ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

เรื่อง การเพิ่มภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวด้วยสารสกัดจากพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิ
Increasing immune in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by *Bacopa monniera*

ชื่อนักศึกษา นางสาวพชรพร อ่างทอง

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ดร. อัจฉรี เรืองเดช
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา .....
(ดร. อัจฉรี เรืองเดช)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ์)

ภาควิชารับรองแล้ว

.....
(รองศาสตราจารย์ ศักดิ์ชัย ชูโชติ)
หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
วันที่ 16 เดือน พ.ค. พ.ศ. 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

23141

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การเพิ่มภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวด้วยสารสกัดจากพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิ

Increasing immune in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by *Bacopa monniera*

T099201

โดย

นางสาว พชรพร อ่างทอง

ปพ.
พ174ก
2549

เลขหมู่ 99201
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี 15 JUN 2550

b 11882384
i

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร 10520

ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การเพิ่มภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวด้วยสารสกัดจากพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิ

Increasing immune in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by *Bacopa monniera*

การเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ในปัจจุบันมักประสบปัญหาเรื่องโรค โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย เช่น *Vibrio* sp. พรมมิ (*Bacopa monniera*) เป็นพรรณไม้น้ำที่ทั่วโลกนำมาศึกษาในด้านเภสัชศาสตร์ ซึ่งสารสกัดจากพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิมีสรรพคุณในการเป็นยารักษาโรคต่างๆ มากมาย รวมทั้งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักของพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิคือ ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ และอัลคาลอยด์ เป็นที่น่าสนใจว่ามีการใช้สารสกัดจากพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิในคนและสัตว์บกมาเป็นเวลานาน แต่สำหรับในสัตว์น้ำยังไม่มีการนำมาใช้ การศึกษาในครั้งนี้จึงศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดจากพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว ซึ่งจากการศึกษาพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์จากพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิความเข้มข้น 1,000 ppm มีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดชนิดที่มีกรานูลมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่น โดยมีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดชนิด granulocyte จำนวน 2.27 ± 0.32 , ชนิด semi -granulocyte จำนวน 1.98 ± 0.33 และจำนวนเซลล์เม็ดเลือดรวมเป็น 4.25 ± 0.39 ล้านเซลล์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดชนิดที่มีกรานูลมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi* พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์จากพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิความเข้มข้น 1,000 ppm มีอัตราการรอดตายสูงที่สุด โดยมีอัตราการรอดตาย 92.50 ± 7.50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (96 ชั่วโมงหลังจากการใส่เชื้อ) โดยเริ่มมีการตายที่เวลา 96 ชั่วโมงหลังจากการใส่เชื้อ ส่วนการเจริญเติบโตของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันเมื่อสิ้นสุดการทดลอง จากการศึกษานี้สามารถกล่าวได้ว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จากพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิสามารถเสริมสร้างภูมิคุ้มกันในกุ้งได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ต้องขอขอบพระคุณ ดร. อัจฉรี เรืองเดช และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ เป็นอย่างสูงที่ได้ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือมาโดยตลอด ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงที่ให้ความรู้ในด้านต่างๆ และให้คำอบรมสั่งสอน ขอขอบคุณ คุณบุปผา จงพัฒน์ และคุณนภพล เผ่ามนัส ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ในการทดลอง ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือเป็นอย่างดี ขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือ และสุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ที่ให้ความรัก กำลังใจและอบรมสั่งสอน จนประสบความสำเร็จ และขอบคุณน้องสาวที่เป็นทั้งเพื่อนและน้องที่คอยเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

นางสาวพชรพร อ่างทอง

เมษายน 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	9
ผลการทดลองและวิจารณ์	14
สรุปและข้อเสนอแนะ	19
เอกสารอ้างอิง	20
ภาคผนวก	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร	14
2	อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่เวลาต่างๆ กันหลังจากการใส่ เชื้อ *Vibrio harveyi*	16
3	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง	17

ตารางผนวกที่		หน้า
1	จำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ไม่ได้รับสารสกัดจากพรมมิ (กลุ่มควบคุม)	22
2	จำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 100 ppm	23
3	จำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 1,000 ppm	24
4	ค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของเชื้อ *Vibrio harveyi* และจำนวนโคโลนีเฉลี่ยที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน	25
5	อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) หลังจากได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่เวลาต่างๆ กัน	25
6	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของต้นพรมมิ	3
2	โครงสร้างเคมีของ saponins บางชนิดที่สามารถแยกได้จากพรมมิ	4
3	Yellow fluorescent lipofuscin ในเซลล์ hippocampus ของหนูภายใต้สภาวะต่างๆ	6
4	ลักษณะเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งชนิดต่างๆ ภายใต้กล้องเฟสคอนทรัส (contrast phase microscopy) (a) คือ hyaline haemocyte (b) คือ small granule haemocyte (c) คือ large granule haemocyte	7
5	กิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสที่เกิดภายในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งชนิดต่างๆ โดยแสดงเป็นผลรวมของการเกิดกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสต่อจำนวนเซลล์ SGH คือsmall granule haemocyte LGH คือ large granule haemocyte	8
6	จำนวนเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาวชนิด granulocyte (a) , ชนิด semi-granulocyte (b) และจำนวนเซลล์เม็ดเลือดรวมทั้งหมด (c)	15
7	อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) (เปอร์เซ็นต์) ที่เวลา 24 , 48, 72 และ 96 ชั่วโมงหลังจากการใส่เชื้อ *Vibrio harveyi*	17

ภาพผนวกที่		หน้า
1	กราฟมาตรฐานระหว่างค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และจำนวนโคโลนีเฉลี่ยของเชื้อ *Vibrio harveyi*	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

Bacopa monniera หรือพรมมิ เป็นพรรณไม้น้ำที่อยู่ในครอบครัว Scrophulariaceae มีชื่อสามัญว่า Brahmi พบได้ทั่วไปในเขตอบอุ่น ในพื้นที่ที่มีน้ำขังหรือในพื้นที่ชื้นแฉะ ลักษณะของลำต้นอวบน้ำ เลื้อยทอดไปตามพื้น ใบค่อนข้างยาว ขอบใบเรียบ ดอกมีสีม่วง นิยมนำมาประดับในตู้ปลาเพื่อความสวยงาม

พรมมิเป็นพรรณไม้น้ำที่ประเทศอินเดียและประเทศอื่นทั่วโลกนำมาศึกษาในด้านเภสัชศาสตร์ ซึ่งสารสกัดจากพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิมีสรรพคุณในการเป็นยารักษาโรคต่างๆ มากมาย ทั้งสารต่อต้านความเครียด สารต้านอนุมูลอิสระ สารช่วยบำรุงประสาท และสารช่วยสร้างเสริมความจำ สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักของพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิมีหลายชนิดด้วยกันเช่น ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ และอัลคาลอยด์ ซึ่งเป็นสารเคมีที่นิยมนำมาใช้ในทางเภสัช และเป็นที่น่าสนใจว่ามีการใช้สารสกัดจากพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิในคนและสัตว์บกมาเป็นเวลานาน แต่สำหรับในสัตว์น้ำยังไม่มีการนำมาใช้

การเลี้ยงกุ้งขาวในปัจจุบันมักประสบปัญหาเรื่องโรค โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย เช่น *Vibrio* sp. ซึ่งเป็นเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากในการเลี้ยงกุ้งขาว การเพิ่มภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจในการป้องกันโรคในกุ้งขาว การศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดจากพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว โดยเฉพาะสารในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่น่าจะช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวได้ โดยตรวจสอบจากการนับจำนวนเม็ดเลือด และทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวหลังจากที่ได้กินสารสกัดจากพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน

วัตถุประสงค์

1.เพื่อศึกษาปริมาณเม็ดเลือดชนิดต่างๆ ของกุ้งขาว หลังจากกุ้งได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์จากพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน

2.เพื่อศึกษาถึงความสามารถในการต่อต้านเชื้อ *Vibrio harveyi* หลังจากกุ้งได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์จากพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.หลังจากที่กุ้งได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์จากพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิ คาดว่ากุ้งขาวจะมีระดับภูมิคุ้มกันที่สูงขึ้น ทำให้กุ้งมีอัตราการการรอดสูงขึ้น

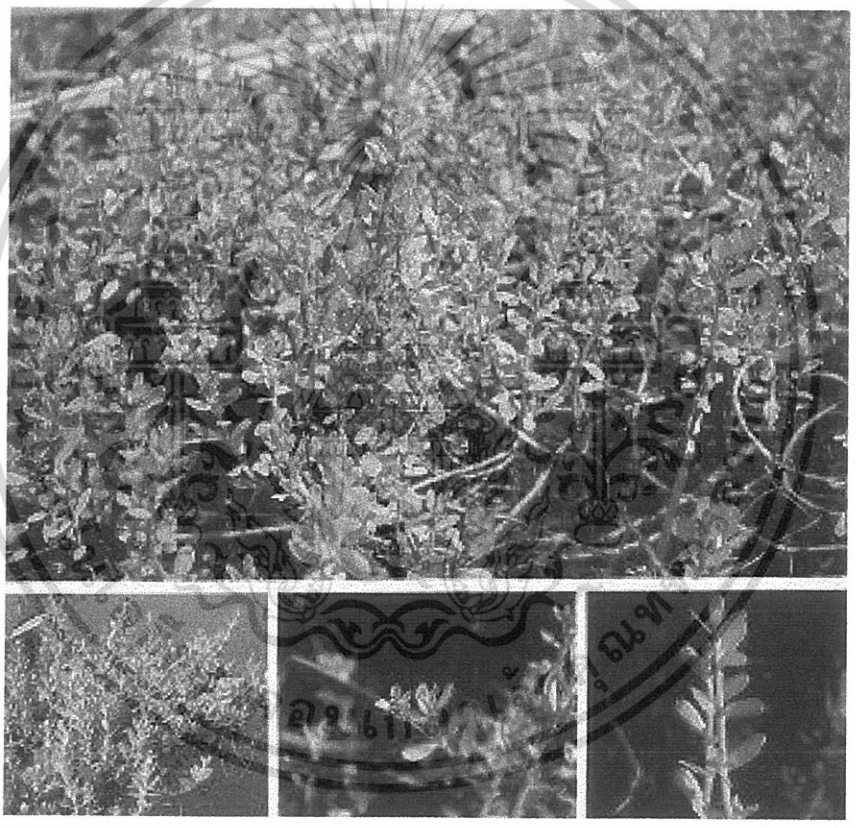
2.เป็นการประหยัดต้นทุนในการเพิ่มคุณค่าในอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้ง เนื่องจากพรรณไม้น้ำสกุลพรมมิสามารถหาได้ง่าย และเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ลักษณะของพรมมิ (*Bacopa monniera*)

Bacopa monniera หรือพรมมิ มีชื่อสามัญว่า Brahmi เป็นพรรณไม้น้ำที่อยู่ในครอบครัว Scrophulariaceae เป็นพืชสมุนไพรที่พบในเขตอบอุ่น เจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ลุ่มชื้นแฉะ และพื้นที่ที่มีน้ำขัง ลักษณะลำต้นใหญ่ อวบน้ำ ไม่มีขน เลื้อยทอดไปตามพื้นและชูยอดขึ้น ใบเป็นใบเดี่ยวรูปไข่ ค่อนข้างยาว โคนใบแคบ ปลายใบกว้างกลมมน ขอบใบเรียบ แตกจากลำต้นแบบตรงข้าม ดอกเป็นดอกเดี่ยวออกตามซอกใบ มีสีม่วง โคนดอกติดกัน ส่วนตอนปลายของกลีบดอกแยกออกเป็น 5 กลีบ มีเกสรตัวผู้ 4 อันซึ่งติดกับกลีบดอก (Russo and Borrelli, 2005)



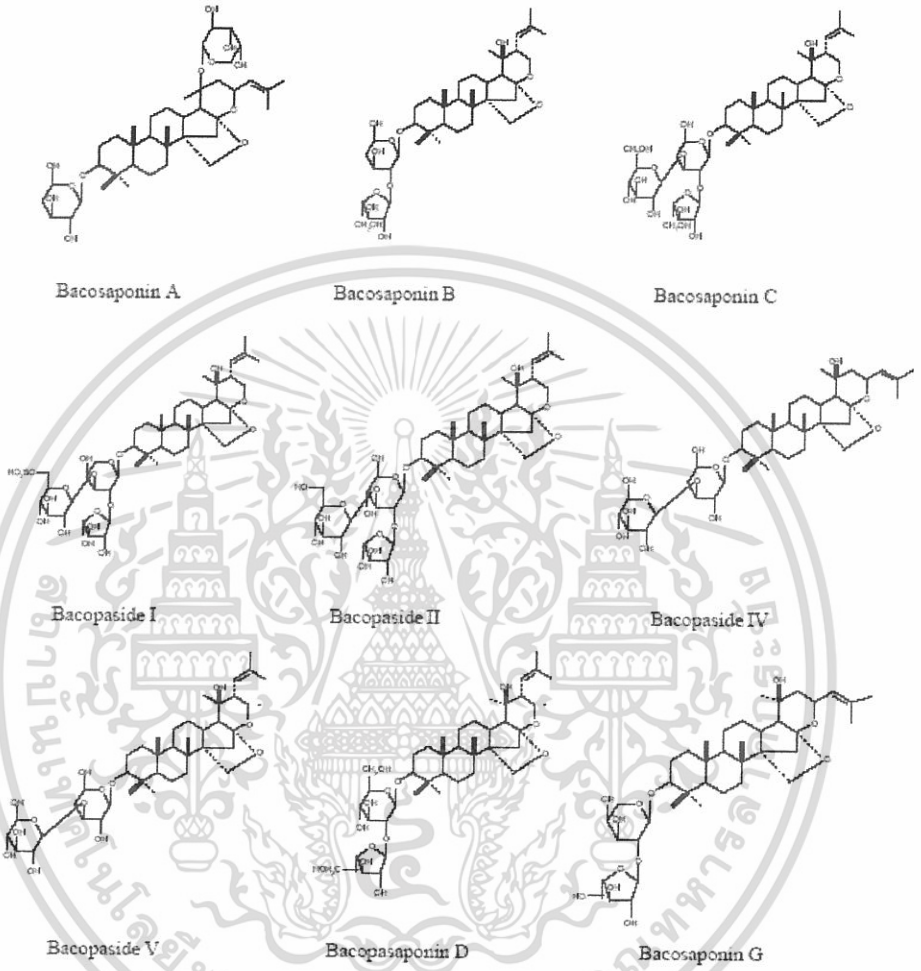
ภาพที่ 1 ลักษณะของต้นพรมมิ

ที่มา : http://www.ku.ac.th/AgrInfo/thaifish/aqplant/aqpt129.html (March, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารที่พบเป็นองค์ประกอบในพรมมิ (*Bacopa monniera*)

Bose and Bose (1931) อ้างโดย Russo and Borrelli (2005) รายงานว่าสามารถแยกสารอัลคาลอยด์ "brahmine" จากพรมมิ ซึ่งมีส่วนประกอบของ bacosides และ triperpenoid saponin สารที่แยกได้จากพรมมิ ดังแสดงไว้ในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างเคมีของ saponins บางชนิดที่สามารถแยกได้จากพรมมิ
ที่มา : Russo and Borrelli (2005)

ประโยชน์ของสารสกัดจากพรมมิ (*Bacopa monniera*)

1. ต่อต้านการเกิดแผลและการอักเสบ

Jain et al. (1994) อ้างโดย Russo and Borrelli (2005) กล่าวว่าสารสกัดจากพรมมิสามารถยับยั้งการอักเสบได้ โดยเมื่อร่างกายมีสิ่งมากระตุ้นให้เกิดการอักเสบ ซึ่งสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบคือ prostaglandin สารสกัดจากพรมมิไม่ได้ยับยั้งการอักเสบของบาดแผลโดยตรงแต่จะไปลดปริมาณของ prostaglandin ทำให้แผลมีการอักเสบน้อยลง Channa

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

et al. (2006) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการต่อต้านการอักเสบโดยใช้สารสกัดจากพรมมิ โดยนำหนูน้ำหนัก 120 – 180 กรัม มาฉีดคาราจีแนนเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบปริมาณ 50 ไมโครลิตร ที่อุ้งเท้าขวา เมื่อครบ 30 นาที แบ่งหนูออกเป็นกลุ่มเพื่อฉีดแอสไพริน และสารสกัดจากพรมมิปริมาณ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้าที่บริเวณช่องท้อง หลังจากนั้นเมื่อครบ 1 ชั่วโมง ทำการวัดขนาดของอุ้งเท้า และทำการวัดอีกโดยเว้นระยะ 1 ชั่วโมงจนครบ 4 ชั่วโมง แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกัน พบว่าสารสกัดจากพรมมิ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้การบวมของอุ้งเท้าลดลง 33 – 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลดีกว่าแอสไพริน ที่ทำให้การบวมของอุ้งเท้าลดลงเพียง 28 – 60 เปอร์เซ็นต์

2. ต่อต้านการเกิดความเครียด

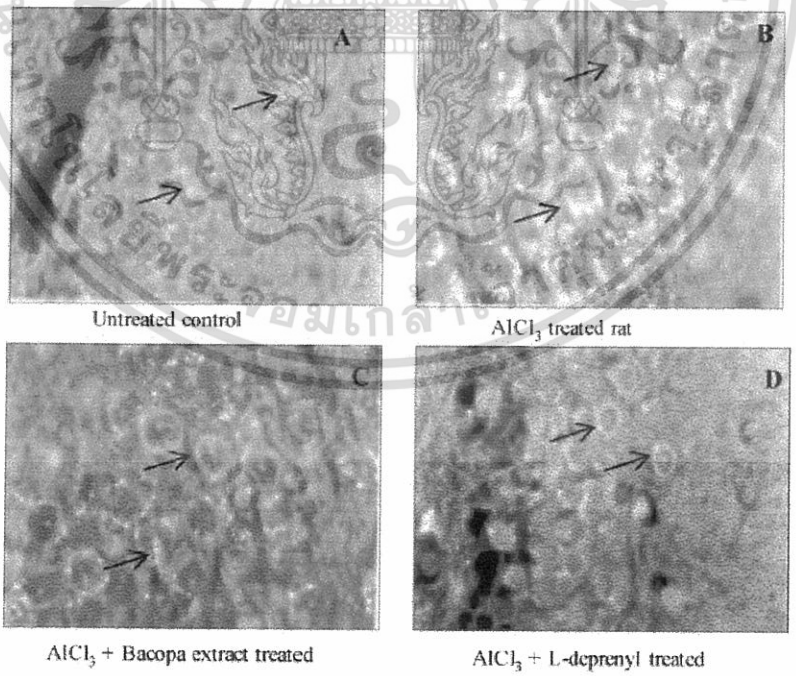
ความเครียดเกิดจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม หรือเกิดจากเชื้อโรคที่มีอยู่ในธรรมชาติ ความเครียดมีผลกระทบต่อภาวะสมดุลในร่างกายและระบบภูมิคุ้มกัน เป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดโรคเป็นจำนวนมาก (Rai et al., 2003) Rai et al., 2003 ได้ทำการทดลองเกี่ยวกับการใช้สารสกัดจากพรมมิ มาใช้ในการต่อต้านการเกิดความเครียดที่เกิดแบบเฉียบพลัน (AS) และความเครียดที่เกิดแบบเรื้อรัง (CS) โดยแบ่งหนูออกเป็นกลุ่มที่ได้รับความเครียดแบบ AS และ CS ซึ่งหนูกลุ่ม AS ให้กินสารสกัดจากพรมมิปริมาณ 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และนำโสมมาใช้ในการเปรียบเทียบผลโดยให้กินโสมปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นเวลา 3 วัน ส่วนหนูกลุ่ม CS ให้กินสารสกัดจากพรมมิและโสมปริมาณเท่ากับของหนูกลุ่ม AS แต่ให้กิน 45 นาทีก่อนหนูได้รับความเครียดต่อเนื่อง 7 วัน ทำให้เกิดความเครียดโดยขังหนูในกระบอกพลาสติกครึ่งทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร ยาว 12 เซนติเมตร เพียงลำพัง เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการฆ่าหนูทันที และเจาะเลือดมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกพลาสมาไปวัดปริมาณกลูโคสในเลือด พบว่าหนูในกลุ่ม AS มีระดับกลูโคสในเลือดสูงขึ้นเมื่อได้รับความเครียด แต่เมื่อได้รับสารสกัดจากพรมมิและโสม ทำให้ระดับกลูโคสในเลือดลดลง ซึ่งระดับกลูโคสในเลือดที่ลดลง แสดงว่าหนูมีความเครียดน้อยลง แต่หนูในกลุ่ม CS พบว่าระดับกลูโคสในเลือดลดลงเมื่อได้รับความเครียด แต่เมื่อได้รับสารสกัดจากพรมมิและโสม ระดับกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อได้รับความเครียดอย่างต่อเนื่องร่างกายจำเป็นต้องใช้พลังงานจากกลูโคสมาใช้ในการปรับภาวะสมดุลของร่างกาย แต่ถ้าไม่พอจะไปดึงพลังงานจากไขมันมาใช้ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากพรมมิสามารถช่วยรักษาระดับกลูโคสในเลือดไว้เป็นพลังงานในการรักษาภาวะสมดุลของร่างกายให้อยู่ในภาวะที่เหมาะสม

3. การออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท

พรมมิถูกนำมาใช้ในการรักษาระบบประสาทเป็นพิษ ช่วยพัฒนาสติปัญญาและความทรงจำ นำมารักษาโรคลมชัก โรคนอนไม่หลับและโรคหอบ (Vohora et al., 2000) พรมมิยัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงการสร้างเสริมของกิจกรรม protein kinase ในสมองส่วน hippocampus ซึ่งสามารถช่วยให้เกิดกิจกรรมการกระตุ้นความทรงจำ (Russo and Borrelli, 2005) สารสำคัญในพรมมิที่แสดงผลในการสร้างเสริมความทรงจำคือ ซาโปนินบาโคไซด์เอและบี (Vohora et al., 2000) Jyoti and Sharma (2006) รายงานว่าอลูมิเนียมในธรรมชาติเป็นสาเหตุในการเกิด oxidative stress จำได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการต่อต้านการชักนำของอลูมิเนียมในการเกิด oxidative stress ในสมองส่วน hippocampus ของหนูโดยใช้สารสกัดจากพรมมิ และใช้ L-deprenyl มาเปรียบเทียบผลที่ได้ ในการศึกษาจะใช้หนูน้ำหนัก 350 – 400 กรัม มาแบ่งเป็น 4 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมให้กินแต่น้ำเท่านั้น กลุ่มที่ 2 ให้กินอลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน กลุ่มที่ 3 ให้กินอลูมิเนียมคลอไรด์ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ร่วมกับสารสกัดจากพรมมิ 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน และกลุ่มที่ 4 ฉีดอลูมิเนียมคลอไรด์ร่วมกับ L-deprenyl ที่บริเวณช่องท้อง ทำการศึกษาเป็นเวลา 5 สัปดาห์หลังจากนั้นทำการตรวจสอบการสะสมของ lipofuscin ด้วย fluorescent microscope พบว่ามีการสะสมเพิ่มขึ้นของ pigment ซึ่งส่วนที่มีการสะสมจะเกิดการเรืองแสง เมื่อให้อลูมิเนียมคลอไรด์ (ภาพที่ 5 A และ B) การสะสมของ lipofuscin ถูกยับยั้งโดยสารสกัดจากพรมมิและ L-deprenyl (ภาพที่ 5 C และ D) ซึ่งการชักนำของอลูมิเนียมจะทำให้เกิดการรวมตัวกันของโครมาติน และมีการสะสม pigment ซึ่งจากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าการชักนำของอลูมิเนียมทำให้เกิด oxidative stress

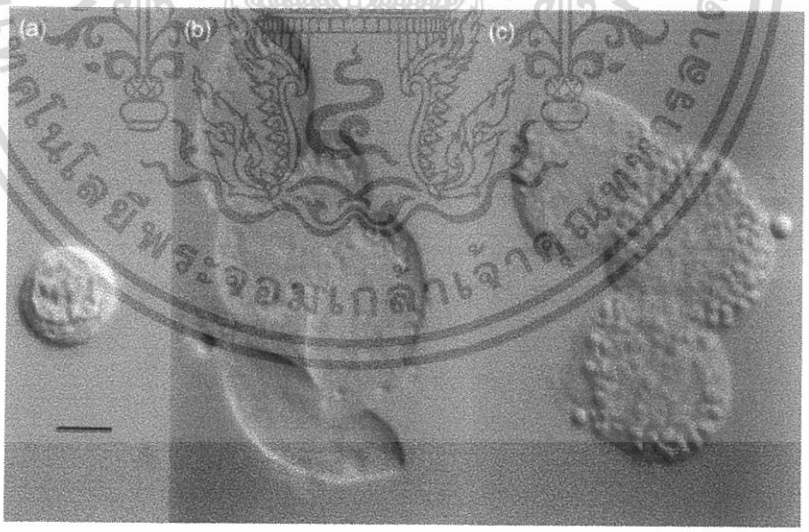


ภาพที่ 3 yellow fluorescent lipofuscin ในเซลล์ hippocampus ของหนูภายใต้สภาวะต่างๆ
ที่มา : Jyoti and Sharma (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะและหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง

เซลล์เม็ดเลือดเป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งในเรื่องการต่อต้านเชื้อโรค ทำลายเซลล์และสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งสามารถจำอนุภาคแปลกปลอมที่มีความซับซ้อนน้อยกว่าเชื้อโรค (Vargas – Albores et al., 2005) จากการศึกษาเม็ดเลือดของกุ้งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบว่ามีเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง 3 ชนิด คือ เซลล์ ไฮยาลิน (hyaline cells) มีขนาดความยาว 6.8 – 13.9 ไมครอน กว้าง 6.4 – 8.3 ไมครอน มีลักษณะเซลล์ผิวเรียบ รูปร่างกลมแบน นิวเคลียสมีขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์ มีไซโตพลาสซึมน้อย ไม่พบการสร้างซูโดโปเดีย และไมโครวิลไลบนผิวเซลล์ ขณะที่เม็ดเลือดชนิดเซลล์เซมิกรานูล (semi – granulocytes) มีลักษณะเซลล์คล้ายรูปกระสวย มีขนาดความยาว 9.0 – 14.2 ไมครอน กว้าง 4.2 – 6.8 ไมครอน มีกรานูลขนาดเล็กภายในเซลล์เล็กน้อย มีการสร้างซูโดโปเดีย และมีไมโครวิลไลบนผิวเซลล์เพียงเล็กน้อย และเซลล์เม็ดเลือดชนิดเซลล์ลาร์จกรานูล (granulocytes) มีขนาดความยาว 12.2 – 14.6 ไมครอน กว้าง 7.2 – 7.8 ไมครอน มีกรานูลขนาดใหญ่ภายในเซลล์มาก มีการสร้างซูโดโปเดียและมีไมโครวิลไลบนผิวเซลล์จำนวนมาก (กิจการ และคณะ , 2543) (ภาพที่ 4) ซึ่งจากการศึกษาเซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง *Penaeus penicillatus* , *P. monodon* และ *P. japonicus* โดยใช้ flow cytometer ของ Yip and Wong (2000) พบว่ามีเซลล์เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินประมาณ 20 - 30 เปอร์เซ็นต์ ชนิดเซมิกรานูลประมาณ 37 – 42 เปอร์เซ็นต์ และชนิดลาร์จกรานูลประมาณ 34 – 36 เปอร์เซ็นต์

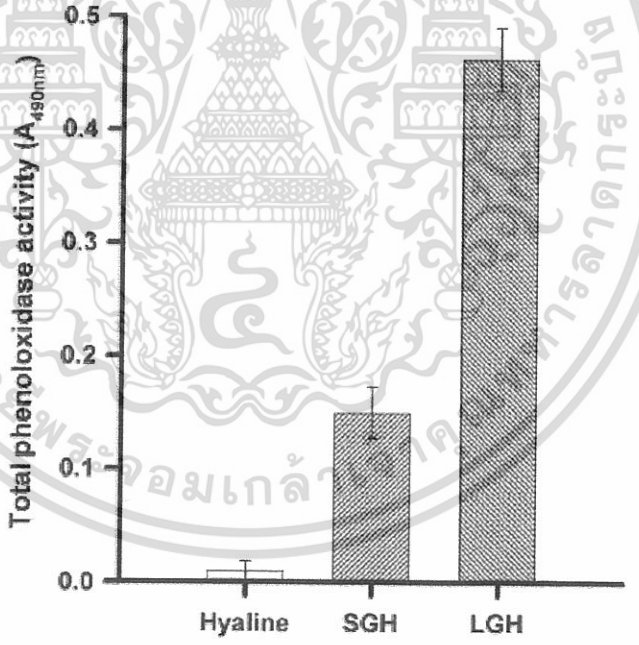


ภาพที่ 4 ลักษณะเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งชนิดต่างๆ ภายใต้กล้องเฟสคอนทรัส (contrast phase microscopy) (a) คือ hyaline haemocyte (b) คือ small granule haemocyte (c) คือ large granule haemocyte

ที่มา : Vargas – Albores et al. (2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งแต่ละชนิดมีหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเซลล์เม็ดเลือดที่มีกรานูลมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (Destoumieux et al., 2000; Vargas – Albores et al., 2005) พบ penaeidin ซึ่งเป็น antimicrobial peptides แสดงให้เห็นว่าเป็นสารที่ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันในกุ้ง โดยอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง *Penaeus vannamei* ซึ่งเก็บสะสมอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดชนิดที่มีกรานูล ส่วนใหญ่จะพบในเซลล์เม็ดเลือดชนิดลาร์จกรานูล และพบในเซลล์เม็ดเลือดชนิดเซมิกรานูลเพียงเล็กน้อย แต่ไม่พบในเซลล์เม็ดเลือดชนิดไฮยาลิน (Destoumieux et al., 2000) และนอกจากนี้ยังพบกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ในเซลล์เม็ดเลือดชนิดที่มี กรานูลของพวกครัซตาเซียน ซึ่งจากการศึกษาเซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง *Litopenaeus vannamei* , *Farfantepenaeus californiensis* และ *Litopenaeus stylirostris* ของ Vargas – Albores et al. (2005) พบว่ามีโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในเซลล์เม็ดเลือดชนิดลาร์จกรานูลถึง 75 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เซลล์เม็ดเลือดชนิดเซมิกรานูลมี 25 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้เกิดกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในเซลล์เม็ดเลือดชนิดลาร์จกรานูลสูงด้วย (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 กิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสที่เกิดภายในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งชนิดต่างๆ โดยแสดงเป็นผลรวมของการเกิดกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสต่อจำนวนเซลล์ SGH คือsmall granule haemocyte LGH คือ large granule haemocyte

ที่มา : Vargas – Albores et al. (2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ชุดสารสกัด
   1.1 สารสกัดแอลกอฮอล์จากพรรณไม้น้ำพรมมิ (*Bacopa monniera*)
   1.2 เตาให้ความร้อน (hot plate)
   1.3 ชุดสกัดสาร
   1.4 ขวดก้นกลม (round bottom flask)
   1.5 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
   1.6 ขวด Duran สีชา
   1.7 เครื่องแก้วปรับปริมาตร
   1.8 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. การนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง
   2.1 กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ขนาด 7 – 10 กรัม
   2.2 เข็มฉีดยา (Syringe) เบอร์ 25 G
   2.3 น้ำแข็ง
   2.4 กระติกเก็บความเย็น
   2.5 eppendorf
   2.6 สไลด์นับจำนวนเม็ดเลือด
   2.7 กล้องจุลทรรศน์
   2.8 ไมโครปิเปต (Micropipette)
   2.9 โซเดียมซิเตรท 10 เปอร์เซ็นต์
3. การเปรียบเทียบความสามารถในการต่อต้านเชื้อ
   3.1 กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ขนาด 7 – 10 กรัม
   3.2 เชื้อ *Vibrio harveyi*
   3.3 เครื่องแก้วสำหรับเลี้ยงเชื้อ
   3.4 เครื่องแก้วปรับปริมาตร
   3.5 ขวด Duran สีใส
   3.6 ไมโครปิเปต (Micropipette)
   3.7 ปิเปต (pipette)
   3.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Flow)

3.10 ตู้บ่มเชื้อ (Incubater)

3.11 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.12 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูง (Centrifuge)

3.13 หม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง (Autoclave)

3.14 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

3.15 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.16 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) , Nutrient broth (NB) และ Thiosulphate – citrate -bile salt-sucrose agar (TCBS)

4. อุปกรณ์อื่นๆ ในการเลี้ยงกุ้ง

4.1 กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ระยะโพสลาวา 15

4.2 ถังพลาสติกหุ้มถุงดำ ปริมาตร 50 ลิตร

4.3 หัวทรายและสายลม

4.4 สายยางดูดตะกอน

4.5 เครื่องวัดความเค็ม (Salinometer)

4.6 อาหารกุ้งสำเร็จรูป

4.7 ขวดฉีดพ่นสารสกัด

4.8 เอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์

4.9 คลอรีน

วิธีการ

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design : CRD) โดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ ใช้กุ้งทดลองถังละ 40 ตัว ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 กลุ่มควบคุม ให้กุ้งกินอาหารที่ไม่เคลือบสารสกัดจากพรรณไม้น้ำพรมมิ

ชุดการทดลองที่ 2 ให้กุ้งกินอาหารที่เคลือบสารสกัดจากพรรณไม้น้ำพรมมิความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

ชุดการทดลองที่ 3 ให้กุ้งกินอาหารที่เคลือบสารสกัดจากพรรณไม้น้ำพรมมิความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ระยะโพสลาวา 15 มาเลี้ยงปรับสภาพในห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ระหว่างการปรับสภาพให้กุ้งขาวกินอาหารสำเร็จรูปจนอิ่ม 3 ครั้งต่อวัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์ทุกวัน ความเค็มของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง 6 ส่วนในพันส่วนตลอดการทดลอง เมื่อครบเวลาคัดขนาดกุ้งที่มีขนาดใกล้เคียงกันมาทดลอง และใส่มุ้งเขียวลงในถังทดลองเพื่อลดปัญหาการกินกันเองของกุ้ง

2. การสกัดสารจากพรรณไม้น้ำพรมมิ

2.1 ล้างทำความสะอาดพรรณไม้น้ำพรมมิ หลังจากนั้นหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ

2.2 อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

2.3 นำพรรณไม้น้ำพรมมิมาบดให้ละเอียด

2.4 สกัดสารจากพรรณไม้น้ำพรมมิโดยใช้พรรณไม้น้ำพรมมิ 5 กิโลกรัมน้ำหนักแห้งต่อเอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ 30 ลิตร แช่ไว้เป็นเวลา 3 วัน โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

2.5 กรองสารสกัดจากพรรณไม้น้ำพรมมิด้วยกระดาษกรอง แล้วนำสารสกัดที่กรองได้ไประเหยเอทานอลจนเหลือแต่สารสกัดจากพรรณไม้น้ำพรมมิ

2.6 ชั่งน้ำหนักสารสกัดจากพรรณไม้น้ำพรมมิที่ได้ แล้วนำไปทำ stock solution ด้วยเอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน 1:10 เก็บรักษา stock ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ใน incubator

3. การเตรียมอาหารและการให้อาหาร

3.1 เตรียมสารสกัดจากพรรณไม้น้ำพรมมิจาก stock solution ให้มีความเข้มข้น 0 , 100 , และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

3.2 ฉีดพ่นสารสกัดจากพรรณไม้น้ำพรมมิลงบนอาหารสำเร็จรูปที่เตรียมไว้ แล้วรอให้แห้ง

3.3 ฉีดพ่นกลิ่นเพื่อดึงดูดให้กุ้งกินอาหาร (amino tonic) เคลือบลงบนอาหารที่เตรียมไว้ หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.4 ให้อาหารกุ้งกินจนอิ่ม วันละ 3 ครั้ง เป็นระยะเวลา 2 เดือน

4. การตรวจสอบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

4.1 การนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือด เก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้สารละลายโซเดียมซิเตรท 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว (anticoagulant) ที่บรรจุในกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และใช้เข็มเบอร์ 25 G นำไปเจาะเลือดกุ้งที่ตำแหน่งโคนขาเดินคู่ที่ 4 โดยใช้อัตราส่วนของเลือดกุ้งต่อสารละลายป้องกันเลือดแข็งตัวเท่ากับ 1 ต่อ 1 แล้วเก็บในกระติกเก็บความเย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทันที หลังจากนั้นนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดซึ่งมีชนิด granulocyte , semi – granulocyte และ hyaline ด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด แล้วคำนวณหาจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดในปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4.2 การเปรียบเทียบความสามารถในการต่อต้านเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยนำเชื้อมาจากหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาใช้ในการทดสอบ โดยมีขั้นตอนดังนี้

4.2.1 เพิ่มจำนวนเชื้อ *Vibrio harveyi* ใน Nutrient broth (NB) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ผสมอยู่ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยบ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อ ที่ 32 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง

4.2.2 ทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและจำนวนเซลล์ของเชื้อในปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยนำเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่อยู่ใน NB ไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเทอาหารทิ้ง แล้วล้างเชื้อด้วย 2 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง จากนั้นเติม 2 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของ NB แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นทำการเจือจางเชื้อด้วย 2 เปอร์เซนต์โซเดียมคลอไรด์ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงแต่ละความเจือจาง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงแต่ละความเจือจางของเชื้อไปหาจำนวนเซลล์ด้วยวิธีการหยดเชื้อ 10 จุด ใช้ปริมาตรจุดละ 10 ไมโครลิตร บน Nutrient agar (NA) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 2 เปอร์เซนต์ แล้วบ่มเชื้อประมาณ 16 – 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ ทำการคำนวณหาจำนวนเซลล์ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐาน และหาสมการเส้นตรง

4.2.3 ทำการเปรียบเทียบความสามารถในการต่อต้านเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยการใช้เชื้อที่มีอายุ 18 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อออกฤทธิ์รุนแรงมากที่สุด (Mazumder et al., 2001) ทำการล้างเซลล์ของเชื้อตามวิธีการข้อ 4.2.2 หลังจากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรแล้วหาจำนวนเซลล์โดยคำนวณจากสมการเส้นตรงที่ได้จากการทำกราฟมาตรฐาน และทำการทดสอบดังนี้

4.2.3.1 นำถังพลาสติกขนาด 15 ลิตร ที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนแล้วมาใส่น้ำเค็มที่มีความเค็ม 6 ส่วนในพันส่วน ปริมาตร 10 ลิตร โดยใส่กุ้งที่ได้รับสารสกัดจากพรรณไม้น้ำพรมมิมาแล้วระยะเวลา 2 เดือน ถังละ 10 ตัว โดยทำ 4 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง ให้อากาศตลอดเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3.2 นำเชื้อ *Vibrio harveyi* มาใส่ลงในถังให้มีความเข้มข้น 10^5 CFU/ml จากนั้นสังเกตพฤติกรรม และบันทึกอัตราการรอดชีวิต ที่เวลา 24 , 48 , 72 และ 96 ชั่วโมง หลังจากใส่เชื้อ

4.2.3.3 นำตับของกุ้งที่ตายมาเขี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS เมื่อเชื้อขึ้น (ประมาณ 16 – 18 ชั่วโมง) จึงตรวจโคโลนีเรืองแสง

การบันทึกข้อมูล

1.บันทึกจำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งชนิด granulocyte , semi – granulocyte และ hyaline ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.บันทึกอัตราการรอดชีวิตของกุ้งหลังจากได้รับเชื้อ 24 , 48 , 72 และ 96 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์และประเมินผลทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS for window version 10.0

สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพ ฯ 10520

ระยะเวลาในการทดลอง

เดือนตุลาคม 2549 ถึง เดือนมีนาคม 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

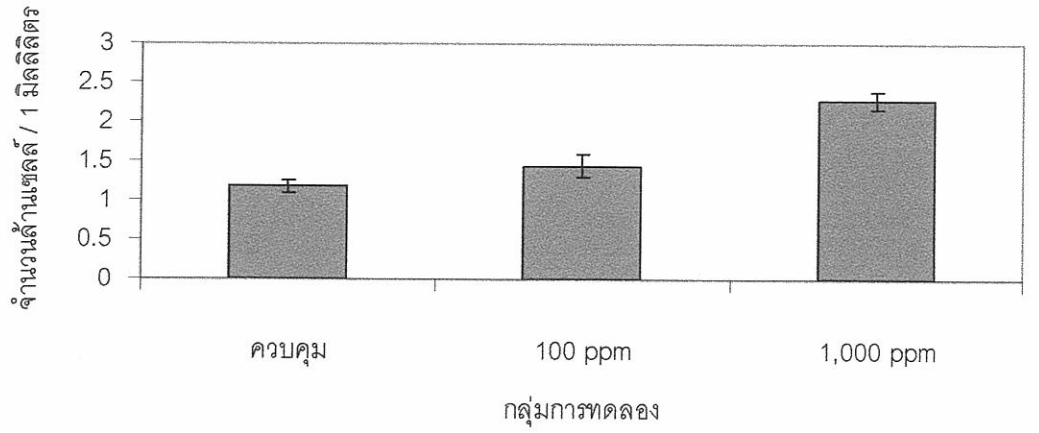
จากการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) พบว่าจำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาวชนิด granulocyte ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 1,000 ppm มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกลุ่มทดลองอื่นๆ โดยมีปริมาณ 2.27 ± 0.32 ล้านเซลล์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร (53.37 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด) ซึ่งมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 100 ppm คือปริมาณ 1.18 ± 0.08 (38.63 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด) และ 1.44 ± 0.15 (45.78 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด) ล้านเซลล์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 6 a) จำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาวชนิด semi - granulocyte ของกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 100 ppm ซึ่งมีปริมาณ 1.88 ± 0.12 (61.37 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด) และ 1.70 ± 0.14 (54.28 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด) ล้านเซลล์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 1,000 ppm ซึ่งมีปริมาณ 1.98 ± 0.33 (46.63 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด) ล้านเซลล์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 6 b) และจำนวนเซลล์เม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 1,000 ppm มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกลุ่มทดลองอื่นๆ โดยมีปริมาณ 4.25 ± 0.39 ล้านเซลล์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 100 ppm คือปริมาณ 3.06 ± 0.20 และ 3.14 ± 0.29 ล้านเซลล์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ตารางที่ 1 และภาพที่ 6 c)

ตารางที่ 1 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร

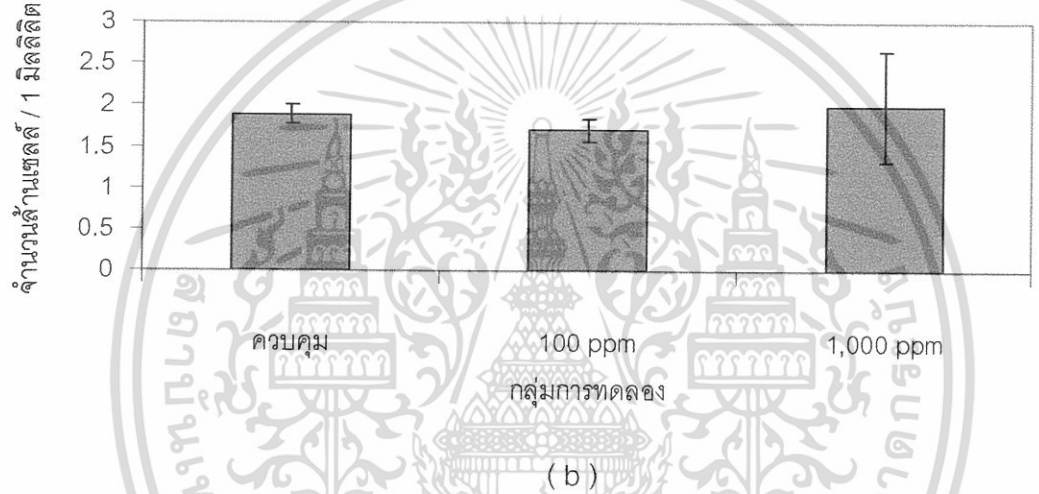
กลุ่มการทดลอง	จำนวนล้านเซลล์ / 1 มิลลิลิตร		
	granulocyte	semi-granulocyte	รวม
ควบคุม	1.18 ± 0.08 ^{a}	1.88 ± 0.12 ^{ab}	3.06 ± 0.20 ^{a}
100 ppm	1.44 ± 0.15 ^{a}	1.70 ± 0.14 ^{ab}	3.14 ± 0.29 ^{a}
1,000 ppm	2.27 ± 0.32 ^{b}	1.98 ± 0.33 ^{b}	4.25 ± 0.39 ^{b}

ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งแต่ละปัจจัย หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

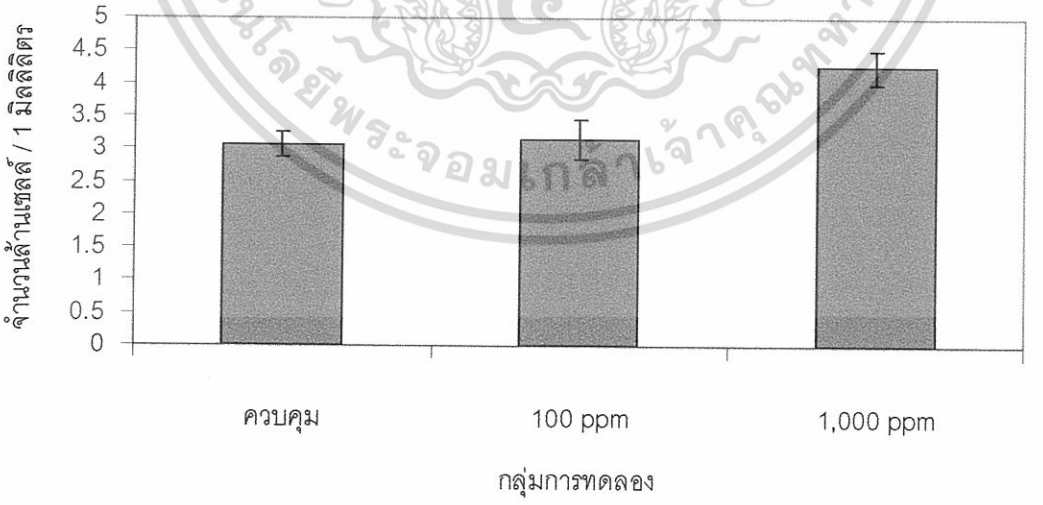
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(a)



(b)



(c)

ภาพที่ 6 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาวชนิด granulocyte (a) , ชนิด semi-granulocyte (b) และ จำนวนเซลล์เม็ดเลือดรวมทั้งหมด (c)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi* ลงในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากใส่เชื้อ กุ้งในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 100 และ 1,000 ppm มีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีอัตราการรอดชีวิต 92.50 ± 7.50 , 100 ± 0.00 และ 100 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากใส่เชื้อ 48 ชั่วโมงพบว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 1,000 ppm มีอัตราการรอดชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีอัตราการรอดชีวิต 77.50 ± 7.50 และ 100.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่กุ้งที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 100 ppm มีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับกลุ่มทดลองอื่นๆ โดยมีอัตราการรอดชีวิต 92.50 ± 7.50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากใส่เชื้อ 72 ชั่วโมง พบว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 100 และ 1,000 ppm มีอัตราการรอดชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีอัตราการรอดชีวิต 60.00 ± 5.77 , 77.50 ± 7.50 และ 100 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังจากใส่เชื้อ 96 ชั่วโมงพบว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมและกุ้งที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 100 ppm มีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีอัตราการรอดชีวิต 35.00 ± 5.00 และ 50.00 ± 11.50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่กุ้งที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 1,000 ppm มีอัตราการรอดชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกลุ่มการทดลองอื่นๆ โดยมีอัตราการรอดชีวิต 92.50 ± 7.50 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองนี้สามารถกล่าวได้ว่าสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 1,000 ppm ทำให้กุ้งมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดหลังจากกุ้งได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* (ตารางที่ 2 และภาพที่ 7)

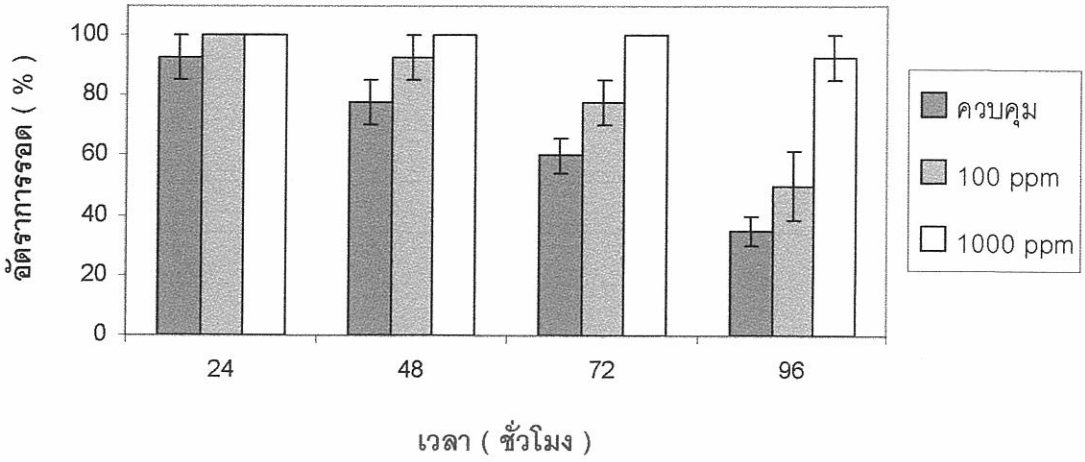
ตารางที่ 2 อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่เวลาต่างๆ กันหลังจากการใส่เชื้อ *Vibrio harveyi*

กลุ่มการทดลอง	อัตราการรอดเฉลี่ย (%) ที่เวลา (ชั่วโมง)			
	24	48	72	96
ควบคุม	92.50 ± 7.50 ^{a}	77.50 ± 7.50 ^{a}	60.00 ± 5.77 ^{a}	35.00 ± 5.00 ^{a}
100 ppm	100 ± 0.00 ^{a}	92.50 ± 7.50 ^{ab}	77.50 ± 7.50 ^{b}	50.00 ± 11.50 ^{a}
1,000 ppm	100 ± 0.00 ^{a}	100 ± 0.00 ^{b}	100 ± 0.00 ^{c}	92.50 ± 7.50 ^{b}

ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งแต่ละปัจจัย หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง



ภาพที่ 7 อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) (เปอร์เซ็นต์) ที่เวลา 24 , 48, 72 และ 96 ชั่วโมงหลังจากการใส่เชื้อ *Vibrio harveyi*

การเจริญเติบโตของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 100 และ 1,000 ppm เมื่อสิ้นสุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวหลังสิ้นสุดการทดลองเป็น 7.86 ± 0.38 , 8.87 ± 0.27 และ 8.99 ± 0.50 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง

กลุ่มการทดลอง	น้ำหนักกุ้งขาว (กรัม) / ตัว	
	เริ่มต้นการทดลอง	สิ้นสุดการทดลอง
ควบคุม	1.29 ± 0.03 [a]	7.86 ± 0.38 [a]
100 ppm	1.28 ± 0.03 [a]	8.87 ± 0.27 [a]
1,000 ppm	1.26 ± 0.04 [a]	8.99 ± 0.50 [a]

ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งแต่ละปัจจัย หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Yip and Wong (2002) ที่จำแนกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง *Penaeus penicillatus* , *P. monodon* และ *P. japonicus* โดยใช้ flow cytometer ซึ่งพบว่ามีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดชนิด semi–granulocyte มากที่สุด (37 – 42 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ ชนิด granulocyte (34 – 36 เปอร์เซ็นต์) และ hyaline (20 – 30 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ และจากการศึกษาเซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง *Farfantepenaeus californiensis* , *Litopenaeus vannamei* และ *Litopenaeus stylirostris* ของ Vargas – Albores et al. (2005) พบว่ามีโปรฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในเซลล์เม็ดเลือดชนิดที่มีกรานูลสูง จึงทำให้เกิดกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในเซลล์เม็ดเลือดชนิดที่มีกรานูลสูงด้วย ซึ่งจากการทดลองพบว่าเมื่อกุ้งได้รับสารสกัดจากพรมมิที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น ทำให้ปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดที่มีกรานูลสูงขึ้นด้วย จึงอาจส่งผลให้กุ้งที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิที่ระดับความเข้มข้นสูงมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น จากการรายงานของ Bose and Bose (1931) กล่าวว่าพบสารประเภท ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ และอัลคาลอยด์ เป็นองค์ประกอบในพรรณไม้น้ำพรมมิ ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นเมื่อกุ้งได้รับสารสกัดจากพรมมิจึงน่าจะส่งผลให้ระบบภูมิคุมกันของกุ้งดีขึ้นด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

จากการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) พบว่ากุ้งขาวในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 1,000 ppm มีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดมากที่สุด และชนิดของเซลล์เม็ดเลือดที่พบจากการตรวจนับเป็นชนิดที่มีกรานูล ได้แก่ granulocyte และ semi – granulocyte

จากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi* ลงในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาว พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 1,000 ppm มีอัตราการรอดตายสูงที่สุดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และมีการตายช้ากว่าในกลุ่มทดลองอื่นๆ โดยเริ่มมีการตายที่เวลา 96 ชั่วโมงหลังจากการใส่เชื้อ ส่วนการเจริญเติบโตของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองเมื่อสิ้นสุดการทดลองมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน

จากการทดลองนี้จึงสามารถกล่าวได้ว่าสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถทำให้กุ้งขาวมีภูมิคุ้มกันสูงขึ้นมากที่สุด โดยทำให้กุ้งขาวมีความสามารถในการต่อต้านเชื้อ *Vibrio harveyi* ดีที่สุด และสามารถทำให้เพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดชนิดที่มีกรานูลให้มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่น

ข้อเสนอแนะ

ควรทดลองเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจากพรมมิให้มีความเข้มข้นสูงกว่า 1,000 ppm ซึ่งอาจทำให้ภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวดีขึ้น และอาจใช้วิธีการตรวจสอบกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในการตรวจสอบระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งและทำการศึกษาต่อไปว่าสารที่เป็นองค์ประกอบของพรรณไม้น้ำพรมมิชนิดใดที่ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, สุภาพ เกียรติทับทิว และ Rudolf Hoffmann. 2543. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : III : การศึกษาทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ) : 589-596.

Bose, K. C., and N.K. Bose. 1931. Observations on the action and use of *Herpestis monniera*. J. Indian Med. Assoc. 1 : 60. (cited by Russo and Borrelli, 2005)

Channa, S., A. Dar, S. Anjum, M. Yaqoob, and A. Rahman. 2006. Anti-inflammatory activity of *Bacopa monniera* in rodents. Ethnopharmacology 104 : 286-289.

Destoumieux, D., M. Munoz, C. Cosseau, J. Rodriguez, P. Bulet, M. Comps, and E. Bachere. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. Cell Science 113 : 461-469.

Jain, P., N. K. Khanna, T. Trehan, V. K. Pendse, and J. L. Godhwani. 1994. Antiinflammatory effects of an Ayurvedic preparation, *Brahmi Rasayan*, in rodents. Indian J. Exp. Biol. 32 : 633-636. (cited by Russo and Borrelli, 2005)

Jyoti, A., and D. Sharma. 2006. Neuroprotective role of *Bacopa monniera* extract against aluminium-induced oxidative stress in the hippocampus of rat brain. Neurotoxicology 27 : 451-457.

Mazumder, R., K. Ganguly, S. G. Dastidae, A. N. Chakrabarty. 2001. Trifluoperazine: a broad spectrum bactericide especially active on staphylococci and vibrios. Antimicrobial Agents 18 : 403-406.

Rai, D., G. Bhatia, R. Pal, S. Singh, and H. K. Singh. 2003. Adaptogenic effect of *Bacopa monniera* (Brahmi). Pharmacology biochemistry and behavior 75 : 823-830.

Russo, A., and F. Borrelli. 2005. *Bacopa monniera*, a reputed nootropic plant: an overview. Phytomedicine 12 : 305-317.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vargas-Albores, F., T. Gollas-Galvan, and J. Hernandez-Lopez. 2005. Functional characterization of *Farfantepenaeus californiensis*, *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* haemocyte separated using density gradient centrifugation. Aquaculture Resesearch 36 : 352-360.

Vohora, D., S. N. Pal, and K. K. Pillai. 2000. Protection from phenytoin-induced cognitive deficit by *Bacopa monniera*, a reputed Indian nootropic plant. Ethnopharmacology 71 : 383-390.

Yip, E. C. H., and J. T. Y. Wong. 2002. Fluorescence activated cell-sorting of haemocytes in Penaeid prawns. Aquaculture 204 : 25-31.

http://www.ku.ac.th/AgrInfo/thaifish/aqplant/aqpt129.html (March, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ไม่ได้รับสารสกัดจากพรมมิ (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มควบคุม	จำนวนเซลล์ ($x10^4$) ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร		รวม
	granulocyte	semi-granulocyte	
1	70	75	145
2	70.67	110	180.67
3	81	125	206
4	85	135	220
5	85	135	220
6	85.67	166.67	252.34
7	88.33	172	260.33
8	94.67	179	273.67
9	100	180	280
10	105	190	295
11	110	200	310
12	115	203.67	318.67
13	130	210	340
14	145	212.67	357.67
15	155	215	370
16	160	228.67	388.67
17	160	230	390
18	165	245	410
19	175	270	445
20	185	275	460

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 100 ppm

100 ppm	จำนวนเซลล์ ($x10^4$) ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร		รวม
	granulocyte	semi-granulocyte	
1	39	80	119
2	46	86	132
3	46.67	110	156.67
4	75	125	200
5	80	130	210
6	100	135	235
7	105	140	245
8	135	140	275
9	140	140	280
10	150	140	290
11	150	145	295
12	160	150	310
13	160	180	340
14	165	190	355
15	180	195	375
16	180	210	390
17	195	250	445
18	210	280	490
19	255	285	540
20	300	290	590

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 3 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับสารสกัดจากพรมมิความเข้มข้น 1,000 ppm

1000 ppm	จำนวนเซลล์ ($x10^4$) ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร		รวม
	granulocyte	semi-granulocyte	
1	70	135	205
2	70.67	155	225.67
3	80.33	165	245.33
4	115	170	285
5	120	175	295
6	120	175	295
7	130	180	310
8	130	185	315
9	145	185	330
10	160	195	355
11	195	195	390
12	200	205	405
13	220	210	430
14	270	213.33	483.33
15	275	220	495
16	355	220	575
17	435	240	675
18	460	240	700
19	490	248.67	738.67
20	500	255	755

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 4 ค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของเชื้อ *Vibrio harveyi* และจำนวนโคโลนีเฉลี่ยที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน

ค่า O.D.	จำนวนโคโลนีเฉลี่ย ($x10^4$)
0.022	188.8
0.047	270
0.101	1,424
0.145	1,672
0.191	3,800

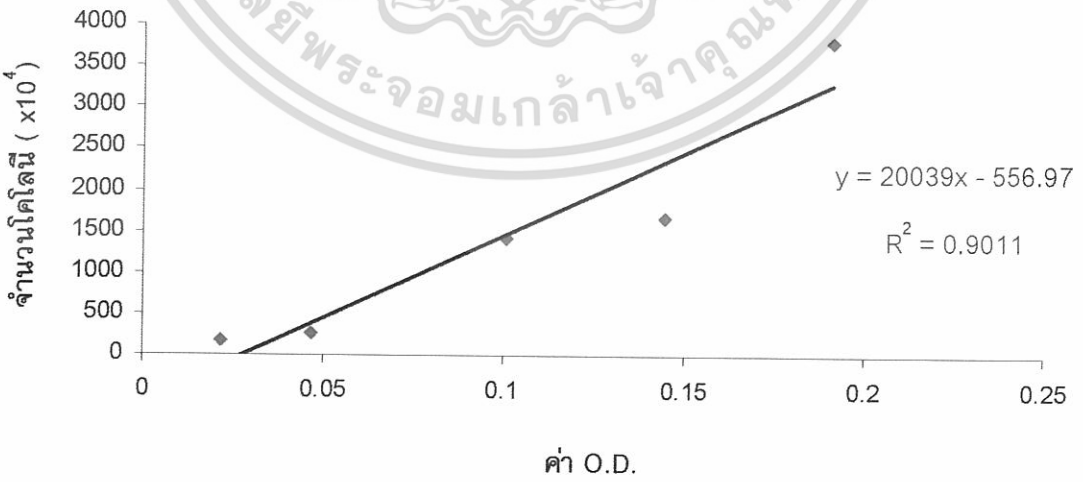
ตารางผนวกที่ 5 อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) หลังจากได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่เวลาต่างๆ กัน

กลุ่มการทดลอง	อัตราการรอด (%) ที่เวลา (ชั่วโมง)			
	24	48	72	96
ควบคุม (1)	100	100	50	50
ควบคุม (2)	70	70	70	30
ควบคุม (3)	100	70	70	30
ควบคุม (4)	100	70	50	30
100 ppm (1)	100	100	70	70
100 ppm (2)	100	100	100	70
100 ppm (3)	100	70	70	30
100 ppm (4)	100	100	70	30
1,000 ppm (1)	100	100	100	100
1,000 ppm (2)	100	100	100	100
1,000 ppm (3)	100	100	100	70
1,000 ppm (4)	100	100	100	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 6 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง

กลุ่มการทดลอง	น้ำหนักกุ้งขาว (กรัม)	
	เริ่มต้น	สุดท้าย
ควบคุม (1)	1.2	8.19
ควบคุม (2)	1.33	7.3
ควบคุม (3)	1.36	7.17
ควบคุม (4)	1.28	8.76
100 ppm (1)	1.2	9.01
100 ppm (2)	1.26	8.18
100 ppm (3)	1.29	9.49
100 ppm (4)	1.37	8.78
1,000 ppm (1)	1.37	10.15
1,000 ppm (2)	1.16	9.51
1,000 ppm (3)	1.24	8.29
1,000 ppm (4)	1.28	8.02



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และจำนวนโคโลนีเฉลี่ยของเชื้อ *Vibrio harveyi*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้