป็นแหล่งสร้างเอนไซม์และกักเก็บเอนไซม์ชนิดต่างๆ (Smith and Söderhäll, 1991) กลไกการทำงานเริ่มจากเซมิแกรนูลาร์เซลล์ (semi-granular cell) แกรนูลาร์เซลล์ (granular cell) และพลาสมาโปรตีน จะจดจำสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่เซลล์และถูกกระตุ้นโดยองค์ประกอบของเซลล์เชื้อก่อโรคจำพวกคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglycan (PG) ซึ่งเป็นองค์ประกอบผนังเซลล์ของแบคทีเรีย หรือ Beta-1-3-glucan ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของราและยีสต์ เมื่อถูกกระตุ้นจะส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดเกิดดีแกรนูเลชัน (degranulation) และ

หลั่งเอนไซม์กระตุ้นโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase activating enzyme; ppA) ได้แก่ serine protease และ prophenoloxidase ออกจากเม็ดแกรนูล (Johansson and Söderhäll, 1989) หลังจากนั้น serine protease จะถูกกระตุ้นโดย Lipopolysaccharide (LPS) หรือ Beta-1-3-glucan กลายเป็น serine protease ในภาวะแอคทีฟ เปลี่ยน prophenoloxidase ไปเป็น phenoloxidase

Phenoloxidase มีความสามารถในการยึดเกาะกับผิวของจุลชีพ และชักนำการเกิดเม็ดสีดำ (melanin) ซึ่ง melanin มีหน้าที่ในการยับยั้งและป้องกันการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยการยับยั้งเอนไซม์ proteinase และ chitinase ที่อยู่นอกเซลล์ ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้

2.3.2 **ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ** (humoral defenses)

ซีรัมของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง มีองค์ประกอบหลายชนิดที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity), แอคกลูตินิน (agglutinin), สารคล้ายไซโตไคน์ (Cytokine-like factor), โมดูเลเตอร์ (modulators) และสารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (clotting factors) ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (McKay *et al*., 1969) หรืออาจถูกชักนำให้เกิดขึ้น (Stewart and Zwicker, 1972) ซึ่งการถูกชักนำให้สร้างขึ้นจะไม่แสดงคุณสมบัติของ immunoglobulin ที่สามารถจดจำแอนติเจน และตอบสนองต่อแอนติเจนนั้น เมื่อพบแอนติเจนอีกครั้งอย่างจำเพาะเจาะจง (Ratchiffe *et al*., 1985)

2.4 **มะรุม** (*Moringa oleifera*)

มะรุม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Moringa oleifera* Lam. จัดอยู่ในวงศ์ Moringaceae เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง มีความสูงในช่วง 5-10 เมตร (Morton, 1991) พบได้ทั่วไปหรือสามารถเพาะปลูกได้ในที่ราบ เติบโตได้ดีภายใต้ภูมิอากาศแบบหมู่เกาะเขตร้อน มีความทนทานต่อปริมาณน้ำฝนในช่วง 250-3000 มิลลิเมตร และ pH ในช่วง 5.0-9.0

มะรุมเป็นพืชท้องถิ่นของอินเดีย ปากีสถาน บังคลาเทศ อาฟกานิสถาน และในกลุ่มประเทศที่อยู่ในเขตศูนย์สูตรในทวีปเอเชียและแอฟริกา (Booth and Wickens, 1998) ซึ่งในปัจจุบันมีการกระจายพันธุ์ไปยังภูมิภาคเขตร้อนและนิยมปลูกในหลายประเทศเช่น เม็กซิโก, ศรีลังกา, อินเดีย, พม่า, สิงคโปร์, มาเลเซีย, ฟิลิปปินส์ และไทย (Fahey, 2005) ซึ่งการที่มีการกระจายพันธุ์ได้ในหลายพื้นที่ ทำให้มีชื่อท้องถิ่นของ *Moringa oleifera* หลากหลาย เช่น drumstick tree, horse radish tree, kelor tree, Shagara al Rauwaq (หมายถึง tree for purifying) และ Sohanjna

มะรุมจัดเป็นพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงอีกชนิดหนึ่ง จัดเป็นเป็นสารอาหารธรรมชาติในเขตศูนย์สูตร (Anwar *et al*., 2007) โดยในหลายประเทศ เช่น อินเดีย, ปากีสถาน, ฟิลิปปินส์ แอฟริกา รวมถึงประเทศไทย ได้ใช้ส่วนต่างๆของพืชชนิดนี้เป็นแหล่งของสารอาหารสำคัญ เช่น ใบ เมล็ด ดอกและฝัก (Anwar *et al*., 2005; Siddhuraju and Becker, 2003) เนื่องจากมะรุมเป็นแหล่งของโปรตีน, วิตามิน, เกลือแร่, เบตา-คาโรทีน, กรดอะมิโน และฟีโนลิค (Dahot, 1998) โดยการวิเคราะห์สารอาหาร วิตามิน และกรดอะมิโน ในฝักมะรุม ใบมะรุมสดและใบมะรุมแห้ง ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 วิเคราะห์สารอาหารในฝักมะรุม ใบมะรุมสดและใบมะรุมแห้ง แสดงปริมาณที่มีอยู่ใน 100 ส่วน

Nutritional Analysis	**ฝักมะรุม (ต่อ 100 กรัม)**	**ใบมะรุมสด (ต่อ 100 กรัม)**	**ใบมะรุมแห้ง (ต่อ 100 กรัม)**
Moisture (%)	86.9	75.0	7.5
Calories	26.0	92.0	205.0
Protein (%)	2.5	6.7	27.1
Fat (g)	0.1	1.7	2.3
Carbohydrate (g)	3.7	13.4	38.2
Fiber (g)	4.8	0.9	19.2

Nutritional Analysis	ฝักมะรุม (ต่อ 100 กรัม)	ใบมะรุมสด (ต่อ 100 กรัม)	ใบมะรุมแห้ง (ต่อ 100 กรัม)
Minerals (g)	2.0	2.3	-
Calcium (mg)	30.0	440.0	2003.0
Magnesium (mg)	24.0	24.0	368.0
Phosphorus (mg)	110.0	70.0	204.0
Potassium (mg)	259.0	259.0	1324.0
Copper (mg)	3.1	1.1	0.6
Iron (mg)	5.3	0.7	28.2
Oxalic acid (mg)	10.0	101.0	-
Sulfur	137.0	137.0	870.0
Vitamins contents			
Vitamin A – B carotene (mg)	0.1	6.8	16.3
Vitamin B – Choline (mg)	423.0	423.0	-
Vitamin B1 – Thiamin (mg)	0.05	0.21	2.6
Vitamin B2 – Riboflavin (mg)	0.07	0.05	20.5
Vitamin B3 – Nicotinic Acid (mg)	0.2	0.8	8.2
Vitamin C – Ascorbic Acid (mg)	120.0	220.0	17.3
Vitamin E – Tocopherols Acetate (mg)	-	-	113.0
Amino acids contents			
Arginine (mg)	360.0	406.6	1325.0
Histidine (mg)	110.0	149.8	613.0
Lysine (mg)	150.0	342.4	1325.0
Thyptophan (mg)	80.0	107.0	425.0
Phenylalanine (mg)	430.0	310.3	1388.0

Nutritional Analysis	**ฝักมะรุม (ต่อ 100 กรัม)**	**ใบมะรุมสด (ต่อ 100 กรัม)**	**ใบมะรุมแห้ง (ต่อ 100 กรัม)**
Amino acids contents			
Methionine (mg)	140.0	117.7	350.0
Threonine (mg)	390.0	117.7	1188.0
Leucine (mg)	650.0	492.2	1950.0
Isoleucine (mg)	440.0	299.6	825.0
Valine (mg)	540.0	374.5	1063.0

จาก The Miracle Tree: แก้ไขโดย Fuglie (1999)

จากรายงานการวิจัยในหลายปีที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่ามะรุมมีคุณค่าทางด้านเภสัชกรรมเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีสรรพคุณทางยาอยู่ในทุกส่วนของต้น ดังแสดงในตารางที่ 2-2

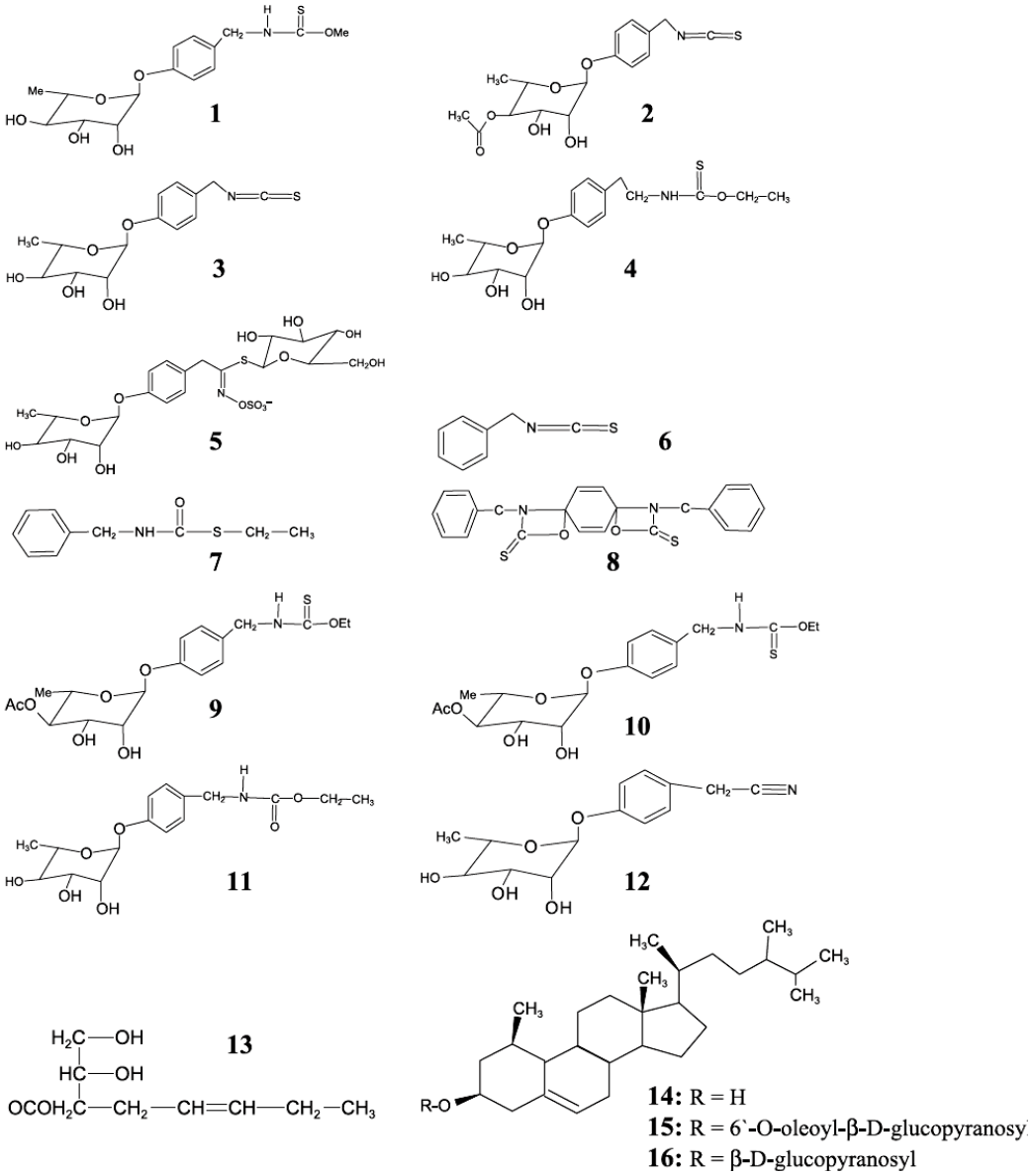
ตารางที่ 2-2 สรรพคุณทางยาในแต่ละส่วนของต้นมะรุม

ส่วนประกอบของต้นมะรุม	**สรรพคุณทางยา**	**เอกสารอ้างอิง**
เปลือก	รักษาอาการเลือดคั่ง อาการตุ่มพองที่ผิวหนัง, รักษาโรคทางตา, รักษาผู้ป่วยที่มีอาการกระสับกระส่าย, ป้องกันการขยายตัวของม้ามและการคงรูปของ tuberculous gland ที่ลำคอ, รักษาแผลเปื่อย แผลมีหนอง แผลเรื้อรัง, น้ำสกัดจากเปลือกรากใช้หยอดหูเพื่อบรรเทาอาการปวดหู และออกฤทธิ์ต้านวัณโรค	Siddhuraju and Becker, 2003 Anwar *et al*., 2006
ยาง	ใช้ทางด้านทันตกรรม มีคุณสมบัติในการห้ามเลือดและรักษาอาการเลือดคั่ง, ผสมกับน้ำมันงาเพื่อบรรเทาอาการปวดศีรษะ เป็นไข้, รักษาซิฟิลิสและโรคไขข้ออักเสบ, ขับปัสสาวะ	Morton, 1991 Anwar *et al*., 2006

ส่วนประกอบของต้นมะรุม	สรรพคุณทางยา	เอกสารอ้างอิง
ราก	รักษาอาการเลือดคั่ง อาการตุ่มพองที่ผิวหนัง, ขับลมในกระเพาะอาหาร, รักษาอาการอักเสบ, เสริมการทำงานของหัวใจและการไหลเวียนโลหิต, ใช้เป็นยาระบาย, รักษาโรคไขข้ออักเสบ, ขับปัสสาวะ, ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย	Dahot, 1988 Morton, 1991 Anwar *et al*., 2007
ดอก	รักษาอาการอักเสบ, ลดระดับคอเลสเตอรอล ฟอสโฟไลปิดและไตรกลีเซอไรด์, ลด lipid profile ในตับ หัวใจ (ทดลองในกระต่ายที่เป็นโรคคลอเรสเตอรอลสูง)และเพิ่มการขับถ่ายของเสียที่เป็นคลอเรสเตอรอล, ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและต้านเชื้อรา	Dahot, 1988 Morton, 1991 Siddhuraju and Becker, 2003 Anwar *et al*., 2007
เมล็ด	สารสกัดจากเมล็ดป้องกันผลที่อาจเกิดจากการลดลงของ Liver lipid peroxides, มีสารที่ต้านความดันโลหิตสูง ได้แก่ thiocarbamate และ isothiocyanate glycoside ซึ่งแยกได้ในเฟสของ acetate ในการสกัดฝักมะรุม โดยใช้เอทานอล นอกจากนี้ในเมล็ดมะรุมยังมีสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย	Faizi *et al*., 1998 Lalas and Tsaknis, 2002 Anwar *et al*., 2007
ใบ	ใช้เป็นยาระบาย, ใช้พอกเพื่อรักษาอาการอักเสบ, ทาบริเวณขมับเพื่อบรรเทาอาการปวดศีรษะ รักษาอาการไข้ เจ็บคอ หลอดลมอักเสบ, รักษาอาการติดเชื้อที่ตาและหู, รักษาอาการเลือดออกตามไรฟันและเยื่อจมูกอักเสบ, น้ำสกัดจากใบมะรุมสามารถใช้ในการควบคุมระดับกลูโคส, ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย, ขับปัสสาวะ, เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ascorbic acid, flavonoids, phenolic และ carotenoid	Dahot, 1988 Morton, 1991 Anwar *et al*., 2005 Anwar *et al*., 2007

ตารางที่ 2-3 Phytochemical constituents ที่แยกได้จากส่วนต่างๆของต้นมะรุม

ส่วนประกอบของต้นมะรุม	Phytochemical constituents
เปลือก	4-(alpha-L-rhamnopyranosyloxy)-benzylglucosinolate
ยาง	L-arabinose, D-galactose, D-glucuronic acid, L-rhamnose, D-mannose, D-xylose and leucoanthocyanin
ราก	4-(alpha-L- rhamnopyranosyloxy)-benzylglucosinolate and benzylglucosinolate
ดอก	D-mannose, D-glucose, ascorbic acid, polysaccharide
ฝัก	Nitriles, isothiocyanate, thiocarbamates, O-[2'-hydroxy-3'-(2'-heptenyloxy)]-propylundecanoate, O-ethyl-4-[(alpha-L-rhamnosyloxy)-benzyl] carbamate, methyl-p-hydroxybenzoate and beta-sitosterol
เมล็ดแก่	4-(alpha-L- rhamnopyranosyloxy)-benzylglucosinolate, benzylglucosinolate, moringyne, mono-palmitic and di-oleic triglyceride
น้ำมันในเมล็ด	Vitamin A, beta carotene, precursor of vitamin A
ใบ	Glycoside niazirin, niazirin, niazirinin and 3 mustard oil glycosides, 4-[(4'-O-acetyl-alpha-L-rhamnosyloxy)benzyl] isothiocyanate, niaziminin A and B



รูปที่ 2-2 โครงสร้างของ phytochemical ที่ได้จากส่วนต่างๆของต้นมะรุม: niazinin A [1], 4-[(4'-O-acetyl-alpha-L-rhamnosyloxy)benzyl] isothiocyanate [2], 4-(alpha-L-rhamnopyranosyloxy)-benzyl isothiocyanate [3], niacimicin [4], 4-(alpha-L-rhamnopyranosyloxy)-benzyl glucosinolate[5], benzyl isothiocyanate [6], aglycon of deoxy-niazimicine (N-benzyl, S-ethylthioformate) [7], pterygospermin [8], niaciminin [9+10], O-ethyl-4-[(alpha-L-rhamnosyloxy)-benzyl] carbamate [11], niazirin [12], glycerol-1-(9-octadecanoate) [13], beta-sitosterol [14], 3-o-(6'-O-oleolyl-beta-D-glucopyranosyl)-beta-sitosterol [15], beta-sitosterol-3-O-beta-D-glucopyranoside [16].

ในบางประเทศเช่น ไนจีเรีย เอธิโอเปีย กานา แซมเบีย มีการส่งเสริมให้มีการบริโภคใบมะรุม เพื่อป้องกันและรักษาภาวะทุพโภชนา (Booth and Wickens, 1988) ในประเทศอินเดียทางตอนใต้มีการแนะนำให้เด็กเล็กหรือเด็กทารกกินใบมะรุมเพื่อป้องกันอาการตาบอดอันเกิดจากการขาดวิตามินเอ เนื่องจากในใบมะรุมมี เบตา-คาโรทีนในปริมาณสูง (Ghasi *et al*.,2000) จึงจัดเป็นอาหารราคาถูกที่จะช่วยในการเสริมสุขภาพแก่มนุษย์ที่มีอาการขาดวิตามินเอ ในเวลาต่อมา จึงมีแนวคิดในการทำผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เนื่องจากมีการศึกษาถึงสารอาหารในใบมะรุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีสารอาหารที่สำคัญเช่น โปรตีน แคลเซียม เหล็ก ทองแดง โพแทสเซียม วิตามินเอ วิตามินบี วิตามินซี ไรโบฟลาวิน กรดโฟลิค เบตา-คาโรทีน และยังประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็น เช่น เมทไทโอนีน ทริปโตแฟน และไลซีน (Makkar and Becker,1996; Freiberger *et al*., 1998)

มะรุมมี Phytochemical constitutents หลายชนิด เช่น glucosinolates, isothiocyanates, alkaloids (moringine และ moringinine), flavonoids (kaemferol, rhamnetin, isoquercitrin และ kaempferitrin), β-sitosterol ซึ่งจะออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ลดระดับคลอเรสเตอรอล รักษาแผลในกระเพาะอาหารและทางเดินอาหาร ป้องกันเนื้องอก ต้านมะเร็ง เป็นต้น จากการศึกษาของ Faizi *et al*.(1995) สกัดแยกสาร nitrile, mustard oil glycoside และ thiocarbamate glycosides จากใบมะรุม ซึ่งสารเหล่านี้อุดมไปด้วย acetylated glycosides ที่หาได้ยากในธรรมชาติ แต่มีคุณค่าทางด้านเภสัชศาสตร์ ซึ่งมีผลต่อการลดลงของความดันโลหิต

นอกจากนี้ ในใบมะรุมยังมีสารที่ให้ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียชนิดต่างๆ จากงานวิจัยเกี่ยวกับใบมะรุม เช่น จากการศึกษาของ Nepolean *et al*. (2009) แสดงให้เห็นว่าสารที่สกัดจากใบมะรุม มีฤทธิ์ในการต้าน *Escherichia coli, Klebsiella pnemoniae, Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* โดยพบว่ามี phytochemicals ซึ่งได้แก่ tannins, saponin, flavonoid, steroid, terpenoids และ glycoside จากการศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียก่อโรคในคนของใบมะรุมสดคั้นและสารสกัดจากใบมะรุมด้วยเอทานอล พบว่าสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งได้แก่ *S. aureus, Bacillus cereus, B. subtilis, B. megaterium, Shigella shinga, S. sonnei, P. aeruginosa* (Rahman *et al*., 2009)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่สำคัญ

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1.1 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น 3K 18 (Sigma Osterode and Germany)

3.1.1.2 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G0650E บริษัท Scientific Industries, Inc., USA

3.1.1.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.1.1.4 หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan

3.1.1.5 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น RO-8 บริษัท Memmert, Western Germany

3.1.1.6 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) บริษัท Hepaire, England

3.1.1.7 เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น 2100 บริษัท Innova, USA

3.1.1.8 เครื่องทำแห้งในภาวะเยือกแข็ง (Freeze Dryer) บริษัท Heterice co.,Ltd, Japan

3.1.1.9 เครื่องระเหยแห้ง (Rotary evaporator)

3.1.1.10 Microtiter plate 96 หลุม

3.1.1.11 เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น PT 1200 บริษัท Sartorius, Germany

3.1.1.12 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)

3.1.1.13 สไลด์นับเม็ดเลือด (Hemacytometer)

3.1.1.14 เครื่องวัดความเค็ม(Salino-Refractometer) ยี่ห้อ Milwaukee รุ่น MR100 ATC

3.1.1.15 เครื่องวิเคราะห์โปรตีนจากบริษัท SITTHIPORN ASSOCIATES CO., LTD ประกอบด้วย

- เครื่องย่อยอาหาร ยี่ห้อ FOSS TECATOR™ DIGESTER AUTO
- เครื่อง Scrubber ยี่ห้อ FOSS TECATOR SCRUBBER
- EYELA CA-1112CE

- KJELPE^{TM} 8400 Analyzer Unit

3.1.1.16 เครื่องวิเคราะห์ไขมัน Sotex system HT6

3.1.1.17 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ยี่ห้อ YSI รุ่น 63/25FT YSI incorporated Yellow Springs, OHIO 45387.USA และยี่ห้อ YSI รุ่น 52CE YSI incorporated Yellow Springs, OHIO 45387.USA

3.1.1.18 เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO meter)ยี่ห้อ YSI รุ่น 55 Yellow Springs Instrument USA

3.1.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.2.1 โซเดียมคลอไรด์ บริษัท Sigma Chemical Co., USA

3.1.2.2 แมกนีเซียมคลอไรด์ บริษัท Sigma Chemical Co., USA

3.1.2.3 แคลเซียมคลอไรด์ บริษัท Sigma Chemical Co., USA

3.1.2.4 โซเดียมคาโคดีเลท บริษัท Sigma Chemical Co., USA

3.1.2.5 L-DOPA (L-dihydroxyphenyl-Alanine) บริษัท Sigma Chemical Co., USA

3.1.2.6 MBTH (3-Methyl-2-Benzothaizolinone Hydrazone) บริษัท Sigma Chemical Co., USA

3.1.2.7 ทริปซิน บริษัท Sigma Chemical Co., USA

3.1.2.8 กรดเปอร์คลอริก บริษัท Sigma Chemical Co., USA

3.1.2.9 โปรตีนมาตรฐานจากไข่ขาว (Bovine Serum Albumin) บริษัท Sigma Chemical Co., USA

3.1.2.10 น้ำยาสำเร็จรูปวัดความเข้มข้นโปรตีน บริษัท Bio-Rad, USA

3.1.2.11 โซเดียมซิเตรท บริษัท Sigma Chemical Co., USA

3.1.2.12 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย (Tryptic Soy Agar ; TSA) บริษัท Difco Laboratories, USA

3.1.2.13 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครส (Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar ; TCBS) บริษัท Difco Laboratories, USA

3.1.2.14 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (Tryptic Soy Broth ; TSB) บริษัท Difco Laboratories, USA

3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใช้สำหรับทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในกุ้งขาว

3.3 สถานที่ที่ใช้ในการทำงานวิจัย

ผลิตอาหาร ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิเคราะห์อาหาร ณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทดลองเลี้ยงกุ้งขาวครั้งที่ 1 ณ สถานีวิจัยสัตว์ทะเลอ่างศิลา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทดลองเลี้ยงกุ้งขาวครั้งที่ 2 ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 การดำเนินงานวิจัย

3.4.1 รวบรวมใบมะรุมและเตรียมสารสกัดใบมะรุมด้วย 95% เอทานอล

3.4.1.1 รวบรวมใบมะรุมจากบริเวณ อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี และนำไปตรวจสอบเพื่อยืนยันชนิดของมะรุม โดยผู้เชี่ยวชาญจากภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.1.2 เตรียมสารสกัดใบมะรุมเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยนำใบมะรุมไปทำแห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งด้วยอุณหภูมิต่ำ (Freezing drier) แล้วนำไปบดละเอียดจนเป็นผง ดังแสดงในรูปที่ 3-1 จากนั้นนำผงของใบมะรุม 500g สกัดด้วย 95% เอทานอล 5000 ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง WHATMAN เบอร์ 1หลังจากนั้นนำสารที่ได้ไประเหยโดยเครื่องระเหย (Rotary evaporator) เพื่อให้ได้สารสกัดแห้ง (รูปที่ 3-2)

รูปที่ 3-1 ผงมะรุมบดละเอียด

รูปที่ 3-2 สารสกัดใบมะรุมด้วย 95% เอทานอล

3.4.2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดใบมะรุมที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ในระดับหลอดทดลอง

3.4.2.1 ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดใบมะรุม (Screening Test; disc diffusion assay)

3.4.2.1.1 เตรียมเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 โดยนำ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 มาเลี้ยงใน Tryptic Soy Broth (TSB) ที่เติม 2%NaCl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเจือจางด้วย 0.85% normal saline solution (NSS) ให้มีความเข้มข้นของเชื้อเทียบกับความขุ่นมาตรฐาน Mcfarland เบอร์ 0.5 ให้มีความขุ่นใกล้เคียงกันมากที่สุด ซึ่งจะได้เป็นความเข้มข้นของเชื้อในช่วง 10^{8} colony forming unit (cfu/ml) จากนั้นเจือจาง 10 เท่า เพื่อให้มีความเข้มข้นของเชื้ออยู่ที่ 10^{7} cfu/ml (สมบัติ รักประทานพร, 2542)

3.4.2.1.2 นำเชื้อ *V. harveyi* ที่ได้จากข้อ 3.4.2.1.1 มาทดสอบด้วยสารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 800 mg/ml, 400 mg/ml, 200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12.5 mg/ml และ 6.25 mg/ml โดยใช้ไม้สำลีที่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงใน *V. harveyi* จนชุ่ม แล้วกดกับหลอดทดลองเพื่อให้หมาดพอประมาณ แล้วนำไปเกลี่ยลงบน Tryptic Soy Agar (TSA) ที่เติม 2%NaCl ให้ทั่วผิวหน้าอย่างสม่ำเสมอ วางทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารแห้งพอประมาณ แล้วนำไปเจาะรู

3.4.2.1.3 หยดสารละลายเอทานอล น้ำกลั่น Tetracycline และ Norfloxacin (กลุ่มควบคุม) สารสกัดใบมะรุมที่ได้เตรียมไว้ที่ความเข้มข้นต่างๆ (กลุ่มทดลอง) ลงในหลุมที่เจาะไว้เพลทละ 3 หลุม ในปริมาตรหลุมละ 50 µl จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.2.1.4 การอ่านผล โดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (clear zone) ที่เกิดรอบหลุม โดยมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

3.4.2.2 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบมะรุมในการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) (ดัดแปลงตามวิธีการของ Wattanasatcha (2011))

3.4.2.2.1 ตรวจวัดค่าโดย broth dilution methods เตรียมหลอดทดลองที่มี modified alkaline peptone water ปริมาตร 6 มิลลิลิตร นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ 121 °C 15 นาที แล้วเติม Tetracycline (Positive control) สารละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Negative control) และสารสกัดใบมะรุมที่ได้เตรียมไว้ ให้มีความเข้มข้นต่างๆ (กลุ่มทดลอง) ได้แก่ 6.25 mg/ml, 3.13 mg/ml และ 1.56 mg/ml แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.4.2.2.2 เติม *V. harveyi* ที่ได้จากข้อ 3.4.2.1.1 ที่มีความเข้มข้น 10^7 cfu/ml ปริมาตร 200 µl ลงในแต่ละหลอดทดลอง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นนำนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.2.2.3 อ่านผลโดยสังเกตความขุ่นของทุกชุดการทดลอง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ผลการทดลองจะเป็นค่าความต่างของ absorbance ระหว่าง 0 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง โดยค่า MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดของหลอดทดลองที่ไม่มีความขุ่น

3.4.2.3 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบมะรุมในการกำจัด *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (Minimum Bactericidal Concentration: MBC)

นำหลอดทดลองที่ใส่สารสกัดใบมะรุมทั้งหมดที่ได้จากข้อ 3.4.2.2 ที่ไม่เกิดความขุ่นและหลอดทดลองที่มีสารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้นต่อจากหลอดทดลองที่ไม่เกิดความขุ่น มาทดสอบเพื่อหาค่า MBC โดยดูดสารในหลอดทดลองปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยให้ทั่วบน Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS Agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีของ *V. harveyi* โดยค่า MBC คือความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดของหลอดทดลองที่ทำให้เชื้อตาย 100% และหาค่า Percent reduction of Microorganism จากสมการ

$$\text{Percent reduction of Microorganism} = \frac{\text{จำนวนจุลินทรีย์ที่เวลา 0 ชั่วโมง} - \text{จำนวนจุลินทรีย์ที่เวลา 24 ชั่วโมง}}{\text{จำนวนจุลินทรีย์ที่เวลา 0 ชั่วโมง}} \times 100$$

3.4.3 ศึกษาผลของใบมะรุมต่อการเติบโต การรอด และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวในระดับตู้ทดลอง

3.4.3.1 เตรียมอาหารทดลอง

อาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งเตรียมเป็น 4 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 3-1) อาหารที่จัดเตรียมจะมีปริมาณโปรตีนประมาณ 40% และไขมัน 8% ตามความต้องการทางโภชนาการของกุ้งขาว สูตรอาหารกำหนดดังแสดงในตารางที่ 1 และในแต่ละสูตรจะมีการเสริมใบมะรุมในระดับที่ต่างกัน การให้อาหารจะแบ่งเป็น 3 มื้อ โดยให้ประมาณ 5% ของน้ำหนักตัวต่อวัน อาหารทดลองเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C

วัตถุดิบหลักที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีน ได้แก่ ปลาป่น เปลือกกุ้งป่น และกากถั่วเหลือง ส่วนวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไขมัน ได้แก่ น้ำมันปลา มีการเสริมใบมะรุมที่แตกต่างกัน ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เสริมใบมะรุมในระดับ 0 g kg^{-1} หรือคิดเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ (สูตรควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 1 เสริมใบมะรุมในระดับ 10 g kg^{-1} หรือคิดเป็น 1 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 1 เสริมใบมะรุมในระดับ 50 g kg^{-1} หรือคิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 1 เสริมใบมะรุมในระดับ 100 g kg^{-1} หรือคิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3-1 ส่วนประกอบในอาหารทดลอง(g kg^{-1}) สำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

ส่วนประกอบ	กลุ่มทดลอง			
	1	2	3	4
Fish meal[1]	380	380	380	380
Soybean meal	160	160	160	160
Shrimp shell meal	40	40	40	40
Wheat flour	170	170	170	170
Wheat gluten	50	50	50	50
Fish oil	40	40	40	40
Mineral mixture[2]	20	20	20	20
Vitamin mixture[3]	20	20	20	20
Cellulose	100	90	50	0
Cholesterol	10	10	10	10
Lecithin	10	10	10	10
Moringa oleifera leaves powder	0	10	50	100

[1]บริษัท PC ยูเนี่ยน จำกัด (โปรตีนประมาณร้อยละ 70)

[2]แคลพลัส บริษัทโคเดล (ประเทศไทย) จำกัด ประกอบด้วยแคลเซียม 147 กรัม ฟอสฟอรัส 147 กรัม เหล็ก 2,010 มิลลิกรัม ทองแดง 3,621 มิลลิกรัม สังกะสี 6,424 มิลลิกรัม แมงกานีส 10,062 มิลลิกรัม โคบอลต์ 105 มิลลิกรัม ไอโอดีน 1,00 มิลลิกรัม และซีลีเนียม 60 มิลลิกรัมในปริมาณ 1 กิโลกรัม

[3]คอมพลีทดีวีดี บริษัทโคเดล (ประเทศไทย) จำกัด ประกอบด้วยวิตามินเอ 10,000,000 IU วิตามินอี 1,000 IU วิตามินเค 1,000 มิลลิกรัม วิตามินบี1 500 มิลลิกรัม วิตามินบี2 1,500 มิลลิกรัม วิตามินซี 10,000 มิลลิกรัม โฟเลท 1,000 มิลลิกรัม และดีเมทไธโอนีน 16,038 มิลลิกรัม ในปริมาณ 1 กิโลกรัม

3.4.3.2 ขั้นตอนการผลิตอาหารเม็ดสำเร็จรูป

ทำการผลิตอาหาร ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยผลิตโดยใช้เครื่องอัดเม็ดอาหาร (pelleting machine) จากบริษัท CPM ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีขั้นตอนดังแสดงในภาคผนวก ก

3.4.3.3 วิเคราะห์คุณภาพอาหารโดยวิเคราะห์หาค่า proximate composition

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้น ตามวิธีการของ AOAC (1995) แสดงวิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ข

- การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Semimicro-kjeldahl ใช้เครื่อง Kjeldahltherm
- การวิเคราะห์ไขมันโดยวิธี Ether extraction method ใช้เครื่อง Soxtherm
- การวิเคราะห์เถ้าโดยใช้เครื่อง Electric muffle furnance
- การวิเคราะห์ความชื้นใช้เครื่อง Hot air oven

3.4.3.4 เตรียมระบบการเลี้ยงกุ้ง

การทดลองเลี้ยงกุ้งขาวครั้งที่ 1

ระบบการเลี้ยงในการทดลองเป็นระบบหมุนเวียนแบบกึ่งปิด โดยถังไฟเบอร์กลาสที่ใช้ในการทดลองมีขนาด 300 ลิตร จำนวน 12 บ่อ เติมน้ำที่ระดับความเค็ม 28 ppt โดยใช้น้ำทะเล ระดับน้ำสูงประมาณ 65 เซนติเมตร และให้อากาศทิ้งไว้นานประมาณ 1 เดือน เพื่อสร้างระบบ biological filtration เพื่อควบคุมปริมาณไนโตรเจนในระบบไม่ให้เป็นพิษกับกุ้งขาว ทำการดูดตะกอนนำของเสียจากกุ้งขาว และอาหารที่เหลือจากการกินออกจากระบบทุก 2 วัน ระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งขาวทั้งสิ้น 9 สัปดาห์

การทดลองเลี้ยงกุ้งขาวครั้งที่ 2

ระบบการเลี้ยงในการทดลองเป็นระบบหมุนเวียนแบบกึ่งปิด โดยบ่อปูนที่ใช้ในการทดลองมีขนาด 70 x 70 x 80 (กว้าง x ยาว x สูง) ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 12 บ่อ เติมน้ำที่ระดับความเค็ม 25 ppt โดยใช้น้ำเค็มจากนาเกลือที่มีระดับความเค็มประมาณ 120 ppt ผสมกับน้ำจืดที่ปราศจากคลอรีนระดับความเค็ม 0 ppt ให้เข้ากัน เติมน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งผสมไปด้วย ระดับน้ำสูงประมาณ 65 เซนติเมตร และให้อากาศทิ้งไว้นานประมาณ 1 เดือน เพื่อสร้างระบบ biological filtration เพื่อควบคุมปริมาณไนโตรเจนในระบบไม่ให้เป็นพิษกับกุ้งขาว ทำการดูดตะกอนนำของเสียจากกุ้งขาว และอาหารที่เหลือจากการกินออกจากระบบทุก 7 วัน ระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งขาวทั้งสิ้น 6 สัปดาห์

โดยในการทดลองทั้งสองครั้ง จะมีการควบคุมคุณภาพน้ำอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-2 ค่าปัจจัยที่เหมาะสมในการตรวจสอบคุณภาพน้ำและการตรวจวัด

ค่าที่ตรวจวัด	ค่าที่เหมาะสม	การตรวจวัด
1. อุณหภูมิ	28-32 °C	Thermometer
2. ความเค็ม	20-30 ppt	Salinometer
3. pH	7.5 - 8.5	pH meter
4. DO	มากกว่า 4 mg/L	DO meter
5. Ammonia	น้อยกว่า 0.05 mg/L	Ammonia Test kit
6. Nitrite	น้อยกว่า 0.01 mg/L	Nitrite Test kit
7. Alkalinity	90-120 mg/L	Alkalinity Test kit

3.4.3.5 การวางแผนการทดลอง

การทดลองเลี้ยงกุ้งขาวครั้งที่ 1

กุ้งขาวจากฟาร์มเอกชน น้ำหนักตัวเฉลี่ย 5.81 กรัม จำนวน 1,000 ตัว นำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1 ตัน จำนวน 2 ถัง ให้อากาศตลอดเวลา และมีระบบกรอง ปรับสภาพเพื่อให้กุ้งขาวคุ้นเคยกับสภาพถังทดลองและอาหารทดลองเป็นเวลา 7 วัน ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปสูตรควบคุม ประมาณ 5% ของน้ำหนักตัว โดยให้อาหารวันละ 3 มื้อ คือเวลา 7.30 น. 12.30 น. และ 17.30 น. เมื่อปรับสภาพกุ้งขาวแล้ว สุ่มคัดกุ้งขาวที่แข็งแรงและมีน้ำหนักใกล้เคียงกันลงในถังทดลองจำนวน 12 ถัง ถังละ 30 ตัว แบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ

การทดลองเลี้ยงกุ้งขาวครั้งที่ 2

กุ้งขาวจากฟาร์มเอกชน น้ำหนักตัวเฉลี่ย 1.64 กรัม จำนวน 700 ตัว นำมาเลี้ยงในบ่อปูนขนาด 500 ลิตร จำนวน 2 บ่อ ให้อากาศตลอดเวลา และมีระบบกรอง ปรับสภาพเพื่อให้กุ้งขาวคุ้นเคยกับสภาพบ่อทดลองและอาหารทดลองเป็นเวลา 7 วัน ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปสูตรควบคุม ประมาณ 5% ของน้ำหนักตัว โดยให้อาหารวันละ 3 มื้อ คือเวลา 7.30 น. 12.30 น. และ 16.00 น. เมื่อปรับสภาพกุ้งขาวแล้ว สุ่มคัดกุ้งขาวที่แข็งแรงและมีน้ำหนักใกล้เคียงกันลงในบ่อทดลองจำนวน 12 บ่อ บ่อละ 30 ตัว แบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ

3.4.3.6 ศึกษาผลของใบมะรุมต่อการเติบโต การรอด ของกุ้งขาวในระดับตู้ทดลอง

ศึกษาการเติบโตของกุ้งขาวโดยการชั่งน้ำหนักกุ้งทุก 3 สัปดาห์ โดยนำกุ้งทุกตัวในแต่ละบ่อมาชั่งน้ำหนักแล้วหารด้วยจำนวนตัวที่เหลือ แล้วเก็บรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูลการเติบโต ได้แก่

- อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ต่อวัน (percent weight gain ; WG)
- อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio ; FCR)
- อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate ; SGR)
- อัตราการรอดตาย (survival rate)

คำนวณโดยใช้สมการดังนี้

อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ต่อวัน (percent weight gain ; WG)

$$= \frac{\text{น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \text{น้ำหนักกุ้งเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)}}{\text{น้ำหนักกุ้งเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)} \times \text{ระยะเวลาที่เลี้ยงกุ้ง (วัน)}} \times 100$$

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio ; FCR)

$$= \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กุ้งกินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง (กรัม)}}$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate ; SGR)

$$= \frac{(\ln \text{น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \ln \text{น้ำหนักกุ้งเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)})}{\text{ระยะเวลาที่เลี้ยงกุ้ง (วัน)}} \times 100$$

อัตราการรอดตาย (survival rate)

$$= \frac{\text{จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)}}{\text{จำนวนกุ้งเริ่มต้นการทดลอง (ตัว)}} \times 100$$

3.4.3.7 ศึกษาผลของใบมะรุมต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว ก่อนการเหนี่ยวนำให้กุ้งเกิดโรค Vibriosis ด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi* ในระดับตู้ทดลอง

สุ่มกุ้งขาว 3 ตัวในแต่ละชุดการทดลอง เพื่อนำไปตรวจวัดค่าปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total Hemocyte Count ; THC) และการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity ; PO activity) โดยทำการตรวจวัดทุก 3 สัปดาห์ ดังวิธีการต่อไปนี้

- ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total Hemocyte Count ; THC)

เจาะเลือดกุ้งจากบริเวณ ventral sinus หรือตรงโคนขาเดินคู่ที่ 3 ด้วยกระบอกฉีดยาปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร โดยใช้หัวเข็มขนาด 26G ผสมกับ 10% sodium citrate ซึ่งเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำเลือดที่ผสมกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดถ่ายลงใน eppendrof ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำมา 10 µl หยดลงบนสไลด์นับเม็ดเลือด (hemacytometer) นับจำนวนเม็ดเลือดแล้วนำมาคำนวณปริมาณเม็ดเลือดรวม และรายงานเป็นจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร

- การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity ; PO activity)

โดยใช้วิธี 3-Methyl-2-benzothiazoninone hydrazine (MBTH) Assay ซึ่งดัดแปลงตามวิธีการของชัยชาญ ไตรศรีศิลป์ (2545) และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford โดยเจาะเลือดกุ้งจากบริเวณ ventral sinus หรือตรงโคนขาเดินคู่ที่ 3 ด้วยกระบอกฉีดยาปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร โดยใช้หัวเข็มขนาด 26G ผสมกับ 10% sodium citrate ซึ่งเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำเลือดที่ผสมกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดถ่ายลงใน eppendrof นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,600g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 $^{\circ}$C นำตะกอนที่อยู่บริเวณด้านล่างของ eppendrof ซึ่งเป็นตะกอนเซลล์เม็ดเลือดมาละลายในสารละลาย cacodylate buffer (CAC buffer) pH 7.4 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ – 80 $^{\circ}$C แล้วทำให้ละลายทันทีเพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดแตก นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,900g เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 $^{\circ}$C ทำการแยกส่วนใส (Hemocyte lysate supernatant ; HLS) นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในทันที

นำ HLS ปริมาตร 20 µl ใส่ลงในไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม เติมสารละลาย CAC buffer ปริมาตร 30 µl ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเติมสารละลาย CAC buffer ในปริมาตร 55 µl

สารละลาย MBTH (3-Methyl-2-Benzothaizolinone Hydrazone) เข้มข้น 20.7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 75 µl และสารละลาย L-DOPA (L-dihydroxyphenylalanine) เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 µl ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา หลังจากนั้นเติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 2.4% (W/V) เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำค่าที่ได้คำนวณค่าหน่วยต่อนาที (unit/min) ของเอนไซม์ กำหนดให้ 1 หน่วยเท่ากับความสามารถของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่สามารถเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็น Dopamine ด้วยการดูดกลืนแสง 0.001/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน

3.4.4 ศึกษาผลของใบมะรุมต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว หลังจากเหนี่ยวนำให้กุ้งเกิดโรค Vibriosis ด้วยเชื้อ*Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ในระดับตู้ทดลอง

ทำการศึกษาความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (challenge test) ในการเลี้ยงกุ้งขาวครั้งที่ 2 เมื่อเลี้ยงกุ้งขาวครบ 6 สัปดาห์ สุ่มกุ้งขาวจำนวนบ่อละ 10 ตัว มาลงในถังที่ได้เตรียมน้ำไว้ 40 ลิตร ที่ความเค็ม 25 ppt จากนั้นนำเชื้อ *V. harveyi* ที่เตรียมไว้ เติมลงในถังเลี้ยงกุ้งขาว โดยทำให้ความเข้มข้นของเชื้อในถังเป็น 10^7 cfu/ml ซึ่งในระบบจะให้อากาศตลอดเวลาแต่ไม่มีระบบกรองน้ำ ศึกษาความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยติดตามผลหาอัตราการตายสะสม และยืนยันการติดเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ด้วยวิธี spread plate technique

3.4.5 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของชุดการทดลอง โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดใบมะรุม(Screening Test; disc diffusion assay)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดใบมะรุมต่อการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 โดยใช้น้ำกลั่นและเอทานอลเป็น negative control และใช้ Norfloxacin และ Tetracycline เป็น positive control ในการทดสอบนี้ พบว่าสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 6.25 mg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* ได้ และพบว่าสารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้นต่างๆส่งผลถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* แตกต่างกัน โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุมที่มากขึ้น ส่งผลให้เกิด clear zone รอบหลุมที่มากขึ้นตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุมที่ทำให้เกิด clear zone รอบหลุมที่มากที่สุดคือที่ความเข้มข้น 800 mg/ml ดังแสดงในตารางที่ 4-1 โดยการตรวจสอบความเข้มข้นของ *V. harvey* อยู่ที่ประมาณ 1.05×10^7 cfu/ml

ตารางที่ 4-1 ประสิทธิภาพของสารสกัดใบมะรุมต่อการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (Screening Test; disc diffusion assay)

สารที่ใช้ทดสอบ	Zone of growth inhibition (mm.)
น้ำกลั่น	0.00 ± 0.00^{a}
เอทานอล	12.67 ± 1.03^{b}
สารสกัดใบมะรุมความเข้มข้น 6.25 mg/ml	14.50 ± 0.55^{c}
สารสกัดใบมะรุมความเข้มข้น 12.5 mg/ml	15.67 ± 1.03^{d}
สารสกัดใบมะรุมความเข้มข้น 25 mg/ml	16.17 ± 1.17^{e}
สารสกัดใบมะรุมความเข้มข้น 50 mg/ml	17.50 ± 0.55^{f}
สารสกัดใบมะรุมความเข้มข้น 100 mg/ml	19.00 ± 0.00^{g}
สารสกัดใบมะรุมความเข้มข้น 200 mg/ml	20.67 ± 0.52^{h}
สารสกัดใบมะรุมความเข้มข้น 400 mg/ml	22.33 ± 0.52^{i}
สารสกัดใบมะรุมความเข้มข้น 800 mg/ml	23.67 ± 0.82^{j}
Norfloxacin	38.33 ± 0.52^{k}
Tetracycline	41.17 ± 1.33^{l}

*ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกต่างกันในแนวตั้งเดียวกันบ่งบอกถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

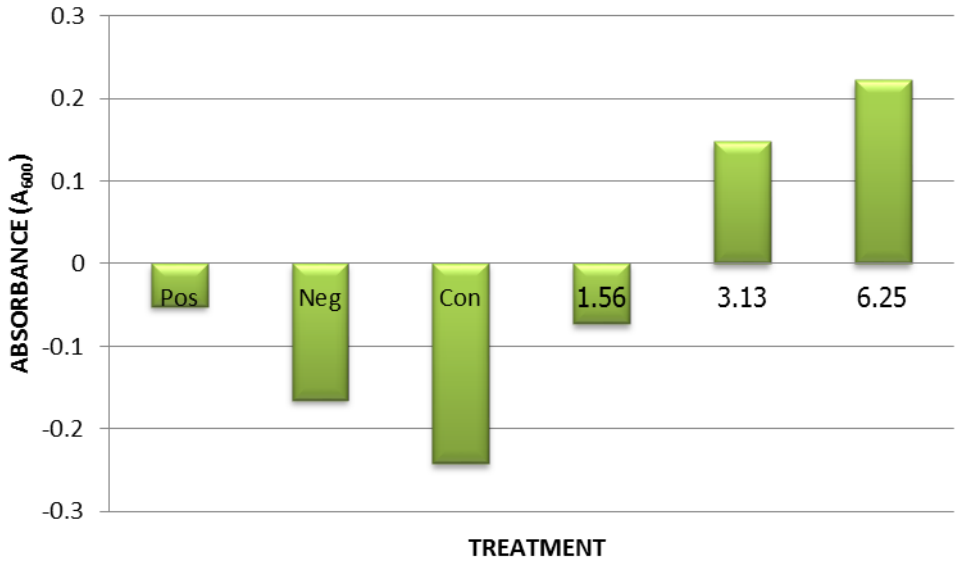
**Zone of growth inhibition (mm.); Resistant: ≤ 9 mm.; Intermediate: ≥ 10-13 mm.; Susceptible: ≥ 14 mm.

4.2 ผลการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบมะรุมในการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC)

จากการศึกษาเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* โดยการติดตามความขุ่นของสารละลายเมื่อเวลา 0 ชั่วโมง เทียบกับความขุ่นเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4-2 พบว่า ชุดการทดลองที่ใส่สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 1.56 mg/ml มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น 0.0730 ชุดการทดลองที่ใส่สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 3.13 mg/ml มีค่าการดูดกลืนแสงลดลง 0.1482 และชุดการทดลองที่ใส่สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 6.26 mg/ml มีค่าการดูดกลืนแสงลดลง 0.2226 ดังแสดงในรูปที่ 4-1

ตารางที่ 4-2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

TREATMENT	ABSORBANCE (A_{600})			ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่างกันที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง (ใส่เชื้อ)
	0 ชั่วโมง (ไม่ใส่เชื้อ)	0 ชั่วโมง (ใส่เชื้อ)	24 ชั่วโมง (ใส่เชื้อ)	
Positive control (Tetracycline 0.5 mg/ml)	0.0291	0.0360	0.0878	-0.0518
Negative control (DMSO)	-0.0050	-0.0040	0.1608	-0.1648
Control (Alkaline peptone water)	-0.0010	0.0000	0.2421	-0.2421
สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 1.56 mg/ml	0.2212	0.2525	0.3255	-0.0730
สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 3.13 mg/ml	0.5403	0.6109	0.4627	0.1482
สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 6.25 mg/ml	1.2206	1.4360	1.2134	0.2226



รูปที่ 4-1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่เปลี่ยนแปลงไป ระหว่าง 0 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง

4.3 ผลการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบมะรุมในการกำจัด *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (Minimum Bactericidal Concentration: MBC)

จากการศึกษาเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบมะรุมในการกำจัด *V. harveyi* โดยการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียในสารละลาย พบว่าที่เวลา 0 ชั่วโมง มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 2.94×10^{7} cfu/ml และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าชุดการทดลองที่ใส่สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 1.56 mg/ml มีจำนวนเชื้อ 4.39×10^{6} cfu/ml ชุดการทดลองที่ใส่สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 3.13 mg/ml มีจำนวนเชื้อ 1.13×10^{6} cfu/ml และชุดการทดลองที่ใส่สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 6.25 mg/ml มีจำนวนเชื้อ 6.31×10^{4} cfu/ml

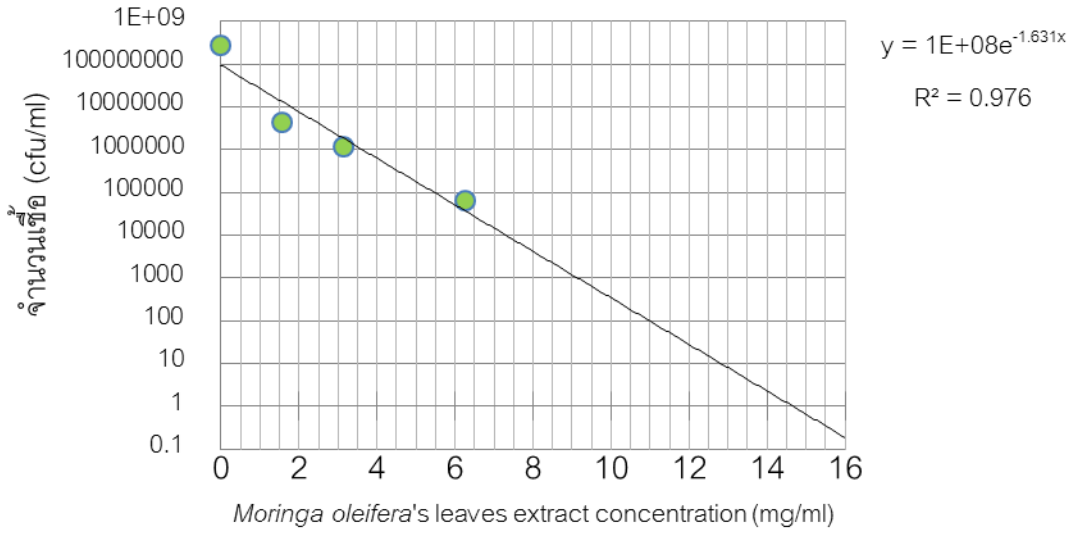
เมื่อนำข้อมูลจำนวนเชื้อที่เวลา 0 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง คำนวณหาค่า Percent Reduction of Microorganism พบว่าชุดการทดลองที่ใส่สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 1.56 mg/ml, 3.13 mg/ml และ 6.25 mg/ml มีค่า Percent Reduction of Microorganism เท่ากับ 85.07%, 96.16% และ 99.79% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 จำนวนเชื้อที่เวลา 24 ชั่วโมง และ Percent reduction of microorganism

TREATMENT	จำนวนเชื้อที่เวลา 24 ชั่วโมง (cfu/ml)	% reduction of microorganism
Positive control (Tetracycline 0.5 mg/ml)	< 10	100
Negative control (DMSO)	1.49×10^8	NR
Control (Alkaline peptone water)	2.74×10^8	NR
สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 1.56 mg/ml	4.39×10^6	85.07
สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 3.13 mg/ml	1.13×10^6	96.16
สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 6.25 mg/ml	6.31×10^4	99.79

*NR หมายถึง No Reduction

เมื่อนำข้อมูลจำนวนเชื้อที่เวลา 24 ชั่วโมง มาพลอตกราฟเพื่อประเมินค่าความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุมที่สามารถฆ่าเชื้อได้ 100% โดยใช้สารละลาย Alkaline peptone water เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารสกัดใบมะรุม พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุมที่สามารถฆ่าเชื้อได้ 100% อยู่ที่ความเข้มข้นประมาณ 14-15 mg/ml ดังแสดงในรูปที่ 4-2



รูปที่ 4-2 กราฟแสดงจำนวนเชื้อที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อให้สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.4 ผลของการเสริมใบมะรุม (*Moringa oleifera*) ในอาหารต่อการเติบโตและการรอดของกุ้งขาว (การทดลองที่ 1)

4.4.1 น้ำหนักเฉลี่ยและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

จากการศึกษาการเติบโตทางน้ำหนักของกุ้งขาว โดยการเสริมใบมะรุมในอาหารในสัดส่วนที่แตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง ทำการเลี้ยงกุ้งขาวที่มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 5.81 ± 0.77 กรัม เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงกว่าชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ($P < 0.05$) โดยน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวเมื่อสิ้นสุดการทดลองในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ คือ 9.93, 9.82, 13.16 และ 14.46 กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-4 และรูปที่ 4-3

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นโดยน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวในเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 4.22, 4.19, 7.38 และ 8.65 กรัม ตามลำดับ และอัตราการเติบโตโดยน้ำหนักต่อสัปดาห์ของกุ้งขาว มีค่า 0.47, 0.47, 0.82 และ 0.96 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าการเพิ่มขึ้นโดยน้ำหนักเฉลี่ยและอัตราการเติบโตโดยน้ำหนักต่อสัปดาห์ของกุ้งขาวที่มีค่ามากที่สุด คือชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ และทั้งสองชุดการทดลองนี้มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0 และ 1 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-4 น้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม) ของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์

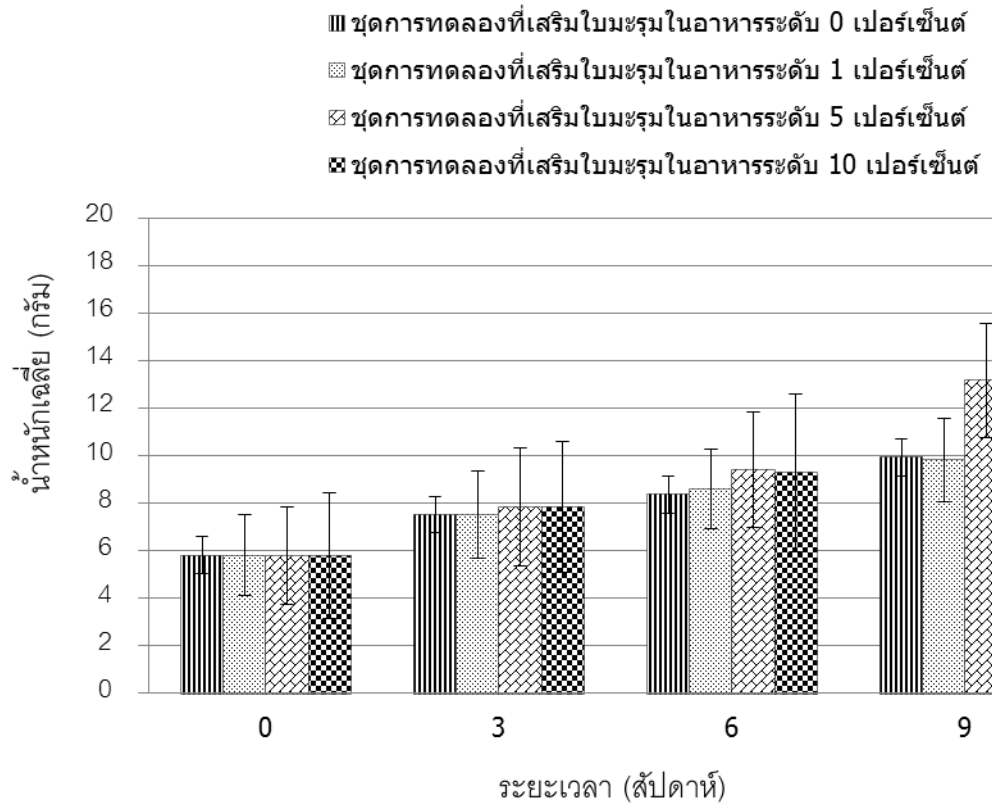
Treatment	*M. oleifera* leaves powder (percent)	Weeks			
		0	3	6	9
T1	0	5.81 ± 0.77	7.53 ± 1.69	8.36 ± 2.04	9.93 ± 2.64[a]
T2	1	5.81 ± 0.77	7.52 ± 1.81	8.60 ± 2.48	9.82 ± 2.76[ab]
T3	5	5.81 ± 0.77	7.82 ± 1.66	9.41 ± 2.41	13.16 ± 3.33[b]
T4	10	5.81 ± 0.77	7.83 ± 1.75	9.27 ± 2.41	14.46 ± 2.96[c]

*ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกต่างกันในแนวตั้งเดียวกันบ่งบอกถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4-5 อัตราการเติบโตโดยน้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) การเพิ่มขึ้นโดยน้ำหนักเฉลี่ยและอัตราการเติบโตโดยน้ำหนักต่อสัปดาห์ของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง

Treatment	*M. oleifera* leaves powder (percent)	Body weight (g)			Growth in body weight (per week)
		Initial	Final	Increment	
T1	0	5.81 ± 0.77	9.93 ± 2.64[a]	4.22 ± 1.01[a]	0.47 ± 0.11[a]
T2	1	5.81 ± 0.77	9.82 ± 2.76[ab]	4.19 ± 0.96[a]	0.47 ± 0.11[a]
T3	5	5.81 ± 0.77	13.16 ± 3.33[b]	7.38 ± 2.12[b]	0.82 ± 0.24[b]
T4	10	5.81 ± 0.77	14.46 ± 2.96[c]	8.65 ± 1.16[b]	0.96 ± 0.13[b]

*ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกต่างกันในแนวตั้งเดียวกันบ่งบอกถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 4-3 น้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม) ของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง

4.4.2 อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ต่อวัน (% ต่อวัน)

จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันของกุ้งขาวเป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่า 1.15, 1.14, 2.01 และ 2.38 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ตามลำดับ พบว่าชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันมากที่สุด รองลงมาคือชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้งสองชุดการทดลองนี้มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0 และ 1 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4-6

4.4.3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (% ต่อวัน)

จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกุ้งขาวเป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่า 0.86, 0.86, 1.29 และ 1.45 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ตามลำดับ พบว่าชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมากที่สุด รองลงมาคือชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้งสองชุดการทดลองนี้มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0 และ 1 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4-6

4.4.4 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ

จากการศึกษาอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของกุ้งขาวเป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่า 1.53, 1.58, 1.54 และ 1.37 ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4-6

ตารางที่ 4-6 อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง

Treatment	*M. oleifera* leaves powder (percent)	Growth performance		
		Weight gain (% / day)	SGR (% / day)	FCR
T1	0	1.15 [a] ± 0.27	0.86 [a] ± 0.16	1.53 [a] ± 0.32
T2	1	1.14 [a] ± 0.26	0.86 [a] ± 0.15	1.58 [a] ± 0.28
T3	5	2.01 [b] ± 0.58	1.29 [b] ± 0.25	1.54 [a] ± 0.38
T4	10	2.38 [b] ± 0.32	1.45 [b] ± 0.13	1.37 [a] ± 0.20

*ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกต่างกันในแนวตั้งเดียวกันบ่งบอกถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.4.5 อัตราการรอด (%)

จากการศึกษาอัตราการรอดของกุ้งขาวตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 จนถึงสัปดาห์ที่ 9 พบว่าในสัปดาห์ที่ 6 ในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดสูงสุด แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และสัปดาห์ที่ 9 ในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดสูงสุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4-7

ตารางที่ 4-7 อัตราการรอดของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์

Treatment	*M. oleifera* leaves powder (percent)	Survival rate (%) after time elapsed (weeks)			
		0	3	6	9
T1	0	100	75.6 ± 10.2	41.1 ± 5.1	20.0 [ab] ± 3.3
T2	1	100	86.7 ± 5.8	52.2 ± 3.8	20.0 [ab] ± 6.7
T3	5	100	92.2 ± 1.9	50.0 ± 3.3	17.8 [a] ± 1.9
T4	10	100	86.7 ± 5.8	54.4 ± 8.4	26.7 [b] ± 0.0

*ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกเดียวกันในแนวตั้งเดียวกันบ่งบอกถึงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.5 ผลของการเสริมใบมะรุม (*Moringa oleifera*) ในอาหารต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว (การทดลองที่ 1)

4.5.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total Hemocyte Count ; THC)

จากการศึกษาปริมาณเม็ดเลือดรวมตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 จนถึงสัปดาห์ที่ 9 พบว่าในสัปดาห์ที่ 6 ในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0 และ 1 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าในสัปดาห์ที่ 9 ปริมาณเม็ดเลือดรวมในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4-8

ตารางที่ 4-8 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมใบมะรุมในระดับที่แตกต่างกัน

Treatment	*M. oleifera* leaves powder (percent)	Weeks		
		3	6	9
T1	0	1.20 ± 0.12	1.07 ^{a} ± 0.18	1.08 ± 0.14
T2	1	1.07 ± 0.36	1.04 ^{a} ± 0.24	1.06 ± 0.24
T3	5	1.21 ± 0.13	1.49 ^{b} ±0.06	1.41 ± 0.29
T4	10	1.15 ± 0.31	1.32 ^{ab} ± 0.18	1.30 ± 0.28

*ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกต่างกันในแนวตั้งเดียวกันบ่งบอกถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.5.2 การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity ; PO activity)

จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 จนถึงสัปดาห์ที่ 9 พบว่าการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในทุกช่วงสัปดาห์ แต่อย่างไรก็ตามในสัปดาห์ที่ 9 พบว่าการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-9

ตารางที่ 4-9 การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg protein)ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมใบมะรุมในระดับที่แตกต่างกัน

Treatment	*M. oleifera* leaves powder (percent)	Weeks		
		3	6	9
T1	0	157.62 ± 60.39	139.65 ± 60.74	167.49 ± 37.00
T2	1	168.77 ± 96.44	184.40 ± 33.14	189.77 ± 54.07
T3	5	164.38 ± 54.73	202.99 ± 78.40	196.56 ± 69.65
T4	10	147.46 ± 57.93	163.21 ± 15.84	199.43 ± 57.62

4.6 ผลของการเสริมใบมะรุม (*Moringa oleifera*) ในอาหารต่อการเติบโตและการรอดของกุ้งขาว (การทดลองที่ 2)

4.6.1 น้ำหนักเฉลี่ยและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

จากการศึกษาการเติบโตทางน้ำหนักของกุ้งขาวในการทดลองที่ 2 โดยการเสริมใบมะรุมในอาหารในสัดส่วนที่แตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง ทำการเลี้ยงกุ้งขาวที่มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 1.64 ± 0.18 กรัมเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงสุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1 และ 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวเมื่อสิ้นสุดการทดลองในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ คือ 5.01, 4.93, 5.18 และ 5.11 กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-10

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นโดยน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวในเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 3.37, 3.29, 3.54 และ 3.47 กรัม ตามลำดับ และอัตราการเติบโตโดยน้ำหนักต่อสัปดาห์ของกุ้งขาว มีค่า 0.56, 0.55, 0.59 และ 0.58 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าชุดการทดลองที่มีการเพิ่มขึ้นโดยน้ำหนักเฉลี่ยและอัตราการเติบโตโดยน้ำหนักต่อสัปดาห์ของกุ้งขาวที่มีค่ามากที่สุด คือชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในทุกชุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4-11

ตารางที่ 4-10 น้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม) ของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

Treatment	*M. oleifera* leaves powder (percent)	Weeks	
		0	6
T1	0	1.64 ± 0.18	5.01 ± 0.51
T2	1	1.64 ± 0.18	4.93 ± 0.30
T3	5	1.64 ± 0.18	5.18 ± 0.37
T4	10	1.64 ± 0.18	5.11 ± 0.35

ตารางที่ 4-11 อัตราการเติบโตโดยน้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) การเพิ่มขึ้นโดยน้ำหนักเฉลี่ยและอัตราการเติบโตโดยน้ำหนักต่อสัปดาห์ของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง

Treatment	*M. oleifera* leaves powder (percent)	Body weight (g)			Growth in body weight (per week)
		Initial	Final	Increment	
T1	0	1.64 ± 0.18	5.01 ± 0.51	3.37 ± 0.51	0.56 ± 0.09
T2	1	1.64 ± 0.18	4.93 ± 0.30	3.29 ± 0.30	0.55 ± 0.05
T3	5	1.64 ± 0.18	5.18 ± 0.37	3.54 ± 0.37	0.59 ± 0.06
T4	10	1.64 ± 0.18	5.11 ± 0.35	3.47 ± 0.35	0.58 ± 0.06

4.6.2 **อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ต่อวัน (% ต่อวัน)**

จากการศึกษาอัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันของกุ้งขาวเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่า 4.89, 4.78, 5.14 และ 5.04 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ตามลำดับ พบว่าชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันมากที่สุด รองลงมาคือชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4-12

4.6.3 **อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (% ต่อวัน)**

จากการศึกษาอัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันของกุ้งขาวเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่า 2.65, 2.62, 2.73 และ 2.70 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ตามลำดับ พบว่าชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันมากที่สุด รองลงมาคือชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4-12

ตารางที่ 4-12 อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง

Treatment	*M. oleifera* leaves powder (percent)	Growth performance	
		Weight gain (% / day)	SGR (% / day)
T1	0	4.89 ± 0.74	2.65 ± 0.24
T2	1	4.78 ± 0.44	2.62 ± 0.14
T3	5	5.14 ± 0.53	2.73 ± 0.17
T4	10	5.04 ± 0.50	2.70 ± 0.16

4.6.4 **อัตราการรอด (%)**

จากการศึกษาอัตราการรอดของกุ้งขาวตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 จนถึงสัปดาห์ที่ 6 พบว่าในสัปดาห์ที่ 6 ชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดสูงสุด แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 5 และ 10 ดังแสดงในตารางที่ 4-13

ตารางที่ 4-13 อัตราการรอดของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

Treatment	*M. oleifera* leaves powder (percent)	Survival rate (%) after time elapsed (weeks)	
		0	6
T1	0	100	58.9 ± 5.09
T2	1	100	73.3 ± 12.02
T3	5	100	58.9 ± 5.09
T4	10	100	71.1 ± 13.47

4.7 การทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (Challenge test)

4.7.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total Hemocyte Count ; THC)

ก่อนการเหนี่ยวนำให้กุ้งเกิดโรค ทำการวัดปริมาณเม็ดเลือดรวม พบว่าชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวม 75.90 x 10^5, 76.50 x 10^5, 77.10 x 10^5 และ 80.90 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4-14

หลังการเหนี่ยวนำให้กุ้งเกิดโรค เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดปริมาณเม็ดเลือดรวม พบว่าชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวม 7.80 x 10^5, 8.30 x 10^5, 12.60 x 10^5 และ 11.90 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4-14 แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้กุ้งเกิดโรค พบว่า หลังจากเหนี่ยวนำให้กุ้งเกิดโรค ปริมาณเม็ดเลือดรวมมีค่าลดต่ำลงอย่างชัดเจน

ตารางที่ 4-14 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมใบมะรุมในระดับที่แตกต่างกัน ทั้งก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

Treatment	*M. oleifera* leaves powder (percent)	Total Hemocyte Count ; THC	
		Before	After
T1	0	75.90 ± 11.40	7.80 ± 3.75
T2	1	76.50 ± 15.92	8.30 ± 3.55
T3	5	77.10 ± 13.35	12.60 ± 5.31
T4	10	80.90 ± 8.68	11.90 ± 2.71

4.7.2 การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity ; PO activity)

ก่อนการเหนี่ยวนำให้กุ้งเกิดโรค ทำการวัดการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส พบว่าชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส 197.03, 176.68, 214.06 และ 215.46 unit/min/mg protein ตามลำดับ ซึ่งทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4-15

หลังการเหนี่ยวนำให้กุ้งเกิดโรค เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส พบว่าชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่า การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส 153.18, 159.18, 147.29 และ 170.73 unit/min/mg protein ตามลำดับ ซึ่งทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4-15 แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้กุ้งเกิดโรค พบว่า หลังจากเหนี่ยวนำให้กุ้งเกิดโรค การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส มีค่าลดต่ำลง

ตารางที่ 4-15 การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg protein)ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมใบมะรุมในระดับที่แตกต่างกัน ทั้งก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

Treatment	*M. oleifera* leaves powder (percent)	Phenoloxidase activity	
		Before	After
T1	0	197.03 ± 80.92	153.18 ± 61.16
T2	1	176.68 ± 37.91	159.18 ± 79.88
T3	5	214.06 ± 66.40	147.29 ± 89.61
T4	10	215.46 ± 131.98	170.73 ± 45.22

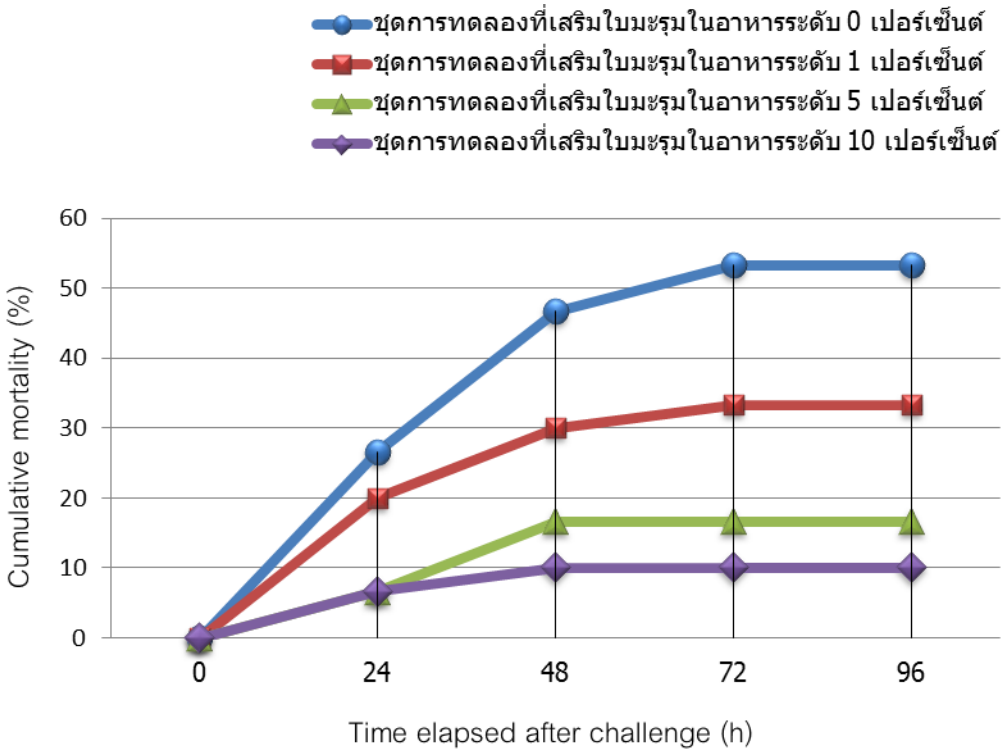
4.7.3 การตายสะสม (Cumulative mortality)

หลังจากการเลี้ยงกุ้งทดลองในครั้งที่ 2 เมื่อครบ 6 สัปดาห์ ทำการทดสอบความต้านทานต่อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 โดยการแช่กุ้งในน้ำที่มีความเข้มข้นของแบคทีเรีย 10^7 cfu/ml ซึ่งมีกลุ่มที่ไม่ชักนำให้เกิดโรค และกลุ่มที่ชักนำให้เกิดโรคซึ่งเป็นกลุ่มทดลอง จากการทดลองไม่พบการตายของกลุ่มที่ไม่ชักนำให้เกิดโรค ในขณะที่กุ้งกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการตายสะสมสูงที่สุด โดยในวันที่ 4 มีอัตราการตายสะสมที่ 53.33 เปอร์เซ็นต์ อัตราการตายสะสมของกุ้งหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่า 53.33, 33.33, 16.67 และ 10.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการตายสะสมแตกต่างกับชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารในระดับ 0 และ 1 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4-16 และ รูปที่ 4-4

ตารางที่ 4-16 การตายสะสมของกุ้งขาว ที่ได้รับอาหารที่เสริมใบมะรุมในระดับที่แตกต่างกัน หลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

Treatment	*M. oleifera* leaves powder (percent)	ปริมาณแบคทีเรีย (cfu/ml)	Cumulative mortality (%)			
			24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
T0	0 (ควบคุม)	น้ำเกลือ	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
T1	0 (ควบคุม)	10^7	26.67^{a} ± 11.55	46.67^{a} ± 20.82	53.33^{a} ± 25.17	53.33^{a} ± 25.17
T2	1	10^7	20.00^{a} ± 17.32	30.00^{ab} ± 20.00	33.33^{ab} ± 15.28	33.33^{ab} ± 15.28
T3	5	10^7	6.67^{a} ± 5.77	16.67^{ab} ± 11.55	16.67^{b} ± 11.55	16.67^{b} ± 11.55
T4	10	10^7	6.67^{a} ± 5.77	10.00^{b} ± 0.00	10.00^{b} ± 0.00	10.00^{b} ± 0.00

*ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกต่างกันในแนวตั้งเดียวกันบ่งบอกถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 4-4 การตายสะสมของกุ้งขาว ที่ได้รับอาหารที่เสริมใบมะรุมในระดับที่แตกต่างกัน หลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639

4.7.4 การทดสอบหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

สุ่มตัวอย่างกุ้งที่ตาย มาทดสอบเพื่อยืนยันสาเหตุการตายว่าเกิดจากการได้รับ *V. harveyi* เข้าสู่ร่างกาย โดยการนำ hepatopancreas ละลายในน้ำเกลือ แล้วนำมา spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครส (TCBS) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18 – 24 ชั่วโมง พบว่าเกิดโคโลนีสีเขียวของ *V. harveyi* ซึ่งเป็นการยืนยันว่ากุ้งตายด้วยเชื้อชนิดนี้จริง

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดใบมะรุมต่อการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (Screening Test; disc diffusion assay)

จากการวิจัยสารสกัดจากธรรมชาติและสมุนไพรเพื่อหาประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ ซึ่งกระทำกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน พบว่าสมุนไพรหลายชนิดออกฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียได้ Direkbusarakom *et al*. (1998) ทำการศึกษาสมุนไพรไทยต่อการต้าน *V. harveyi* พบว่าสารสกัด ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*), กะเม็ง (*Eclipta alba*), มะระขี้นก (*Momordica charantia*), ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus debilis*), ก้างปลาเครือ (*P. reticulatus*) และฝรั่ง (*Psidium guajava*) สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* ได้ ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml อัญชลี ธำมรงค์คงสถิต และ จิราพร โรจน์ทินกร (2550) ทำการศึกษาสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในกุ้งก้ามกราม พบว่าสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสง และ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อให้เกิดโรคเปลือกกร่อน ได้แก่ กระเทียมสด เปลือกทับทิม ใบชาเขียวญี่ปุ่น ใบหูกวาง ใบชะพลู เมล็ดเทียนตาตั๊กแตน เหง้ากระชายม่วง ใบมะระหวาน หญ้าลิ้นงู ใบลำโพงขาว ใบขี้เหล็ก ใบและผลมะระขี้นก ในขณะที่ กระเทียมสด เปลือกทับทิม ใบชาเขียวญี่ปุ่น ใบชะพลู เมล็ดเทียนตาตั๊กแตน และใบมะระหวาน สามารถต้านการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* ซึ่งก่อให้เกิดโรคเสี้ยนดำและโรคจุดดำบนเปลือกกุ้ง นอกจากนี้ การศึกษาของชุติมา ขมวิลัย และคณะ (2555) พบว่าสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio* spp. 6 ชนิด ได้แก่ *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* *V. mimicus*, *V. cholera* และ *V. vulnificus*

จากงานวิจัยการใช้มะรุมในการต้านแบคทีเรียในหลายปีที่ผ่านมา พบว่าฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบได้เกือบทุกส่วนของลำต้น เช่น เมล็ด (Spiliotis *et al*., 1997; Jabeen *et al*., 2008; Bukar *et al*., 2010) ราก (Dewamgan *et al*., 2010) ก้านใบ (Thilza *et al*., 2010) ใบ (Peixoto *et al*., 2011) ดอก (Nepolean et al., 2009; Talreja, 2010) ในงานวิจัยได้ใช้ใบมะรุมมาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Valatmathy *et al*. (2010) ซึ่งใช้สารสกัดใบมะรุมต่อการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ซึ่ง

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้ Rahman *et al*., 2009 ได้ใช้สารสกัดใบมะรุมที่สกัดจากเอทานอลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis* และ *Sarcina lutea* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Shigella shinga*, *S. sonnei* และ *Pseudomonas aeruginosa*

ใบมะรุมมีสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านการเจริญของแบคทีเรีย โดยพบสารประกอบ flavonoids ซึ่งเป็น polyphenol ของสารประกอบ phenolics ในส่วนของใบ (Amaglo *et al*., 2010) Nepolean *et al*. (2009) ทำการวิเคราะห์สารพฤกษเคมีพบว่ามีสารประกอบ tannins, saponins, flavonoids, glycoside และ terpenoids ในสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วย 95% เอทานอล Vongsak *et al*. (2013) พบสารประกอบ flavonoids และสารประกอบ phenolics ในปริมาณสูง Doughari *et al*. (2007) พบว่าในสารสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอลมีสารประกอบ saponins, tannins, phenols และ alkaloid ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ออกฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลชีพได้ (Lutterodt *et al*., 1999; Valatmathy *et al*., 2010) สารประกอบ flavonoids เป็นสารออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และออกฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียโดยไปยับยั้ง membrane bound enzyme (Cowan, 1999 ; Kasolo *et al*., 2010) tannins ออกฤทธิ์ฆ่าของแบคทีเรีย (Cowan, 1999 ; Kasolo *et al*., 2010) นอกจากนี้ในใบของมะรุมมีส่วนประกอบของ alkaloid ที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียโดยมีความสามารถในการเข้าไปแทรกใน DNA ของแบคทีเรีย (Kasolo *et al*., 2010)

5.2 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบมะรุมในการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบมะรุมในการกำจัด *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (Minimum Bactericidal Concentration: MBC)

จากการศึกษาเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถกำจัดแบคทีเรีย (MBC) พบว่า จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร มีเพียงสารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 3.13 mg/ml และ 6.25 mg/ml ที่มีค่าการดูดกลืนแสงลดลง เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณของเชื้อลดลงแปรตามความขุ่นของสารละลาย

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญในอาหารเหลวได้ สามารถนำไปหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถกำจัดแบคทีเรียโดยการนำสารละลายไป spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ จะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งการทดลองครั้งนี้ พบว่า สารสกัดใบมะรุมมีความสามารถในระดับหนึ่ง ในการยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* ทำให้จำนวนแบคทีเรียลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยได้ค่า Percent Reduction of Microorganism เท่ากับ 85.07%, 96.16% และ 99.79% ในสารละลายที่มีสารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 1.56 mg/ml, 3.13 mg/ml และ 6.25 mg/ml ตามลำดับ แต่ทั้งนี้สารสกัดใบมะรุมทุกความเข้มข้น ไม่สามารถกำจัดเชื้อได้ 100% ทำให้ไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถกำจัดแบคทีเรีย (MBC) ได้อย่างแท้จริง จึงพลอตกราฟแสดงปริมาณแบคทีเรีย เมื่อให้สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อดูแนวโน้มของความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุมที่สามารถทำให้แบคทีเรียมีปริมาณลดลงเข้าใกล้ศูนย์มากที่สุด ซึ่งปัจจัยของความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุมจะแปรผกผันกับปริมาณแบคทีเรีย จากข้อมูลที่ได้ (รูปที่ 4-4) สามารถอนุมานได้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุมที่สามารถกำจัดแบคทีเรียได้ 100% คือที่ความเข้มข้นของสารสกัดประมาณ 14-15 mg/ml

จากการศึกษาของ Dholvitayakhun and Trachoo (2012) พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบมะรุม 95% เอทานอล ในการยับยั้งการเจริญของ *Campylobacter jejuni* อยู่ที่ความเข้มข้นสารสกัด 1,000-2,000 µg/ml และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถกำจัดแบคทีเรียอยู่ที่ความเข้มข้นประมาณ 4,000 µg/ml การศึกษาของ Aliyu *et al*.(2008) พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบมะรุมในการยับยั้งการเจริญของ Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) อยู่ที่ความเข้มข้นสารสกัด 4 mg/ml และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถกำจัดแบคทีเรียอยู่ที่ความเข้มข้นประมาณ 5 mg/ml นอกจากนี้ การศึกษาของ Arun *et al*. (2011) พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบมะรุมด้วย Petroleum Ether ในการยับยั้งการเจริญของ *Proteus mirabilis* อยู่ที่ความเข้มข้นสารสกัด 6.25 mg/ml ส่วนค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบมะรุมด้วย Isopropyl Alcohol อยู่ที่ 12.5 mg/ml จากข้อมูลดังกล่าว เห็นได้ว่าค่าการประเมินความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุมที่สามารถยับยั้งและกำจัดแบคทีเรียที่ได้ศึกษาไว้ อยู่ที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุมประมาณ 14-15 mg/ml ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างมากนัก กับการศึกษาของนักวิจัยที่กล่าวไว้ข้างต้น ซึ่งการที่ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบมะรุมในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบมะรุมในการกำจัด

แบคทีเรีย มีค่าแตกต่างกัน ในแต่ละการทดลองนั้น อาจเนื่องด้วยหลายปัจจัย ได้แก่ สารที่ใช้ในการสกัดใบมะรุม คุณภาพของใบมะรุม แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา วิธีดำเนินงานวิจัย เป็นต้น

5.3 ผลของการเสริมใบมะรุมในอาหารต่อการเติบโตและการรอดของกุ้งขาว (การทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2)

งานวิจัยเกี่ยวกับใบมะรุมเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์มีการศึกษาที่ยังไม่แพร่หลายนัก มีการศึกษาการให้ใบมะรุมเป็นอาหารในสัตว์เคี้ยวเอื้อง เพื่อดูประสิทธิภาพการย่อยอาหาร อัตราการกินอาหาร น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ปริมาณการผลิตนม (Sánchez *et al*., 2005; Aregheore, 2002; Araica *et al*., 2010) ทั้งนี้สามารถใช้ใบมะรุมเป็นแหล่งของโปรตีนราคาถูกทดแทนการใช้โปรตีนจากถั่วเหลืองได้ สำหรับการใช้ใบมะรุมในสัตว์น้ำ มีงานวิจัยที่ใช้สารสกัดจากใบมะรุม และใช้ใบมะรุมแห้งผสมในอาหาร พบว่าการใช้สารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยเมทานอลทดแทนการใช้แป้งสาลีในปลานิล ทำให้ค่า plasma cholesterol ลดต่ำลงเมื่อได้รับอาหารที่มีสารสกัดใบมะรุม และค่า growth performance ลดลง เมื่อใช้สารสกัดใบมะรุมเพิ่มสูงขึ้น (Dongmeza *et al*., 2006) จากการศึกษาของ Richter *et al*. (2003) ใช้ใบมะรุมแห้งเป็นโปรตีนทางเลือก ผสมในอาหารปลานิลที่ระดับ 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่มีความแตกต่างของอัตราการตาย แต่พบว่าค่า growth performance ลดต่ำลง ที่ระดับของใบมะรุม 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสรุปได้ว่าสามารถใช้ใบมะรุมในอาหารสูงสุดที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ ทดแทนโปรตีนอื่น โดยที่ไม่ทำให้ค่าการเติบโตลดลง

จากการทดลองการเลี้ยงกุ้งขาวในครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 พบว่า เมื่อสิ้นสุดการทดลองให้ผลแตกต่างกัน โดยการทดลองครั้งที่ 1 ค่าของการเติบโต ได้แก่ น้ำหนักเฉลี่ย อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวัน อัตราการเติบโตจำเพาะ มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณใบมะรุมที่ใช้ผสมในอาหารที่มากขึ้น ในขณะที่การทดลองครั้งที่ 2 ค่าการเติบโตไม่มีความแตกต่างกันในทุกชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในระดับที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจมองได้ว่าระยะเวลาเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ค่าการเติบโตแตกต่างกัน เนื่องจากการทดลองครั้งที่ 1 ใช้เวลาในการทดลอง 9 สัปดาห์ ส่วนการทดลองครั้งที่ 2 ใช้เวลาเพียง 6 สัปดาห์ในการเลี้ยง ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการเสริมใบมะรุมในอาหารเพื่อให้ค่าการเติบโตของกุ้งดีขึ้นต้องใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 9 สัปดาห์ พบว่าในการศึกษาการเสริมใบมะรุมในอาหารเพื่อใช้เลี้ยงกุ้งให้ผลที่แตกต่างกับการใช้ใบมะรุมในการเลี้ยงปลา อาจเนื่องมาจากกุ้ง

สามารถนำโปรตีนที่ได้จากใบมะรุมไปใช้ในการเติบโตได้ดีกว่าปลา เมื่อพิจารณาอัตราการรอด พบว่า ในการทดลองครั้งที่ 1 มีอัตราการรอดที่ต่ำมาก โดยพบว่าชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ที่อัตราการรอดที่ต่ำที่สุด ซึ่งมีค่า 17.8 ± 1.9 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อัตราการรอดที่สูงสุดในการทดลองครั้งนี้อยู่ที่ 26.7 ± 0.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่ต่ำ ในการทดลองครั้งที่ 2 ค่าอัตราการรอดอยู่ระหว่าง 58.9 – 73.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการที่อัตราการรอดต่ำในการทดลองครั้งที่ 1 อาจเนื่องมาจากคุณภาพของน้ำที่ใช้ในการทดลองและระบบกรองที่ใช้ซึ่งแสดงในตารางที่ 5-1 จากการที่สภาวะการเลี้ยงกุ้งขาวในการทดลองครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 มีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก จึงไม่สามารถนำผลการทดลองในครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 มาพิจารณาผลการทดลองร่วมกันได้

อัตราการรอดของกุ้งขาวในการทดลองครั้งที่ 1 มีค่าที่ต่ำมาก เป็นผลจากคุณภาพน้ำในการทดลองที่ไม่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ค่าไนไตรท์ของน้ำ พบว่าเมื่อเลี้ยงกุ้งขาวได้ระยะเวลาหนึ่ง ค่าไนไตรท์ในระบบน้ำสูงถึง 3.0 mg/l อันเป็นผลจากการสะสมของสารอินทรีย์ในระบบ และในระบบไม่สามารถกำจัดไนไตรท์ได้ นอกจากนี้ค่าอัลคาลินิตี้ในระบบลดต่ำลงในสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งค่าอัลคาลินิตี้มีความสำคัญต่อการสร้างเปลือกของกุ้ง การที่ค่าอัลคาลินิตี้ต่ำเป็นผลให้การสร้างเปลือกของกุ้งไม่สมบูรณ์ เปลือกบาง กุ้งเกิดความเครียดและเกิดปัญหาการกินกันเองได้ ทำให้อัตราการรอดของกุ้งในการทดลองครั้งที่ 1 ต่ำ

ตารางที่ 5-1 เปรียบเทียบสภาวะการเลี้ยงกุ้งขาวในการทดลองครั้งที่ 1 และ 2

ปัจจัยสิ่งแวดล้อมในการทดลอง	**การทดลองครั้งที่ 1**	**การทดลองครั้งที่ 2**
1. สถานที่ทำการทดลอง	สถานีวิจัยสัตว์ทะเล อ่างศิลา	ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล
2. ภาชนะในการเลี้ยง	ถังไฟเบอร์กลาสขนาด 300 ลิตร	บ่อปูนขนาด 70 x 70 x 80 (กว้าง x ยาว x สูง) ลูกบาศก์เซนติเมตร
3. แหล่งน้ำ	น้ำทะเลที่สูบเก็บไว้ในถังตัน	น้ำเค็ม 120 ppt จากนาเกลือผสมกับน้ำประปา 0 ppt

ปัจจัยสิ่งแวดล้อมในการทดลอง	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2
4. ความเค็ม	28.2 - 28.3 ppt	25.0 – 27.3 ppt
5. อุณหภูมิ (°C)	26.4 - 28.6	28.4 – 28.7
6. pH	7.74 – 7.84	7.21 – 7.88
7. ออกซิเจนละลายน้ำ (mg/l)	4.60 – 5.52	5.24 – 5.58
8. แอมโมเนีย (mg/l)	0.15 – 1.0	0.15 – 1.0
9. ไนไตรท์ (mg/l)	0.15 – 3.0	0.15 – 0.4
10. อัลคาลินิตี้ (mg/l)	70 - 130	110 – 130
11. ระบบน้ำ	ระบบหมุนเวียนแบบกึ่งปิด	ระบบหมุนเวียนแบบกึ่งปิด
12. การดูดตะกอน	ทุก 2 วัน	ทุก 7 วัน
13. ระบบกรอง	เปลือกหอย เศษกระชัง	เปลือกหอย ไบโอบอล ใยกรอง ไบโอคอต
14. อัตราการรอด (%)	17.8 – 26.7	58.9 – 73.3

5.3 ผลของการเสริมใบมะรุมในอาหารต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว (การทดลองที่ 1)

เซลล์เม็ดเลือดเป็นองค์ประกอบของเลือดที่มีความเกี่ยวพันกับระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์โดยตรง ซึ่งสามารถบ่งชี้ถึงสุขภาพของกุ้งได้ (จำเริญศรี พวงแก้ว และคณะ, 2553) การที่ปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงขึ้นแสดงให้เห็นว่ากุ้งมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น โดยเม็ดเลือดกุ้งที่เพิ่มสูงขึ้นทำหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้อย่างเพียงพอ สามารถต้านการรุกรานจากไวรัสหรือแบคทีเรียอย่างมีประสิทธิภาพ เซลล์เม็ดเลือดมี 3 แบบ ได้แก่ ไฮยาลินเซลล์ เซมิแกรนูลาร์ และแกรนูลาร์เซลล์ (Le moullac *et al*., 1997) ซึ่งจะทำหน้าที่แตกต่างกันไป การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีความเกี่ยวพันกับปริมาณเม็ดเลือด โดยการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเป็นการตอบสนองของเซลล์ที่สำคัญ ทำให้เกิดกระบวนการสร้างเม็ดสีดำ (melanisation) เพื่อกักล้อมสิ่งแปลกปลอมไม่ให้กระจายไปทั่วร่างกาย พบว่ากุ้งที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูง จะมีปริมาณ

เม็ดเลือดสูงตามไปด้วย เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเกิดขึ้นจากการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด (Sritunyalucksana and Söderhäll., 2000)

จากการทดลอง พบว่าค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมใบมะรุมในระดับที่แตกต่างกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของนักวิจัยหลายท่านที่ศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง กิตติมา วานิชกูล และคณะ (2550) ศึกษาการใช้สารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันในกุ้งกุลาดำเพื่อใช้ในการเสริมสุขภาพของกุ้ง พบว่า เมื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 0, 12.5, 25 และ 50 ppm เป็นเวลา 1 เดือน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของปริมาณเม็ดเลือดรวม เช่นเดียวกับการศึกษาของ จำเริญศรี พวงแก้ว และคณะ (2553) ที่ศึกษาผลของอาหารที่เสริมน้ำมันกระเทียม 0, 2.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน ไม่พบความแตกต่างของปริมาณเม็ดเลือดรวม นอกจากนี้ การศึกษาของ Medina-Beltrán *et al*. (2012) พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่เสริม *Echinacea purpurea* และ *Uncaria tomentosa* ซึ่งเป็นสมุนไพรในแถบอเมริกาใต้ ที่ระดับ 0, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 กรัมต่อกิโลกรัม เป็นเวลา 16 วัน

สำหรับค่าการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ซึ่งควรจะมีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับค่าปริมาณเม็ดเลือดรวม พบว่าในการทดลองให้ผลค่อนข้างไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ ในทุกช่วงสัปดาห์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของค่าการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในทุกชุดการทดลอง สอดคล้องกับการทดลองของ จำเริญศรี พวงแก้ว และคณะ (2553) ซึ่งพบว่าค่าการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อให้อาหารที่ผสมน้ำมันกระเทียมในระดับที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 14 วัน แต่อย่างไรก็ตาม ในสัปดาห์ที่ 9 พบว่า ค่าการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อได้รับอาหารที่เสริมใบมะรุมในระดับที่สูงขึ้น

จากงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้สมุนไพร หรือผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จะเห็นได้ว่า สมุนไพร หรือผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี ก็ต่อเมื่อการให้สมุนไพรนั้นๆ โดยการฉีดเข้าสู่ตัวกุ้งแทนการกิน หรือสารที่ใช้ต้องเป็นสารสกัด หรือองค์ประกอบที่ออกฤทธิ์ของสมุนไพร เช่นการใช้สารสกัด *Cyanodon dactylon* ฉีดเข้าสู่ตัวกุ้งโดยตรง (Balasubramanian *et al*., 2008) การใช้สารสกัดจาก *Spirulina platensis* ผสมในอาหาร (Tayag *et al*., 2010) การใช้ Zingerone ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในขิงผสมในอาหาร (Chang *et al*., 2012) ซึ่งจะให้ผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มในกุ้งกันได้ดีกว่า

5.4 ระบบภูมิคุ้มกันและอัตราการตายสะสมหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวด้วยอาหารที่เสริมด้วยใบมะรุมในระดับที่แตกต่างกัน 4 ระดับเป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วสุ่มกุ้งเพื่อเหนี่ยวนำให้กุ้งเกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* ที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^7 cfu/ml พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมและค่าการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสหลังจากกุ้งได้รับเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Li *et al*. (2008) ได้ทดลองวัดค่าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันหลังจากกุ้งได้รับเชื้อ *Vibrio alginolyticus* พบว่าค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ส่วนค่าการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดลงในเวลา 24 ชั่วโมง และค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมจะมีค่ากลับมาเป็นปกติเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ในขณะที่ค่าการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีค่ากลับมาเป็นปกติเมื่อเวลาผ่านไป 168 ชั่วโมง ค่าทางระบบภูมิคุ้มกันจะต่ำสุดเมื่อเวลาผ่านไปเท่าใดนั้น ขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย ขนาดหรือความเข้มข้นเชื้อ ชนิดของกุ้งรวมถึงสุขภาพของกุ้งอีกด้วย การลดลงของไฮยาลินเซลล์เกิดจากการไปรวมตัวกันของเม็ดเลือดในบริเวณที่ได้รับเชื้อเพื่อเข้าสู่กระบวนการกลืนทำลายและเกิดจากการรวมตัวของเซลล์ในการตอบสนองในกระบวนการป้องกันตัว (Fontaine and Lightner, 1974; Li *et al*. 2008) ส่วนการลดลงของแกรนูลาร์เซลล์ เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ degranulation (Johansson and Söderhäll, 1985) ซึ่งส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมลดต่ำลง

การตายสะสมของกุ้งขาว ที่ได้รับอาหารที่เสริมใบมะรุมในระดับที่แตกต่างกัน หลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 โดยวิธีการแช่ เป็นการได้รับเชื้อเหมือนในธรรมชาติ โดยที่กุ้งจะได้รับเชื้อผ่านทางเหงือกและทางเดินอาหารอย่างค่อยเป็นค่อยไป ซึ่งทำให้การกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีการเพิ่มความต้านทานได้ดีขึ้น พบว่า ที่เวลา 96 ชั่วโมง ชุดการทดลองที่ไม่ได้เสริมใบมะรุมในอาหาร มีการตายสะสมสูงสุด และมีค่าต่ำลง ในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหารที่ระดับ 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Hsieh *et al*. (2008) ได้ทดลองฉีดเชื้อ *V. alginolyticus* ในกุ้งขาว พบว่ากุ้งที่ได้รับ rutin ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่ได้มาจาก *Toona sinensis* มีอัตราการรอดสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Fu *et al*. (2007) พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมสารสกัดจาก *Gelidium amansii* ที่ระดับ 0.5, 1 และ 2 กรัมต่อกิโลกรัม มีอัตราการรอดสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ภายหลังจากการได้รับเชื้อ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาของ Kanjana *et al*. (2011) พบค่าการตายสะสมต่ำสุดในกุ้งกุลาดำ ภายหลังจากการได้รับเชื้อ *V. harveyi* เมื่อกุ้งได้รับสาร

สกัดสาหร่ายแดง *Gracilaria fisheri* ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีการตายสะสมสูงสุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 4 วัน ทั้งนี้การเสริมสารจากสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ในอาหารเพื่อใช้ในการเลี้ยงกุ้ง จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารและลดปริมาณของเชื้อก่อโรคที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารได้ (Velmurugan and Citarasu, 2010)

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลของการเสริมใบมะรุมในอาหารต่อการเติบโต การรอด และความต้านทานต่อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาว มีข้อสรุปดังนี้

1. สารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 6.25 mg/ml มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ในระดับหลอดทดลอง

2. ค่าความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุมที่คาดว่า จะสามารถกำจัด *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ได้ 100% อยู่ที่ความเข้มข้นของสารสกัดประมาณ 14-15 mg/ml

3. การเสริมใบมะรุมในอาหารเพื่อใช้ในการเลี้ยงกุ้งขาว ส่งผลให้การค่าการเติบโตดีขึ้น ได้แก่ น้ำหนักเฉลี่ย อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวัน และอัตราการเติบโตจำเพาะ ของกุ้งขาว เมื่อเลี้ยงกุ้งขาวด้วยอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์

4. การเสริมใบมะรุมในอาหารเพื่อใช้ในการเลี้ยงกุ้งขาว ไม่ส่งผลต่อการรอดของกุ้งขาว เมื่อเลี้ยงกุ้งขาวด้วยอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์

5. การเสริมใบมะรุมในอาหารเพื่อใช้ในการเลี้ยงกุ้งขาว ไม่ส่งผลต่อการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ค่าปริมาณเม็ดเลือดรวม และค่าการทำงานของฟีนอลออกซิเดส ของกุ้งขาว เมื่อเลี้ยงกุ้งขาวด้วยอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ แต่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในชุดการทดลองที่เสริมใบมะรุมในอาหาร เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 9

6. การเสริมใบมะรุมในอาหารเพื่อใช้ในการเลี้ยงกุ้งขาว สามารถเพิ่มความต้านทานต่อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ที่ความเข้มข้นเชื้อประมาณ 10^7 cfu/ml ได้

ข้อเสนอแนะ

1. จากข้อมูล histidine ในใบมะรุมแห้ง พบว่ามีค่าสูงถึง 613 mg ต่อน้ำหนักแห้ง 1 g ซึ่งเป็นข้อมูลที่ควรนำมาพิจารณา เนื่องจาก การย่อยสลายกรดอะมิโน histidine โดยแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ histidine decarboxylase ให้เปลี่ยนเป็น histamine ได้ ซึ่ง histamine เป็นสารก่อภูมิแพ้ ทำให้เกิดอาการแพ้ในลักษณะต่างๆได้ ดังนั้น ในการศึกษาที่ได้ใช้ใบมะรุมแห้งผสมในอาหารทดลองเพื่อใช้ในการเลี้ยงกุ้ง ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่นการตรวจวัดค่า histamine ในเนื้อกุ้ง ซึ่งในหลายประเทศมีข้อจำกัดปริมาณ histamine ในผลิตภัณฑ์ทางทะเล ให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 50-200 ppm

2. การที่ความเค็มของน้ำที่ใช้ในการการทดลองทั้งสองครั้ง ไม่ใช้น้ำที่ความเค็มต่ำซึ่งเป็นความเค็มที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งขาว เนื่องจากในการทดลองต้องทำการศึกษาความต้านทานต่อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาว ซึ่ง *V. harveyi* สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่ความเค็มสูง ดังนั้นในการทดลองจึงใช้น้ำความเค็มสูง

3. ค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ซึ่งเป็นตัวที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของอาหารทดลอง ในการทดลองครั้งที่ 1 มีค่าอยู่ในช่วง 1 – 2 ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำเกินไป อาจเป็นผลมาจากการให้อาหารแก่กุ้งมากเกินพอ ทำให้มีเศษอาหารเหลืออยู่ในระบบการทดลอง และส่งผลถึงคุณภาพน้ำอีกด้วย

4. จากการทดสอบคุณค่าทางอาหารในแต่ละสูตร พบค่าปริมาณโปรตีนที่สูงขึ้นในแต่ละสูตรอาหารที่เสริมใบมะรุมที่มากขึ้น แสดงให้เห็นว่ามะรุมมีปริมาณโปรตีนที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นการเสริมใบมะรุมในอาหาร จำเป็นต้องหาค่าปริมาณโปรตีนในใบมะรุม และนำมาคำนวณร่วมกับโปรตีนจากสัตว์หรือพืชในสูตรอาหารด้วย นอกจากนี้ยังสามารถใช้ปริมาณโปรตีนเป็นตัวกำหนดหรือควบคุมการผลิตสูตรอาหารเพื่อให้มีมาตรฐานเดียวกัน ในการผลิตอาหารทดลองแต่ละครั้ง

5. การใช้สมุนไพรในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือเพิ่มความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค โดยส่วนใหญ่มักจะไม่รายงานถึงสารออกฤทธิ์ที่แน่ชัด แต่จะอ้างถึงสรรพคุณโดยรวมของ

สมุนไพรนั้นๆ แต่ถ้าใช้สมุนไพรที่ไม่ได้ผ่านการสกัดให้บริสุทธิ์เช่นการใช้ผงจากใบมะรุมในการทดลองครั้งนี้ จำเป็นต้องใช้ในปริมาณสูงเพื่อให้ได้ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและต้านทานโรคได้ดี ในขณะที่การใช้สารที่สกัดบริสุทธิ์จะสามารถควบคุมการออกฤทธิ์ของ active ingredient ได้ดีกว่าและใช้ในปริมาณที่น้อยกว่ามาก สำหรับการศึกษาครั้งนี้ไม่ใช้สารที่สกัดได้จากใบมะรุมเพื่อผสมในอาหารทดลอง เนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้อาจมีผลรบกวนต่อจุลชีพที่ใช้ในการทดลองโดยตรงหรือส่งผลต่อตัวสัตว์ทดลองได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กิตติมา วานิชกุล, นนทวิทย์ อารีย์ชน และ งามผ่อง คงคาทิพย์. 2550. การใช้สารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 : สาขาวิชาประมง. กรุงเทพฯ, หน้า 212-220 (786 หน้า)

กรวิภา ศรีวัฒนวรัญญู, ประทีป สองแก้ว, นุกูล อินทระสังขา. 2551. การประยุกต์ใช้โปรตีนต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial Peptides) ควบคุมโรคเรืองแสงในกุ้งขาวัยอ่อน. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง 2(1): 130-137.

จำเริญศรี พวงแก้ว, เจนจิตต์ คงกำเนิด, มณฑิรา ถาวรยุติการต์ และ จิราพร เกษรจันทร์. 2553. ประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมในการเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในกุ้งขาว. ใน การประชุมวิชาการกุ้งทะเลแห่งชาติครั้งที่ 7, หน้า 91-102. 7-8 กันยายน 2553 ณ โรงแรมทวินโลตัส จังหวัดนครศรีธรรมราช.

ชัยชาญ ไตรศรีศิลป์. 2545. ฟีนอลออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชัยวุฒิ สุดทองคำ, ธิดา ฉวีภักดิ์ และ ลิลา เรืองแป้น. 2550. ปรสิตและปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในกุ้งขาวแวนาไม, *Penaeus vannamei* ที่เลี้ยงในบ่อดิน. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45: สาขาวิชาประมง. กรุงเทพฯ, หน้า 280-292 (786 หน้า)

ชุติมา ขมวิลัย, ธิดาพร ฉวีภักดิ์ และ วิสุทธิ์ วีระกุลพิริยะ. 2553. ประสิทธิภาพของสารสกัดเปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana*, Linn) ในการกำจัดจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งทะเล. วารสารการประมง. 63(4): 321-325

นิตยา ยิ้มเจริญ, นนทวิทย์ อารีย์ชน, ชุมพล ศรีทอง และ นิติ ชูเชิด. 2549. การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 : สาขาประมง. กรุงเทพฯ, หน้า 214-228 (644 หน้า)

ภิญโญ เกียรติภิญโญ. 2545. วิธีปฏิบัติสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว แอล.วานาไม. (Practical Technology for *Litopenaeus vannamei* Culture). สมุทรปราการ. สำนักพิมพ์เมืองเกษตรแม็กกาซีน : 4-15.

มัณฑนา ใจเย็น. 2553. ผลของสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าป่นต่อการเจริญเติบโต และสุขภาพของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิศิษย์ เกตุปัญญาพงศ์. 2550. การใช้สมุนไพรเพื่อลดสารตกค้างอันตรายในเนื้อสัตว์. วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา 2 (ฉบับที่ 1): 82-94

สมบัติ รักประทานพร. 2542. การเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ด้วย *Bacillus* สายพันธุ์ S11. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อัญชลี ธำมรงค์คงสถิต และ จิราพร โรจน์ทินกร. 2550. ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งก้ามกราม. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 1(2): 192-200.

ภาษาอังกฤษ

Aliyu, A.B., Musa, A.M., Abdullahi, M.S., Oyewale, A.O. and Gwarzo, U.S. 2008. Activity of plant extracts used in Northern Nigerian traditional medicine against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences. 7(1): 1-8.

Amaglo, N.K., Bennett, R.N., Lo Curto, R.B., Rosa, E.A.S., Lo Turco, V. 2010. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. Food Chemistry. 122: 1047-1054.

Anwar, F., Ashraf, M. and Bhanger, M.I. 2005. Interprovenance variation in the composition of *Moringa oleifera* oilseeds from Pakistan. Journal of the American Oil Chemists' Society 82: 45-51.

Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M. and Gilani, A.H. 2007. *Moringa oleifera*: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. Phytotherapy Research 21: 17-25.

AOAC. 1995. Meat and meat products. In Official Methods of Analysis, 16th Ed., Association of Official Analytical Chemists International, Virginia.

Araica, B.M., Spörndly, R., Sánchez, N.R. and Spörndly, E. 2011. Moringa (*Moringa oleifera*) leaf meal as a source of protein in locally produced concentrates for dairy cows fed low protein diets in tropical areas. Livestock Science. 137: 10-17.

Aregheore, E.M. 2002. Intake and digestibility of *Moringa oleifera*–batiki grass mixtures by growing goats. Small Ruminant Research. 46: 23-28.

Arun, T. and Purnachandra Rao, C.H. 2011. Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of *Moringa oleifera* Lam. against *Proteus mirabilis* from Urinary Tract Infected Patients. International Journal of PharmTech Research. 3(4): 2118-2123.

Balasubramanian, G., Sarathi, M., Venkatesan, C., Thomas, J. and Hameed, A.S.S. 2008. Studies on the immunomodulatory effect of extract of *Cyanodon dactylon* in shrimp, *Penaeus monodon*, and its efficacy to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). Fish and Shellfish Immunology. 25: 820-828.

Bautista, M.N., Eusebio, P.S. and Welsh, T.P. 2003. Utilization of feed pea, *Pisum sativum*, meal as a protein source in practical diets for juvenile tiger shrimp, Penaeus monodon. Aquaculture 225: 121-131.

Booth, F.E.M. and Wickens, G.E. 1998. Non-timber uses of selected arid zone trees

and shrubs in Africa. In FAO Conservation Guide, Food and Agriculture Organization, Rome 176 pp.

Bukar, A., Uba, A. and Oyeyi, T.I. 2010. Antimicrobial profile of *Moringa olefera* lam. extracts against some food – borne microorganisms. Bayero Journal of Pure and Applied Sciences. 3(1): 43-48.

Chang, Y.P., Liu, C.H., Wu, C.C., Chiang, C.M., Lian, J.L. and Hsieh, S.L. 2012. Dietary administration of zingerone to enhance growth, non-specific immune response, and resistance to *Vibrio alginolyticus* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles. Fish and Shellfish Immunology. 32: 284-290.

Christybapita, D., Divyagnaneswari, M. and Michael, R.D. 2007. Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. Fish & Shellfish Immunology 23: 840-852.

Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. 12: 564-582.

Dahot, M.U. 1998. Antimicrobial activity of small protein of *Moringa olefera* leaves. Journal of Pharmacy. 6(1-2): 1-10.

Dewamgan ,G., Koly, K.M., Vadlamudi, V.P., Mishra, A., Poddar, A. and Hirpukar, S.D. 2010. Antibacterial activity of *Moringa oleifera* (Drumstick) root bark. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2(6): 424-428.

Dholvitayakhun, A. and Trachoo, N. 2012. Antibacterial Activity of Ethanol Extract from Some Thai Medicinal Plants against *Campylobacter Jejuni*. World Academy of Science, Engineering and Technology. 65: 41-44.

Direkbusarakom, S., Ezura, Y., Yoshimizu, M. and Herunsalee, A. 1998. Efficacy of Thai Traditional Herb Extracts against Fish and Shrimp Pathogenic Bacteria. Fish Pathology. 33(4) 437-441.

Domrongpokkaphan, V. and Wanchaitanawong, P. 2006. *In vitro* Antimicrobial Activity of *Bacillus* spp. Against Pathogenic *Vibrio* spp. In Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). Kasetsart Journal (Natural Science) 40: 949-957.

Dongmeza, E., Siddhuraju, P., Francis, G. and Becker, K. 2006. Effects of dehydrated methanol extracts of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves and three of its fractions on growth performance and feed nutrient assimilation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* (L.)). Aquaculture. 261(1): 407-422.

Dore, I. and Frimodt, C. 1987. An Illustrated Guide to Shrimp of the World. Osprey Books, Huntington, New York, USA.

Doughari, J.H., Pukuma, M.S. and De, N. 2007. Antibacterial effects of *Balanites aegyptiaca* L. Drel. and *Moringa oleifera* Lam. on *Salmonella typhi*. African Journal of Biotechnology. 6(19): 2212-2215.

Fahey, J.W. 2005. *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Trees for Life Journal 1:5.

Faizi, S., Siddiqui, B.S., Sareem, R., Siddiqui, S., Aftab, K. and Gilani, A.H. 1995. Fully acetylated carbamate and hypotensive thiocarbamate glycosides from *Moringa oleifera*. Phytochemistry 38: 957-963.

Faizi, S., Siddiqui, B.S., Sareem, R., Aftab, K., Shaheen, F., Gilani, A.H. 1998. Hypotensive constituents from the pods of *Moringa oleifera*. Planta Medica. 64: 225-228.

Fontaine, C.T. and Lightner, D.V. 1974. Observations on the Phagocytosis and Elimination of Carmine Particles injected into the Abdominal Musculature of the White Shrimp, *Penaeus setiferus*. Journal of Invertebrate Pathology. 24: 141-148.

Freiberger, C.E., Vanderjagt, D.J., Pastuszyn A., Glew, R.S., Mounkaila, G., Millson, M. and Glew, R.H. 1998. Nutrient content of the edible leaves of seven wild plants from Niger. Plant Foods for Human Nutrition 53: 57-69.

Fu, Y.W., Hou, W.Y., Yeh, S.T., Li, C.H. and Chen, J.C. 2007. The Immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish and Shellfish Immunology. 22(6): 673-685.

Fuglie, L.J. 1999. The Miracle Tree/ *Moringa oleifera*: Natural Nutrition for the Tropics, Dakar, Senegal: Church World Service (Online). Available from : http://www.treesforlife.org (2010,July 21)

Ghasi, S., Nwobodo, E. and Ofili, J.O. 2000. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam. in high-fat diet fed wistar rats. Journal of Ethnopharmacology 69: 21-25.

Hameed, A.S. 1993. A Study of the aerobic heterotrophic bacterial flora of hatchery-reared eggs, larvae and post-larvae of *Penaeus indicus*. Aquaculture 117: 195-204.

Hose, J.E., Martin, G.G. and Gerard, A.S. 1990. A decapod hemocyte classification scheme Integrating morphology, cytochemistry and function. The Biological Bulletin 178: 33-45.

Hsieh, T.J., Wang, J.C., Hu, C.Y., Li, C.T., Kuo, C.M. and Hsieh, S.L. 2008. Effects of Rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge. Fish & Shellfish Immunology 25: 581-588.

Jabeen, R., Shahid, M., Jamil, A. and Ashraf, M. 2008. Microscopic evaluation of the antimicrobial activity of seed extracts of *Moringa oleifera*. Pakistan Journal of Botany. 40(4): 1349-1358.

Johansson, M.W. and Söderhäll, K. 1989. A cell adhesion factor from crayfish haemocytes has degranulating activity towards crayfish granular cells. Insect Biochemistry 19: 183-190

Kanjana, K., Radtanatip, T., Asuvapongpatana, S., Withyachumnarnkul, B. and Wongprasert, K. 2011. Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp Penaeus monodon. Fish and Shellfish Immunology. 30: 389-396.

Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G.R. and Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture 128: 203-209.

Kasolo, J.N., Bimenya, G.S., Ojok, L., Ochieng, J. and Ogwal-Okeng, J.W. 2010. Phytochemicals and uses of *Moringa oleifera* leaves in Ugandan rural communities. Journal of Medicinal Plants Research. 4(9): 753-757.

Lackie, A.M. 1980. Invertebrate immunity. Parasitology 80: 393-412.

Lalas, S., Tsaknis, J. 2002. Characterization of *Moringa oleifera* seed oil variety Periyakulam-1. Journal of Food Composition and Analysis. 15(1): 65-77.

Li, C.C., Yeh, S.T. and Chen, J.C. 2008. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection. Fish and Shellfish Immunology. 25(6): 853-860.

Lutterodt, G.D., Ismail, A., Basheer, R.H. and Baharudin, H.M. 1999. Antimicrobial effects of *Psidium guajava* extracts as one mechanism of its antidiarrheal action. Malaysian Journal of Medical Sciences. 6(2): 17-20.

Makkar, H.P.S. and Becker, K. 1996. Nutrional value and whole and ethanol antinutritional components of extracted *Moringa oleifera* leaves. Animal Feed Science Technology 63: 211-228.

McKay, D. and Jenkin, C.R. 1969. Immunity in the invertebrates. II. Adaptive immunity in the crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). Immunology 17: 127-137.

McKay, D. and Jenkin, C.R. 1970. Immunity in the invertebrates. The role of serum

factors in phagocytosis of erythrocytes by haemocytes of the freshwater crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science 48: 139-150.

Medina-Beltrán, V., Luna-González, A., Fierro-Coronado, J.A., Campa-Córdova, A.I., Peraza-Gómez, V., Flores-Miranda, M.D.C., Gutiérrez Rivera, J.N. 2012. *Echinacea purpurea* and *Uncaria tomentosa* reduce the prevalence of WSSV in witheleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. Aquaculture. 358: 164-169.

Morton, J.F. 1991. The horseradish tree, *Moringa pterigosperma* (Moringaceae). A boon to arid lands. Economic Botany 45: 318-333.

Napolean, P., Anitha, J. and Emilin, R.R. 2009. Isolation, analysis and identification of phytochemicals of antimicrobial activity of *Moringa oleifera* Lam. Current Biotica 3: 33-37.

Peixoto, P.R.O., Silva, G.C., Costa, R.A., Fontenelle, J.L.S., Vieira, G.H.F., Filho, A.A.F. and Vieira, R.H.S.F. 2011. In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic *Moringa* leaf extracts. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 1: 201-204.

Perez Farfante, I. and Kensley, B. 1997. Penaeoid and Sergestoid shrimps and prawns of the World. Keys and Diagnoses for the Families and Genera. Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France. V.175, 223p.

Rahman, M.M., Sheikh, M.M.I., Sharmin, S.A., Islam, M.S., Rhaman, M.A., Rhaman, M.M. and Alam, M.F. 2009. Antibacterial Activity of Leaf Juice and Extracts of *Moringa oleifera* Lam. against Some Human Pathogenic Bacteria. Chiangmai University Journal of Natural Sciences 8: 219-226.

Ratchiffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W. and Rhodes, C.P. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. International Review of Cytology 97: 183-350.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. 2009. Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Bioscience and Bioengineering 107: 579-582.

Reade, P.C. 1968. Phagocytosis in invertebrates. Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science 46: 183-350.

Richter, N., Siddhuraju, P. and Becker, K. 2003. Evaluation of nutritional quality of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves as an alternative protein source for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Aquaculture. 217: 599-611.

Sánchez, N.R., Spörndly, E. and Ledin, I. 2006. Effect of feeding different levels of foliage of *Moringa oleifera* to creole dairy cows on intake, digestibility, milk production and composition. Livestock Science 101: 24-31.

Siddhuraju, P. and Becker, K. 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agro-climatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 15: 2144-2155.

Smith, V.J. and Chisholm, J.R.S. 1992. None-cellular immunity in crustaceans. Fish & Shellfish Immunology 2: 1-31

Smith, V.J. and Söderhäll, K. 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapoda and phenoloxidase distribution. Developmental and Comparative Immunology 7: 229-239.

Smith, V.J. and Söderhäll, K. 1986. Cellular immune mechanism in the crustacean. Symposium of the Zoological Society of London 56: 59-79.

Smith, V.J. and Söderhäll, K. 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of Marine invertebrates. Developmental and Comparative Immunology 15: 251-261.

Spiliotis, V., Lalas, S., Gergis, V. and Dourtoglou, V. 1997. Comparison of antimicrobial activity of seeds of different *Moringa olefera* varieties. Pharmaceutical and Pharmacological Letters. 4: 39-40.

Sritunyalucksana, K. and Söderhäll, K. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. Aquaculture. 191: 53-69.

Stewart, J.E. and Zwicker, B.M. 1972. Natural and indiced bactericidal activities in the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*: products of hemocyte-plasma interaction. Canadian Journal of Microbiology 18: 1499-1508.

Talreja, T. 2010. Screening of Crude Extract of Flavonoids of *Moringa oleifera* against Bacteria and Fungal Phatogen. Journal of Phytology. 2(11): 31-35.

Tayag, C.M., Lin, Y.C., Li, C.C., Liou, C.H. and Chen, J.C. 2010. Administration of the hot-water extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish & Shellfish Immunology 28: 764-773.

Thilza, I.B., Sanni, S., Zakari, A.I., Sanni, F.S., Muhammed, T. and Musa, B.J. 2010. *In vitro* Antibicrobial activity of water extract of *Moringa oleifera* leaf stalk on bacteria normally implicated in eye diseases. Academia arena. 2(6): 80-82.

Thörnqvist, P.O. and Söderhäll, K., 1997. Crustacean immune reactions, a short review. In: Flegel, T.W. and Macrae, I.H. (Eds.), Diseases in Asian aquaculture III, Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, pp. 203-218

Valatmathy, K., Babu, P.A.S. and Abhilash, M. 2010. Antimicrobial activity of ethanolic extracts of various plant leaves against selected microbial species. Electronic Journal of Environmental, Agricultureal and Food Chemistry. 9(8): 1378-1382.

Vandenberghe, J., Li, Y., Verdonck, L., Li, J., Sorgeloos, P., Xu, H.S. and Swings, J. 1998. Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. Aquaculture. 169: 121-132.

Velmurugan, S. and Citarasu, T. 2010. Effect of Herbal Antibacterial Extracts on the Gut Floral Changes in Indian White Shrimp *Fenneropeaeus indicus*. Romanian Biotechnological Letters. 15(6): 5709-5717.

Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S. Wongkrajang, Y. and Gritsanapan, W. 2013. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. Industrial Crops and Products. 44: 566-571.

Wattanasatcha, A. 2012. Encapsulation of Thymol for cosmetic preservative application. Master's Thesis, Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

Wickins, J.F. 1976. Prawn biology and culture. Oceanography and Marine Biology - An Annual Review. 14: 435-570.

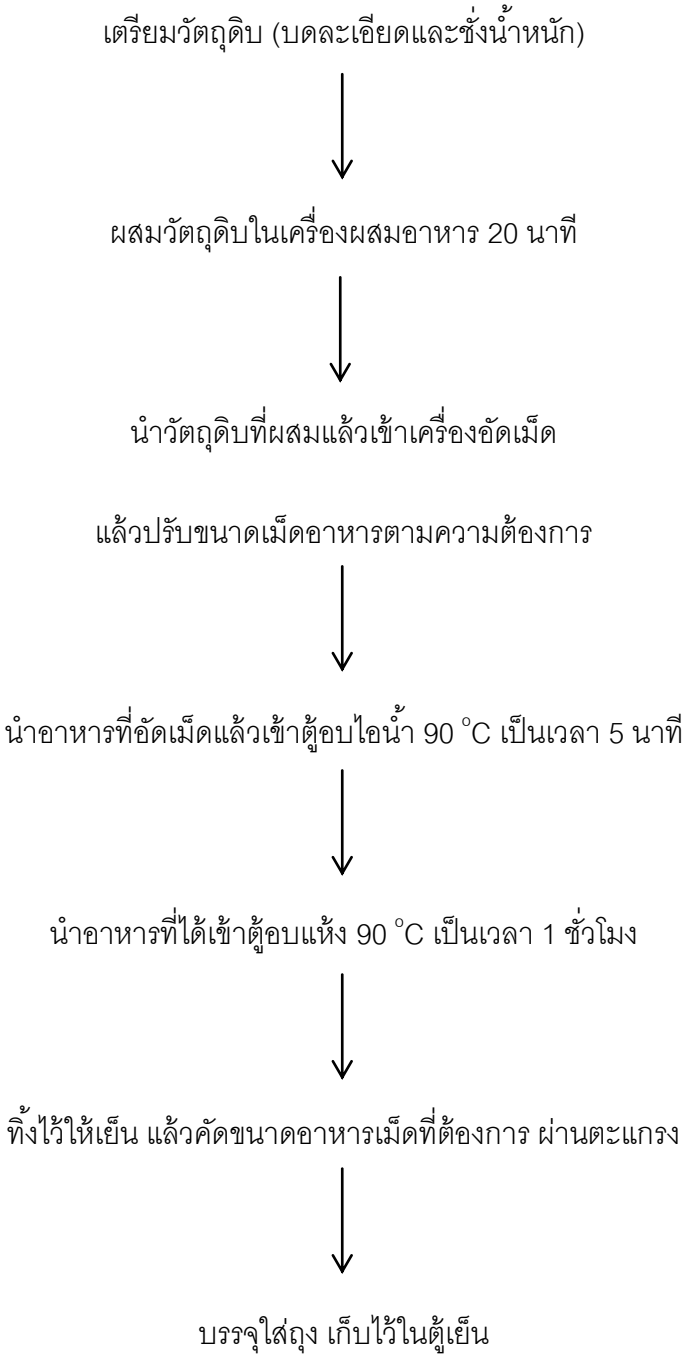
Yeh, R.Y., Shiu, Y.L., Shei, S.C., Cheng, S.C., Huang, S.Y., Lin, J.C. and Liu, C.H. 2009. Evaluation of the antibacterial activity of leaf and twig extracts of stout camphor tree, *Cinnamomum kanehirae*, and the effects on the immunity and disease resistance of whit shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology 27: 26-32.

Yeh, S.T. and Chen, J.C. 2008. Immunomodulation by carrageenans in the white shrimp *Litipenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Aquaculture 276: 22-28.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ขั้นตอนการผลิตอาหารเม็ดสำเร็จรูป



ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ความชื้น ตามวิธีการของ AOAC (1995)

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

1. ตู้อบความร้อน (hot air oven)
2. โถดูดความชื้น (desiccator)
3. Plate หรือภาชนะที่ทนร้อน

วิธีการวิเคราะห์

1. นำ plate ที่ต้องการใช้ในการวิเคราะห์ความชื้นไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 40 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
2. ชั่งน้ำหนักของ plate และบันทึกข้อมูล
3. ชั่งตัวอย่างอาหาร ตัวอย่างละประมาณ 10 กรัม บันทึกข้อมูลโดยละเอียด
4. นำตัวอย่างอาหารเข้าตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. นำตัวอย่างอาหารออกจากตู้อบความร้อน แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น
6. ชั่งน้ำหนักโดยละเอียด เพื่อนำข้อมูลไปใช้ในการคำนวณ

หมายเหตุ น้ำหนักของตัวอย่างอาหารที่หายไปคือความชื้นของตัวอย่างอาหาร

การคำนวณ % ความชื้นด้วยสมการ

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{(a - b) \times 100}{w}$$

เมื่อ a = น้ำหนักของตัวอย่างอาหารก่อนอบแห้ง

b = น้ำหนักของตัวอย่างอาหารหลังอบแห้ง

w = น้ำหนักของตัวอย่างอาหารก่อนอบแห้ง

การวิเคราะห์เถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1995)

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

1. ตู้อบความร้อน (hot air oven)
2. โถดูดความชื้น (desiccator)
3. เตาเผา (muffle furnance)
4. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible)

วิธีการวิเคราะห์

1. อบถ้วยกระเบื้องเคลือบที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 40 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
2. ชั่งน้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบ และบันทึกข้อมูล
3. ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 2 กรัม ลงในถ้วยกระเบื้องเคลือบ บันทึกข้อมูล
4. นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
5. เปิดเตาเผาทิ้งไว้เพื่อระบายความร้อน จากนั้นนำตัวอย่างอาหารใส่ในโถดูดความชื้น และเมื่อตัวอย่างอาหารมีอุณหภูมิเย็นลงจนปกติ นำออกมาชั่งน้ำหนักโดยละเอียด เพื่อนำข้อมูลไปใช้ในการคำนวณ

การคำนวณ % เถ้าจากสมการ

$$\% \text{ เถ้า} = \frac{(b - a) \times 100}{w}$$

เมื่อ a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของเถ้าหลังการเผา

w = น้ำหนักของตัวอย่างอาหารก่อนเผา

การวิเคราะห์โปรตีน ตามวิธีการของ AOAC (1995)

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้

1. เครื่องวิเคราะห์โปรตีน ซึ่งประกอบด้วย
   - เครื่องย่อยอาหาร ยี่ห้อ FOSS TECATORTM DIGESTER AUTO
   - เครื่อง Scrubber ยี่ห้อ FOSS TECATOR SCRUBBER
   - EYELA CA-1112CE
   - KJELPETM 8400 Analyzer Unit
2. สารเร่งรวม (catalyst mixture) ได้แก่ คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 0.8 กรัม และโปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 7 กรัม ผสมให้เข้ากัน
3. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น
4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 40 %
5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 1 โมล/ลิตร
6. สารละลายโซเดียมไฮดรอกซ์เข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร
7. สารละลาย Bromocresol green เตรียมโดย การละลาย Bromocresol green 0.1 กรัม ในเอทานอล 100 มิลลิลิตร
8. สารละลาย Methyl red เตรียมโดยละลาย Methyl red 0.1 กรัม ในเอทานอล 100 มิลลิลิตร
9. สารละลาย mixed indicator เตรียมโดยละลาย Bromocresol green และ Methyl red อย่างละ 0.1 กรัม ในเอทานอล 100 มิลลิลิตร
10. สารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้น 1%
11. สารละลายกรดมาตรฐาน HCl 0.1 โมล/ลิตร
12. Distilled water หรือ Deionized water

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 0.5 กรัม ลงในหลอดแก้ววิเคราะห์โปรตีน บันทึกค่าน้ำหนักตัวอย่างอาหารโดยละเอียด
2. เติมสารเร่งรวม ได้แก่ คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 0.8 กรัม และโปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 7 กรัม
3. เติมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น ประมาณ 12 - 15 มิลลิลิตร
4. นำไปย่อยด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีน ที่อุณหภูมิ 420 $^{\circ}$C เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที จนกระทั่งสารละลายในหลอดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเป็นสีเขียวอมฟ้าใส ทิ้งไว้ให้เย็น
5. เมื่อสารละลายเย็นดีแล้ว นำเข้าเครื่อง KJELPETM 8400 Analyzer Unit ซึ่งเป็นเครื่องกลั่นวิเคราะห์โปรตีน นำค่าปริมาณตัวอย่างอาหารที่ชั่งได้ กรอกลงในเครื่อง
6. เมื่อเครื่องทำการกลั่นสมบูรณ์แล้ว จะแปลผลค่าปริมาณโปรตีนเป็นค่า % โปรตีน จดบันทึกค่า

การวิเคราะห์ไขมัน ตามวิธีการของ AOAC (1995)

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้

1. เครื่องวิเคราะห์ไขมัน Sotex system HT6
2. ตู้อบความร้อน (hot air oven)
3. โถดูดความชื้น (desiccator)
4. ขวดสกัดไขมัน (extraction beaker)
5. ไส้กรอง (thimble)
6. กระดาษกรอง WHATMAN เบอร์ 1
7. สารละลายปิโตรเลียมอีเธอร์ (Petroleum ether)

วิธีการวิเคราะห์

1. อบขวดสกัดไขมัน ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 40 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
2. ชั่งน้ำหนักของขวดสกัดไขมันโดยละเอียด บันทึกข้อมูล
3. อบตัวอย่างอาหารที่จะวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
4. ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 2 กรัม ลงในกระดาษกรอง WHATMAN เบอร์ 1 บันทึกข้อมูล แล้วห่อให้มิดชิดใส่ในไส้กรอง ที่เตรียมไว้แล้วนำไปใส่ในขวดสกัดไขมัน
5. เติมปิโตรเลียมอีเธอร์ให้อยู่ในระดับก้นของไส้กรอง
6. นำขวดแก้วเข้าเครื่องวิเคราะห์ไขมัน Sotex system HT6
7. เปิดเครื่อง เปิดสวิตช์ oil bath ปรับอุณหภูมิไปที่ 150 °C เปิดสวิตช์ pressure control pump เปิด cooler ให้น้ำเข้าสู่ระบบ condenser
8. ทำการกลั่นนาน 6 ชั่วโมง และคอยเติมปิโตเลียมอีเธอร์เมื่อปริมาณปิโตรเลียมอีเธอร์มีปริมาตรลดลง
9. นำขวดสกัดไขมันออกจากเครื่อง แล้วนำไปอบที่ 100 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
10. ทิ้งไว้ให้เย็น นำออกไปชั่งน้ำหนัก บันทึกข้อมูล

การคำนวณหา % ไขมัน

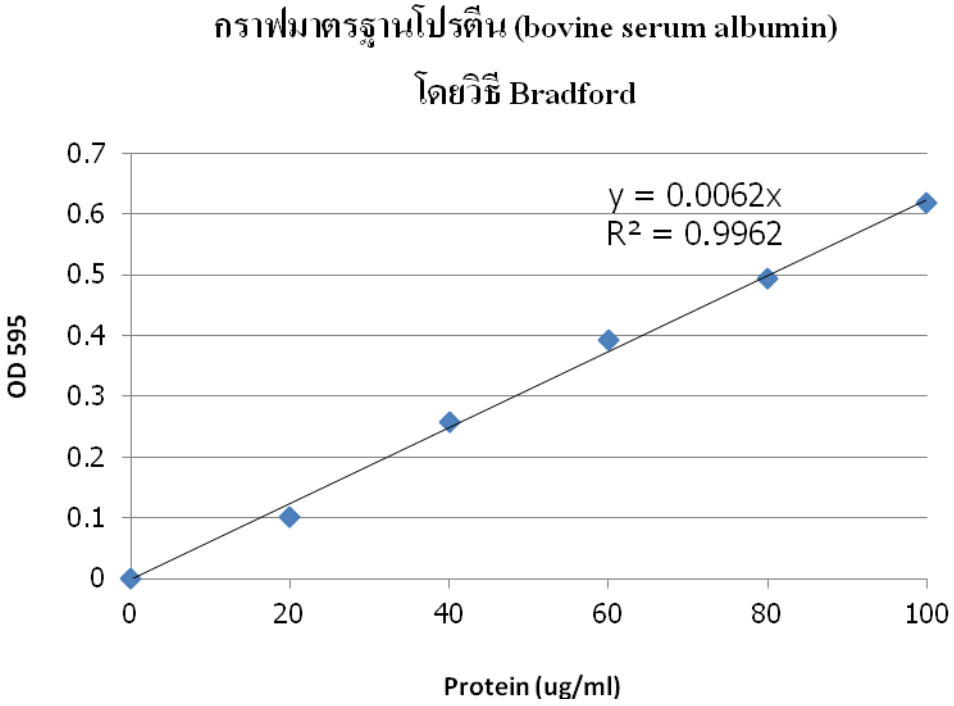
$$\% \text{ ไขมัน} = \frac{(W_3 - W_1) \times 100}{W_2}$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักขวดสกัดไขมัน

W_2 = น้ำหนักตัวอย่าง

W_3 = น้ำหนักขวดสกัดไขมันและไขมันหลังอบ

ภาคผนวก ค


กราฟมาตรฐานโปรตีน (bovine serum albumin)
โดยวิธี Bradford
y = 0.0062x
R² = 0.9962
OD 595
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
20
40
60
80
100
Protein (ug/ml)

ภาคผนวก ง

คุณภาพอาหารทดลอง 4 สูตร

Treatment	*M. oleifera* leaves powder (percent)	Nutrient (percent)			
		Protein	Lipid	Moisture	Ash
T1	0	41.23	8.43	1.01	10.16
T2	1	41.43	8.15	0.49	9.83
T3	5	41.89	7.94	0.48	10.25
T4	10	41.97	8.54	0.33	10.34

ภาคผนวก จ

คุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง

คุณภาพน้ำระหว่างการทดลองครั้งที่ 1

Water quality	Treatment			
	T1	T2	T3	T4
pH	7.74 – 7.81	7.75 – 7.83	7.77 – 7.82	7.76 – 7.84
Dissolved Oxygen (mg/l)	4.81 – 5.46	4.60 – 5.17	4.64 – 5.24	4.76 – 5.52
Salinity (ppt)	28.2 - 28.3	28.2 - 28.3	28.2 - 28.3	28.2 - 28.3
Temperature (^{o}C)	26.4 - 28.6	26.4 – 28.5	26.4 – 28.5	26.4 – 28.5
Ammonia (mg/l)	0.15 – 1.0	0.15 – 1.0	0.15 – 1.0	0.15 – 1.0
Nitrite (mg/l)	0.15 – 3.0	0.15 – 3.0	0.15 – 3.0	0.15 – 3.0
Alkalinity (mg/l)	70 - 130	70 - 130	70 - 130	70 – 130

คุณภาพน้ำระหว่างการทดลองครั้งที่ 2

Water quality	Treatment			
	T1	T2	T3	T4
pH	7.21 – 7.61	7.30 – 7.88	7.25 – 7.62	7.35 – 7.54
Dissolved Oxygen (mg/l)	5.35 – 5.55	5.49 – 5.58	5.24 – 5.54	5.35 – 5.56
Salinity (ppt)	25.0 – 27.1	25.0 – 26.8	25.0 – 27.0	25.0 – 27.3
Temperature (^{o}C)	28.4 – 28.6	28.4 – 28.6	28.4 – 28.7	28.4 – 28.6
Ammonia (mg/l)	0.15 – 1.0	0.15 – 1.0	0.15 – 1.0	0.15 – 1.0
Nitrite (mg/l)	0.15 – 0.4	0.15 – 0.4	0.15 – 0.4	0.15 – 0.4
Alkalinity (mg/l)	110 – 130	110 – 130	110 – 130	110 – 130

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวฤทัย โลทะกะ เกิดเมื่อวันที่ 17 กรกฎาคม 2529 ภูมิลำเนา จังหวัดปทุมธานี สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนฤทธิยะวรรณาลัย กรุงเทพมหานคร ในปีการศึกษา 2547 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551 และได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต ในสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2552

ได้เข้าร่วมเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ ในหัวข้อ Effects of drumstick *Moringa oleifera* leaves supplemented diets on growth, survival and immune response of White shrimp *Litopenaeus vannamei* ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 ณ Empress Convention centre จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างวันที่ 17-19 ตุลาคม 2555