สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของสารสกัดสาหร่ายฉัตรต่อการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และการเจริญเติบโตของปลาแฟนซีคาร์พ (*Cyprinus carpio* Linn.)

EFFECTS OF *Limnophila heterophylla* EXTRACTS ON ANTIOXIDANT, ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND GROWTH PERFORMANCE OF FANCY CARP (*Cyprinus carpio* Linn.)

T132474

ปิยภรณ์ บุญฤทธิ์

PIYAPORN BOONYARIT

วน. 1/61901 2556

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 132474
วัน,เดือน,ปี 18 มิ.ย. 2557

b.12609914
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2556

KMITL-2013-AG-M-081-152

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECTS OF *Limnophila heterophylla* EXTRACTS ON ANTIOXIDANT, ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND GROWTH PERFORMANCE OF FANCY CARP (*Cyprinus carpio* Linn.)

PIYAPORN BOONYARIT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FISHERIES SCIENCE

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2013

KMITL-2013-AG-M-081-152

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2013

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดสาหร่ายฉัตรต่อการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และการเจริญเติบโตของปลาแฟนซีคาร์พ (*Cyprinus carpio* Linn.)
นักศึกษา	นางสาวปิยภรณ์ บุญฤทธิ์
รหัสประจำตัว	51606551
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การประมง
พ.ศ.	2556
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ์

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสาหร่ายฉัตรต่อการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และการเจริญเติบโตของปลาแฟนซีคาร์พ แบ่งเป็น 3 การทดลอง การทดลองที่ 1 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์รวม และความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายฉัตร ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 คือ สภาพใบสาหร่ายฉัตร ได้แก่ ใบสดและใบแห้ง ปัจจัยที่ 2 คือ น้ำ เอทานอล 95 และ อะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สาหร่ายฉัตรใบสดร่วมด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด ($P<0.05$) เท่ากับ 202.88±6.14 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม พบว่า สาหร่ายใบสดที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุด ($P<0.05$) เท่ากับ 174.75±32.48 มิลลิกรัมเควอซิทินต่อกรัมสารสกัด ส่วนการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH และ ABTS assay พบว่า เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูงสุด ($P<0.05$) ในสาหร่ายฉัตรใบสดที่สกัดด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 12.89±0.03 และ 9.15±1.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การทดลองที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสาหร่ายฉัตรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Vibrio cholerae* โดยวิธี disc diffusion ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 คือ สภาพใบสาหร่ายฉัตร ได้แก่ ใบสดและใบแห้งปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นสารสกัด 4 ระดับ ได้แก่ 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส พบว่า สาหร่ายฉัตรใบสดสกัดด้วยเอทานอล 95 และ อะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วยความเข้มข้นสารสกัด 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* สูงสุดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 12.52±0.33 และ 15.83±0.40 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. agalactiae* พบว่า สาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉัตรใบสดสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ร่วมด้วยความเข้มข้นสารสกัด 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 8.68±1.47 มิลลิเมตร และสาหร่ายฉัตรใบแห้งสกัดด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับความเข้มข้นสารสกัด 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 12.29±1.00 มิลลิเมตร นอกจากนี้ พบว่า สารสกัดสาหร่ายฉัตรทั้งสภาพใบสดและใบแห้งร่วมกับทุกระดับความเข้มข้น ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Vibrio cholerae* ได้ การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของการเสริมสาหร่ายฉัตรผงแห้งในอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา ค่า TBARS ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และกิจกรรมเอนไซม์ catalase ของปลาแฟนซีคาร์พ โดยผสมสาหร่ายฉัตรผงแห้งที่ 0, 3, 6, 9 และ 12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 14 สัปดาห์ พบว่า การเจริญเติบโตของปลาแฟนซีคาร์พในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนค่าโลหิตวิทยา พบว่าปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และกิจกรรมเอนไซม์ catalase ของปลาแฟนซีคาร์พในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ค่าฮีมาโตคริตของปลาได้รับอาหารผสมสาหร่ายฉัตร 6, 9 และ 12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารมากกว่าปลาได้รับอาหารผสมสาหร่ายฉัตร 3 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารและชุดควบคุม ($P<0.05$) และปลาได้รับอาหารผสมสาหร่ายฉัตร 12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีค่าเฉลี่ย TBARS ต่ำสุด ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างชุดการทดลอง ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Effects of *Limnophila heterophylla* extracts on antioxidant, antibacterial activity and growth performance of fancy carp (*Cyprinus carpio* Linn.)
Student	Miss Piyaporn Boonyarit
Student ID.	51606551
Degree	Master of Science
Program	Fisheries Science
Year	2013
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Nongnuch Laohavisuti

ABSTRACT

The study aimed to act of ambulia (*Limnophila heterophylla*) extracts on an antioxidant, antibacterial activity and growth performance in fancy carp (*Cyprinus carpio* Linn.) diets. Three experiments were designed, firstly to determine total phenolics, flavonoids content and antioxidant activity of fresh and dry ambulia crude extract with different solvents including water, 95% ethanol and 95% acetone. It was found that fresh leaves with 95% acetone extract showed the highest of total phenolics content ($P<0.05$) 202.88±6.14 mg GAE/g of extract. The highest of total flavonoids content was found in fresh leaves with water extract ($P<0.05$) 174.75±32.48 mg quercetin equivalent/g of extract. The antioxidant activities were investigated by using percentage of DPPH and ABTS assay. It was found that fresh leaves with 95% acetone extract had the highest antioxidant activities ($P<0.05$) 12.89±0.03 and 9.15±1.25 % orderly. Secondary experiment study aimed to work antibacterial activity of ambulia leave extract by 4 different concentration namely 500, 1,000, 1,500 and 2,000 µg/paper disc ambulia leave extract to control bacteria namely *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio cholerae*, the efficiency test was conducted by paper disc diffusion method. The experiment result revealed that fresh leaves extract by ethanol 95% and acetone 95% with concentration of 2,000 µg/paper disc inhibit growth of *A. hydrophila* at 24 hours inhibitory zone were 12.52±0.33 and 15.83±0.40 mm respectively. Ambulia fresh leaves extract by ethanol 95% and powder leaves extract by acetone 95% with concentration of 2,000 µg/paper disc inhibit growth of *S. agalactiae* the observed inhibitory zone were 8.68±1.47 and 12.29±1.00 mm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

respectively. The extract of ambulia showed no inhibitory growth of *P. aeruginosa* and *V. cholerae*. The last experiment to determine the optimum level of ambulia powder at 0, 3, 6, 9 and 12 g/kg feed. After 14 weeks, there were no significant differences on growth performance such as weight gain, specific growth rate (SGR), feed conversion ratio (FCR) and include hematology such as red blood cell, white blood cell, activities of enzyme catalase and percentage inhibition DPPH in blood serum ($P>0.05$) among treatments except hematocrit. Fish fed with 6, 9 and 12 g ambulia powder/kg feed had significantly higher hematocrits than fish fed 0 and 3 g ambulia powder/kg. The TBARS value of blood serum from fish fed 12 mg ambulia powder /kg diets showed the lowest TBARS value at 0.048±0.01 mg MDA/ml blood than other groups ($P<0.05$).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ได้อย่างดีด้วยความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รวมทั้งการให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ศึกษาทดลอง ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องสมบูรณ์ และ ดร. จตุพร บัณฑิต ที่มอบแนวคิดในการทำวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งคำปรึกษา ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ทั้งสองเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. สมชาย หวังวิบูลย์กิจ ผศ.ดร. อัจฉรี เรืองเดช ดร. อนัญญา เจริญพรนิพัทธ และ ดร.พิกุล จิรวานิชไพศาล ที่ให้ความกรุณา ให้คำแนะนำ รวมถึงการตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ ตลอดจนคณาจารย์ในหลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมงภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมงทุกท่านที่ในการให้ความรู้อันเป็นประโยชน์ยิ่ง

ขอขอบคุณ คุณบุปผา จงพัฒน์ คุณแสง ฟักหอม คุณมณฑา นิ่มแสง และคุณชิดชนก สวัสดิ์ศรี ที่ช่วยให้คำแนะนำเทคนิค วิธีการทดลอง การให้คำปรึกษาแนะนำเป็นอย่างดี รวมทั้งความอำนวยสะดวกในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และห้องปฏิบัติงาน

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทั้งปริญญาโทและปริญญาตรี ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และให้กำลังใจที่ดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวบุญฤทธิ์ ที่คอยให้ความรัก กำลังใจ คำปรึกษาที่ดี และให้การสนับสนุนช่วยเหลือทุกด้านตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ปิยภรณ์ บุญฤทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... III

กิตติกรรมประกาศ..... V

สารบัญ..... VI

สารบัญตาราง..... IX

สารบัญภาพ..... XI

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 2

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....

2.1 พรรณไม้น้ำสกุล *Limnophila*..... 4

2.1.1 สาหร่ายฉัตร (*Limnophila heterophylla* Benth.)..... 4

2.1.2 ผักแขยง (*Limnophila aromatiac*)..... 4

2.1.3 ผักกระโฉม (*Limnophila rugosa*)..... 5

2.2 คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ..... 7

2.2.1 คุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และจุลินทรีย์..... 7

2.3 อนุมูลอิสระ..... 9

2.3.1 แหล่งของสารอนุมูลอิสระ..... 10

2.3.2 ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูล..... 10

2.3.3 การป้องกันอันตรายและความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ..... 11

2.3.4 วิธีการวัดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนเดี่ยว..... 12

2.4 การใช้พืชสมุนไพรต่อภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ..... 13

2.4.1 การสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพร..... 13

2.4.2 สารสำคัญจากสมุนไพร..... 14

2.5 ผลของพืชสมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรคสัตว์น้ำ..... 14

2.6 ปลาแฟนซีคาร์พ..... 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.7 ประโยชน์ของพรรณไม้น้ำในอาหารสัตว์น้ำ..... 16

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....

3.1 สัตว์ทดลองและพืชทดลอง..... 20

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี..... 20

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง..... 20

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล..... 25

3.5 สถานที่ทำการวิจัย..... 25

3.6 ระยะเวลาในการทำวิจัย..... 26

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....

4.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์รวมและความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายฉัตร..... 26

4.1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสาหร่ายฉัตร..... 26

4.1.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสาหร่ายฉัตร..... 28

4.1.3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-picrylhdrazyl (DPPH) ของสาหร่ายฉัตร..... 29

4.1.4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 2,2'-azinobis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS) ของสาหร่ายฉัตร..... 31

4.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของสาหร่ายฉัตรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ..... 32

4.2.1 ผลของสารสกัดสาหร่ายฉัตรต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*..... 32

4.2.2 ผลของสารสกัดสาหร่ายฉัตรต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*..... 38

4.2.3 ผลของสารสกัดสาหร่ายฉัตรต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* และ *Vibrio cholerae*..... 42

4.3 การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของการเสริมสาหร่ายฉัตรในอาหารต่อการเจริญเติบโตของปลาแฟนซีคาร์พ..... 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.1 ผลของการให้อาหารผสมสาหร่ายฉัตรต่อการเจริญเติบโตของปลาแฟนซีคาร์พ..... 43

4.3.2 ผลของการให้อาหารผสมสาหร่ายฉัตรต่อค่าโลหิตวิทยาของปลาแฟนซีคาร์พ..... 44

4.3.3 ผลของการให้อาหารผสมสาหร่ายฉัตรต่อค่า TBARS, ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และกิจกรรมของเอนไซม์ catalase..... 44

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 47

บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 54

บรรณานุกรม..... 55

ภาคผนวก..... 64

ประวัติผู้เขียน..... 80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 องค์ประกอบฟลาโวนอยด์และเทอร์ปีนอยด์ของสาหร่ายฉัตร..... 5

2.2 องค์ประกอบฟลาโวนอยด์และเทอร์ปีนอยด์ของผักกระโฉม..... 6

4.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสาหร่ายฉัตรร่วมกับตัวทำละลายที่ต่างกัน..... 27

4.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสาหร่ายฉัตรร่วมกับตัวทำละลายที่ต่างกัน..... 29

4.3 เปอร์เซ็นต์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสาหร่ายฉัตรร่วมกับตัวทำละลายที่ต่างกัน..... 30

4.4 เปอร์เซ็นต์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสาหร่ายฉัตรร่วมกับตัวทำละลายที่ต่างกัน..... 31

4.5 ผลของสาสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดต่างกัน..... 34

4.6 ผลของสารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยตัวทำละลายอะซีโตน 95% ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดต่างกัน..... 36

4.7 ผลของสาสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดต่างกัน..... 39

4.8 ผลของสาสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยตัวทำละลายอะซีโตน 95% ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดต่างกัน..... 41

4.9 การเจริญเติบโตของปลาแฟนซีคาร์พที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาหร่ายฉัตรในปริมาณที่ต่างกัน..... 43

4.10 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการรอดตายของปลาแฟนซีคาร์พที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาหร่ายฉัตรในปริมาณที่ต่างกัน..... 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4. 11 ปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริตของปลาแฟนซีคาร์พที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาหร่ายฉัตรในปริมาณที่ต่างกัน..... 45

4.12 ค่า TBARS ในเลือดปลาแฟนซีคาร์พที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาหร่ายฉัตรในปริมาณที่ต่างกัน..... 45

4.13 เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในเลือด และกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ของปลาแฟนซีคาร์พที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาหร่ายฉัตรในปริมาณที่ต่างกัน..... 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 พรรณไม้น้ำสกุล *Limnophila* 6

4.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสาหร่ายฉัตร..... 28

4.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสาหร่ายฉัตร..... 29

4.3 เปอร์เซ็นต์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสาหร่ายฉัตร..... 30

4.4 เปอร์เซ็นต์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสาหร่ายฉัตร 32

4.5 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ของสารสกัดสาหร่ายฉัตรสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์..... 33

4.6 สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดต่างกัน..... 34

4.7 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ของสารสกัดสาหร่ายฉัตรสกัดด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์..... 35

4.8 สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดต่างกัน..... 36

4.9 สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบแห้งด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดต่างกัน..... 37

4.10 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ของสารสกัดสาหร่ายฉัตรสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์..... 38

4.11 สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดต่างกัน..... 39

4.12 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ของสารสกัดสาหร่ายฉัตรสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 40

4.13 สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดต่างกัน..... 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.14 สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบแห้งด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดต่างกัน..... 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สาหร่ายฉัตร (*Limnophila heterophylla* Benth.) เป็นพรรณไม้น้ำที่อยู่ในครอบครัวเดียวกันกับผักแขยง (*L. aromatica*) ผักกะโฉม (*L. rugosa*) นางดอกหวาน (*L. indica*) ซึ่งผักแขยงเป็นสมุนไพรพื้นบ้าน โดยสามารถนำมารับประทานสดหรือเป็นส่วนประกอบในอาหาร และมีสรรพคุณเป็นพืชสมุนไพรรักษาโรค พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผักแขยงที่สกัดได้มีกลิ่นคล้ายน้ำมันสน และสารสกัดด้วยไอน้ำสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่มักปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น นม เนื้อสัตว์ และไข่ไก่ ที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ จากการตรวจสอบทางพฤกษเคมี พบสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เทอร์ปีนอยด์ (terpenoids) มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (สุกัญญา แซ่ลี้ และคณะ. 2555; Brahmachari. 2008) อนุมูลอิสระเกิดจากกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย รวมถึงการได้รับจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเสื่อมหรือผิดปกติของร่างกาย เกิดความเจ็บป่วยและโรคต่าง ๆ ส่งผลให้เนื้อเยื่อถูกทำลาย โดยมีผลต่อสารชีวโมเลกุลที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ ซึ่งร่างกายมีกลไกการป้องกันอนุมูลอิสระ ซึ่งอาศัยการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นในร่างกาย เช่น เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ ดีสมิวเทส (superoxide dismutase) คะตะเลส (catalase) กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (gluthaionperoxidase) เป็นต้น ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ จะต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น เช่น พฤกษเคมีต่าง ๆ (phytochemical) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก (phenolics) โดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenol) เช่น แซนโทน (xanthone) และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น (นพวัฒน์ เพ็งคำศรี และคณะ. 2554; เจนจิรา จิรัมย์ และ ประสงค์ สีหานาม. 2554) จึงได้รับความสนใจในการป้องกันรักษาโรค ด้วยศักยภาพจากพืชสมุนไพรที่ช่วยลดอนุมูลอิสระมากขึ้น (Pourmorad *et al.* 2006) นอกจากคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระแล้ว สารประกอบฟีนอลิกยังมีคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ เนื่องจากสารประกอบ ฟีนอลิกซึ่งเป็นผลพลอยได้จากเมทาบอลิซึมของเซลล์พืช ซึ่งสร้างโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อต้านทานโรค (พงศธร ล้อสุวรรณ และคณะ. 2551) สมุนไพรหรือสารที่แยกได้จากสมุนไพรหลายชนิด มีผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยอาจเพิ่ม cell mediated immune response หรือเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการจับกินและย่อยทำลายสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) (พิศมัย เหล่าภัทรเกษม. 2548) พืชสมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิทยาศาสตร์ว่ามีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) ของคน สัตว์ต่าง ๆ รวมทั้งปลาได้ ปลาสวยงามเป็นปลาที่นำมาเลี้ยงเป็นงานอดิเรก ทำให้มีผู้สนใจนำไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบอาชีพหลัก หรือเป็นอาชีพเสริมที่สามารถทำรายได้ให้กับผู้ประกอบการ (จงกล พรมยะ และคณะ. 2553) ซึ่งธุรกิจปลาสวยงามมีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการเพาะเลี้ยงปลาเชิงการค้านั้น ปัญหาสุขภาพของปลาและการเกิดโรคระบาดนับเป็นอุปสรรคที่สำคัญอย่างหนึ่งในกระบวนการผลิตปลาสวยงามที่มีคุณภาพ ส่งผลให้มีการใช้ยาและสารเคมีในการป้องกันและรักษาโรค การใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีอย่างต่อเนื่องจะก่อให้เกิดผลข้างเคียงแก่ปลาและเกษตรกรผู้ประกอบการ ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของพืชสมุนไพรสามารถใช้การป้องกันโรคได้ ส่งผลให้ปลามีความสามารถต้านทานต่อโรคสูงขึ้น โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระซึ่งช่วยส่งเสริมสุขภาพของปลาได้ (นันทชัย บุญจร. 2546; พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และ ปาริชาติ พุ่มขจร. 2553)

ดังนั้นการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงการเสริมสาหร่ายฉัตรในอาหาร ต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยาและประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของปลาแฟนซีคาร์พ เพื่อใช้สาหร่ายฉัตรเป็นวัตถุดิบจากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เป็นทางเลือกหนึ่งในการทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมี ช่วยลดปริมาณสารตกค้างในตัวสัตว์น้ำ และสิ่งแวดล้อม ส่งผลดีต่อสุขภาพของสัตว์น้ำ นอกจากนี้ยังเป็นแนวทางในการพัฒนาคุณภาพปลาสวยงามของไทยให้มีความยั่งยืนและเป็นที่ต้องการของตลาดส่งออกเพิ่มมากขึ้น

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์รวม และความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายฉัตร

1.2.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสาหร่ายฉัตรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของการเสริมสาหร่ายฉัตรในอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของปลาแฟนซีคาร์พ

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัด

1.3.2 ทราบความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่ายฉัตรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในสัตว์น้ำ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการป้องกันโรค ลดปัญหาการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.3 ทราบปริมาณที่เหมาะสมของสาหร่ายฉัตรในอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของปลาแฟนซีคาร์พ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการส่งเสริมสุขภาพ และการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พรรณไม้น้ำในสกุล *Limnophila*

พรรณไม้น้ำสกุล *Limnophila* เป็นกลุ่มของพืชที่อยู่ในน้ำหรือตามที่แฉะ ส่วนใหญ่มักมีกลิ่นหอม ลำต้นกลมเรียบหรือมีขนละเอียด ใบแตกออกจากลำต้นแบบตรงข้าม หรือแบบแตกรอบข้อเป็นวง ขอบใบเป็นฟันเลื่อย หรือหยักลึก พวกที่เป็นพืชใต้น้ำใบอาจมีหลายแบบ (polymorphic leaves) คือ ใบใต้น้ำแตกเป็นริ้วเล็ก ๆ ส่วนใบเหนือน้ำแผ่นใบขนาดเล็ก ดอกออกตามซอกใบ แบบดอกเดี่ยว หรือช่อดอก ผลเป็นแบบแคปซูลที่แตกแบบกลางพู หรือแตกตามตะเข็บ (สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530) พรรณไม้น้ำสกุล *Limnophila* ได้แก่

2.1.1 สาหร่ายฉัตร (*Limnophila heterophylla* Benth.)

สาหร่ายฉัตรมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Limnophila heterophylla* (Roxb) Benth. ชื่อสามัญ Ambulia อยู่ในวงศ์ Scrophulariocaceae เป็นพืชที่อยู่ในน้ำหรือใกล้น้ำ สามารถอยู่ได้ทั้งในน้ำและบนบก มีลำต้นอยู่ใต้น้ำหรือโผล่ขึ้นเหนือน้ำ พบได้ตามแหล่งธรรมชาติ เช่น แม่น้ำ ทะเลสาบหรือบ่อน้ำที่เป็นดินชื้นแฉะ ลำต้นยาวกลมเรียว มีความยาวของใบ 30 มิลลิเมตร คล้ายขนนก ใบแตกจากลำต้นรอบข้อแบบหมุนเป็นเกลียว ปลายใบแตกฝอย ใบเหนือน้ำเป็นรูปยาวรีปลายแหลม ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย ลักษณะของดอกเป็นดอกเดี่ยวสมบูรณ์เพศ มีสีขาว ชมพู ม่วงหรือฟ้า มีกลีบดอก 5 กลีบ ออกดอกตามซอกใบเหนือน้ำ โคนกลีบดอกติดกันเป็นกรวย ปลายแยกออกเป็น 2 ส่วน ผลเดี่ยวขนาดเล็กภายในมีเมล็ดมากถึง 150 เมล็ด การขยายพันธุ์ของสาหร่ายฉัตรโดยการปักชำลำต้นหรือโดยการเพาะเมล็ด (ภาพที่ 2.1A) (Brahmachari. 2008) สารสำคัญทางพฤกษเคมีของสาหร่ายฉัตร ดังตารางที่ 2.1

2.1.2 ผักแขยง (*Limnophila aromatica*)

ผักแขยงมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Limnophila aromatica* (Lamk) Merr. อยู่ในวงศ์ Scrophulariocaceae เป็นพืชล้มลุก สูง 10-30 เซนติเมตร ลำต้นเรียวยาว ตั้งตรง อวบน้ำ มีขนหนาแน่น ทั้งต้นมีกลิ่นหอมฉุน ใบเดี่ยว เรียงตรงข้ามทุกข้อ รูปแบบขนานแกมใบหอก ไม่มีก้านใบ ใบยาว 1-3 เซนติเมตร กว้าง 3-10 มิลลิเมตร ปลายใบแหลม ดอกออกเป็นช่อเดี่ยวที่มุมโคนกิ่งหรือซอกใบ (ภาพที่ 2.1B) การขยายพันธุ์โดยการตัดลำต้นปักชำในแปลงดิน หรือปลูกในนาข้าวเพื่อเป็นการค้า เนื่องจากนิยมรับประทานทั้งในรูปผักสดและนำมาประกอบอาหาร สรรพคุณทางยา ได้แก่ สามารถฆ่าเชื้อโรค เป็นยาระบาย ขับน้ำนม ช่วยเจริญอาหาร ยาขับลมในท้อง ช่วยขับพยาธิ ลดอาการอักเสบ ขับปัสสาวะ และแก้ไข้ เป็นต้น (สุกัญญา แซ่ลี้ และคณะ. 2555; Brahmachari. 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผักแขยงมีองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ ได้แก่ Nevadensin, 7*O*-glycoside และ 8-hydroxyflavone (Nanasombat and Teckchuen. 2009)

2.1.3 ผักกระโฉม (*Limnophila rugosa*)

ผักกระโฉมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Limnophila rugosa* (Roth) Merr. อยู่ในวงศ์ Scrophularioaceae เป็นพืชล้มลุกขึ้นอยู่ตามคันนาและที่ชื้นแฉะ ต้นอ่อนมีขนปกคลุม เมื่อต้นแก่ขนจะร่วงโรย ใบเดี่ยวออกตรงกันข้าม ใบรียาว ปลายใบมนหลังใบมีรอยย่นมีขนปกคลุม ท้องใบมีต่อมเล็ก ๆ จำนวนมาก ก้านใบสั้น ดอกเล็กไม่มีก้านดอก กลีบดอกติดกันเป็นท่อกลม ตรงปลายแยกเป็น 2 แฉก คล้ายรูปปากแตร กลีบดอกสีน้ำเงินอมม่วง (ภาพที่ 2.1C) นิยมรับประทานเป็นผักสด ใบสามารถทำเป็นหัวน้ำหอม ยอดอ่อนและใบสามารถรับประทานสดได้ สรรพคุณทางยา ได้แก่ แก้ไข้ แก้อาการท้องร่วง อาการแน่นท้อง ขับลมในท้อง ส่วนของน้ำมันหอมระเหยสามารถใช้แต่งกลิ่นอาหาร และเป็นน้ำมันใส่ผม น้ำมันหอมระเหยสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย และป้องกันเชื้อรา เป็นต้น (Acharya *et al.* 2013; Brahmachari. 2008) สารสำคัญทางพฤกษเคมีของผักกระโฉม ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบฟลาโวนอยด์และเทอร์ปีนอยด์ของสาหร่ายฉัตรฉัตร

องค์ประกอบ	สารสำคัญทางพฤกษเคมี
ฟลาโวนอยด์	- 5-Hydroxy-7,8',2',4'-tetramethoxyflavone
	- 5,7-Dihydroxy-6,8, 4'-trimethoxyflavone (Nevadensin)
	- 5,2'-Dihydroxy-7,8, 4'-trimethoxyflavone
	- 5,7-Dihydroxy-6,8,3',4'-tetramethoxyflavone (Hymenoxin)
	- 3∞-Hydroxyolean-12-ene-29-oic acid (Katonic acid)
เทอร์ปีนอยด์	- Methyl-olean-12-ene-3∞-benzoyloxy-29-carboxylate
	- 3∞-Hydroxyolean-12-ene-29-oic acid (Katonic acid)
	- Ursolic acid
	- (+)-Limonene
	- ∞-Pinene
	- *p*-Cymene
	- ∞-Eudesmol

ที่มา : Brahmachari (2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบฟลาโวนอยด์และเทอร์ปีนอยด์ของผักกระโฉม

องค์ประกอบ	สารสำคัญทางพฤกษเคมี
ฟลาโวนอยด์	- 5-Hydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone (Salvigenin)
	- 5- Hydroxy-7,2',4'-trimethoxyflavone
	- 5- Hydroxy-7,8,2', 4'-tetramethoxyflavone
	- 5,7-Dihydroxy-6,8,4'-trimethoxyflavone (Nevadensin)
	- 5,7-Dihydroxy-8,3',5'-trimethoxyflavone
	- 5,7,4'-Trihydroxy-6,8-dimethoxyflavone (Demethoxysudachitin)
	- 5,2',4'-Trihydroxy-7-methoxyflavone (Artocarpetin)
เทอร์ปีนอยด์	- 1β-Hydroxy-3keto-olean-12-en-28-oic acid
	- Ursolic acid
	- Betulin
	- Betulinic acid
	- Linalool
	- Humulene
	- Carphyllene
	- ∞-Bulnesene

ที่มา: Brahmachari (2008)

ภาพที่ 2.1 พรรณไม้น้ำสกุล *Limnophila* (A) *L. heterophylla*, (B), *L.aromatica* และ (C) *L. rugosa*

ที่มา: http://www.acquariomania.net/piante-fornitori-vari-c-354_670.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

Suksamram *et al.* (2003) ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากพืช *L. geoffrayi* สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม โดยการแยกสารประกอบ 2 ชนิด ได้แก่ flavones nevadensin และ isothymusin พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) มีค่า IC_{50} (Inhibition concentratation) เท่ากับ 7.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานสารประกอบ 2,6-di-(tert-butyl)-4-methylphenol (BHT มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

Sribusarakum *et al.* (2004) ศึกษาความสามารถการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอล น้ำมันหอมระเหย รวมทั้งสารตัวอย่างที่สัมพันธ์กับองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยของผักแขยง ด้วยวิธี DPPH และ nitric oxide (NO) radical scavenging พบว่า สารสกัดผักแขยงด้วยเมทานอล มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าน้ำมันหอมระเหย มีค่า IC_{50} เท่ากับ 133 และ 7,800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับสารตัวอย่างยูจีนอลสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการทดสอบด้วยวิธี NO พบว่า สารสกัดผักแขยงด้วยเมทานอล มีความสามารถในการต้าน NO มีค่า IC_{50} เท่ากับ 457.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยและสารตัวอย่างยูจีนอลไม่มีฤทธิ์ในการต้าน NO

Kukongviriyapan *et al.* (2007) ศึกษาความสามารถการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดผักแขยง ด้วยวิธี DPPH และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสารสกัดผักแขยง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.78±0.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี (1.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก พบว่าสารสกัดจากผักแขยงมีความสามารถในการรีดิวซ์ เท่ากับ 188±7 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัด

Nanasombat and Teckchuen (2009) ศึกษาความสามารถการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผักแขยง ด้วยเมทานอล เพื่อทดสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดจากผักแขยง สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดเมื่อเทียบกับ ∞-tocopherol (322.4±0.6 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัม DPPH) มีค่า EC_{50} เท่ากับ 550.5±12.2 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัม DPPH

2.2.1 คุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และจุลินทรีย์

2.2.1.1 ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

สุภาพร พงษ์มณี และ กัญณาญาภัค สนามพล (2550) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำคั้นสด สารสกัดด้วยไอน้ำ และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ จากพืชสมุนไพร 24 ชนิด ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร 2 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Salmonella typhimurium โดยวิธี paper disc agar diffusion พบว่า สารสกัดด้วยไอน้ำของผักแขยงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้มากกว่าพืชทั้งหมดมีขนาดของโซนใส เท่ากับ 9.5 มิลลิเมตร ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และน้ำคั้นสดจากผักแขยงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. typhimurium* มีขนาดของโซนใส 8.0 มิลลิเมตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

กานดา ล้อแก้วมณี และคณะ (2552) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชพื้นบ้าน 2 ชนิด สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) ที่แยกได้จากมูลสุกร ด้วยวิธี paper disc agar diffusion โดยความเข้มข้นของตัวทำละลาย 60, 70, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สารสกัดผักแขยงทุกระดับความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้ในเวลา 24 ชั่วโมง

ภาวนา พนมเขต และคณะ (2554) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืช 6 ชนิด ในการทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* 4 สายพันธุ์ ด้วยวิธี disc diffusion assay และ broth dilution method โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล เอทิลอะซิเตท และน้ำในการสกัด จากการทดสอบทั้ง 2 วิธี พบว่า สารสกัดจากผักแขยงไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. pseudomallei*

Nanasombat and Teckchuen (2009) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากผักแขยงในการทดสอบเชื้อ 20 ชนิด ด้วยวิธี disk diffusion test พบว่าสารสกัดจากผักแขยงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* (21.0±5.2 มิลลิเมตร), *Listeria monocytogenes* (12.2±3.4 มิลลิเมตร), *Pseudomonas fluorescens* (9.7±4.2 มิลลิเมตร), *Salmonella typhimurium* (8.7±0.6 มิลลิเมตร), *Staphylococcus aureus* (12.5±2.5 มิลลิเมตร) และ *Yersinia enterocolitica* (11.2±3.9 มิลลิเมตร) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากพืชที่ใช้ทดสอบ (Minimum inhibitory concentration; MIC) พบว่า สารสกัดจากผักแขยงให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* และ *S. aureus* มีค่า MIC เท่ากับ 2.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Brahmachari *et al.* (2011) ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจาก bioflavonoids 2 ชนิด ที่สกัดได้จากสาหร่ายฉัตรและนางดอกหวาน ได้แก่ 5,7-dihydroxy-4',6,8-trimethoxyflavone และ 5,6-dihydroxy-4',7,8-trimethoxyflavone เพื่อประเมินการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ซึ่งสารประกอบที่ 1 และ 2 ออกฤทธิ์ในการต้านในระดับปานกลาง แต่ครอบคลุมได้ในวงกว้าง ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก แกรมลบ และเชื้อรา ซึ่งสารประกอบที่ 1 พบว่า มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* มีค่า MIC เท่ากับ 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารประกอบที่ 2 พบว่ามีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1.2 ฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา

ธิติพร โคตรชา และคณะ (2554) ศึกษาประสิทธิภาพจากสารสกัดจากผักแขยงด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล อะซิโตน และเฮกเซน ที่ระดับความเข้มข้น 10,000, 20,000, 30,000, 40,000 และ 50,000 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* โดยวิธี poisoned food technique เก็บข้อมูลโดยตรวจวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา จากนั้นนำค่ามาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา พบว่า สาสกัดผักแขยงสกัดด้วยด้วยเฮกเซน สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด เท่ากับ 86.91 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความสามารถการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และตัวทำละลายต่างกันที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 50,000 ส่วนในล้านส่วน สารสกัดจากผักแขยงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้เนื่องจากคุณสมบัติในการละลายน้ำ ในตัวทำละลายที่แตกต่างกันของสารสกัดจากพืช มีผลการออกฤทธิ์ยับยั้งหรือชะลอการเจริญของเชื้อรา และขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมี

Brahmachari *et al.* (2011) ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria solani* และ *Candida albicans* จากสารประกอบ bioflavonoids ที่แยกได้จากสาหร่ายฉัตรและนางดอกหวาน ได้แก่ 5,7-dihydroxy-4',6,8-trimethoxyflavone และ 5,6-dihydroxy-4',7,8-trimethoxyflavone พบว่า สารประกอบทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. solani* และ *C. albicans* ได้

2.3 อนุมูลอิสระ (free radical)

อนุมูลอิสระ คือ สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) อยู่รอบนอก เนื่องจากขาดอิเล็กตรอนไป 1 ตัว สามารถพบได้ทั้งในสิ่งแวดล้อม สิ่งมีชีวิต และในเซลล์ โดยเฉพาะในกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือจากกระบวนการเมทาบอลิซึม (metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุล จึงเกิดเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาเคมี และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไป เพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุล หรือมีความเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องในลักษณะปฏิกิริยาลูกโซ่ สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ที่อยู่รอบข้างในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่าง ๆ ร่างกาย เช่น การทำลายโครงสร้างของ DNA โปรตีน และไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ (ดังสมการ 1 และ 2) (เจนจิรา จิรัมย์ และ ประสงค์ สีหานาม. 2554; บุหรัน พันธุ์สวรรค์. 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$R^{\cdot} + O_2 \longrightarrow ROO^{\cdot}$ (สมการ 1)

$ROO^{\cdot} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\cdot}$ (สมการ 2)

วรพล เองวานิช (2550) รายงานว่าอนุมูลอิสระส่วนใหญ่จะไม่เสถียรและมีความสามารถในการทำปฏิกิริยาสูงมาก และสารประกอบทุกชนิดสามารถถูกกระทำโดยอนุมูลอิสระเหล่านี้ ดังนั้นอนุมูลอิสระจากออกซิเจนจึงสามารถทำปฏิกิริยากับชั้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ (lipid membrane) โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนของพันธะคู่ของไขมัน ทำให้เกิดไฮเปอร์ออกไซด์และอัลดีไฮด์ นอกจากนี้ในส่วนที่เป็นโปรตีนโดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนที่ประกอบด้วยกลุ่มซัลไฮดิล (sulfhydryl groups) มีผลทำให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่อช่องที่สารผ่านเข้าออก (channel) ต่าง ๆ ส่งผลให้กลไกการควบคุมไอออนภายในเซลล์เสียไป

2.3.1 แหล่งของสารอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระเกิดขึ้นในร่างกายจากการขนถ่ายอิเล็กตรอนในกระบวนการเผาผลาญอาหารให้เกิดเป็นพลังงานโดยใช้ออกซิเจน อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะถูกจับโดยออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลของออกซิเจนที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเรียกว่า reactive oxygen species (ROS) เช่น อนุมูลอิสระของ hydroxyl, superoxide และ peroxyl อนุมูลอิสระชนิดอื่นที่เกิดขึ้นในร่างกาย เช่น reactive nitrogen species ตัวอย่างเช่น nitric oxide, nitrogen dioxide นอกจากการเผาผลาญอาหารที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระแล้ว แหล่งอื่นในร่างกายที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ได้แก่ ปฏิกิริยาทางเอนไซม์ เช่น xanthine oxidase, prostaglandin synthase, lipoxygenase, aldehyde oxidase ปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) สภาวะทางอารมณ์ เช่น ความเครียด พยาธิสภาพของร่างกาย ได้แก่ การมีไข้ การติดเชื้อ เป็นต้น แหล่งอนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกาย ได้แก่ รังสี ควัน และมลภาวะต่าง ๆ (วัลลภ วีชะรังสรรค์ และ ประณีต โอปณะโสภิต. 2547) อนุมูลอิสระในกลุ่ม ROS ซึ่งมีทั้งประโยชน์และโทษ ในส่วนที่เป็นประโยชน์ คือ อนุมูลอิสระที่เซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น macrophage และ neutrophil สร้างขึ้นเพื่อทำลายแบคทีเรียที่บุกรุกเข้าไปในร่างกาย เช่น nitric oxide, hydroxyl free radical และ superoxide anion แต่อนุมูลอิสระเหล่านี้ยังทำลายอย่างอื่นรวมทั้งเซลล์ที่แข็งแรงด้วย (พรรณี เดชกำแหง. 2547)

2.3.2 ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ

บังอร วงศ์รักษ์ และ ศศิลักษณ์ ปียะสุวรรณ์ (2549) รายงานว่าปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระจัดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (free radical chain reaction) มีกลไกปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน คือ

2.3.2.1 Initiation step

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ มักเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสลายพันธะด้วยน้ำ (hydrolysis) แสง (photolysis) รังสี (radiolysis) หรือปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox reaction) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์อื่น ๆ ที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในเซลล์ รวมถึงโมเลกุลที่มีความไวสูงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำปฏิกิริยา เช่น nitric oxide (NO) และ singlet oxygen (O_2) คือ ออกซิเจนในสถานะที่ถูกกระตุ้น (excited state) สิ่งเหล่านี้ล้วนทำให้เกิดขั้นตอนอินนิทิเอชันของปฏิกิริยาการเกิดอนุมูล (สมการที่1)

$$RH \longrightarrow R^{\cdot} \qquad \text{(สมการ 1)}$$

2.3.2.2 Propagation step

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในขั้นตอนอินนิทิเอชันจะดำเนินปฏิกิริยาต่อไปในขั้นตอนพรอพาเกชัน โดยเกิดปฏิกิริยาขึ้น 2 ทาง คือ การดึงเอาอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลข้างเคียง หรือโดยทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจนที่อยู่ในสถานะ ground state ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ (สมการที่ 2-4)

$$RH + R'^{\cdot} \rightleftharpoons R^{\cdot} + R'H \qquad \text{(สมการ 2)}$$

$$R^{\cdot} + {}^3O_2 \rightleftharpoons ROO^{\cdot} \qquad \text{(สมการ 3)}$$

$$ROO^{\cdot} \rightleftharpoons ROOH + R^{\cdot} \qquad \text{(สมการ 4)}$$

2.3.2.3 Termination step

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น 2 อนุมูลรวมกันได้เป็นสารที่มีความเสถียร จึงเป็นการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ (สมการที่ 5 และ 6)

$$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightleftharpoons ROOR + O_2 \qquad \text{(สมการ 5)}$$

$$ROO^{\cdot} + R^{\cdot} \rightleftharpoons ROOR \qquad \text{(สมการ 6)}$$

2.3.3 การป้องกันอันตรายและความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

เสถียร อำพันโรจนานันท์ (2551) รายงานว่าร่างกายจะเป็นอันตรายและได้รับความเสียหาย หากมีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินสมดุล ดังนั้นร่างกายจึงมีกลไกเพื่อควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระ 3 กลไก ได้แก่ เอนไซม์ สารต้านอนุมูลอิสระ และสาร metal chelator ในสภาวะปกติกลไกเหล่านี้สามารถรักษาระดับอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุลได้ แต่หากเกิดในภาวะผิดปกติที่ทำให้กลไกเหล่านี้ไม่สามารถควบคุมสมดุลอนุมูลอิสระได้ จะนำไปสู่ภาวะที่อนุมูลอิสระเกินสมดุลและโรคต่าง ๆ ขึ้นกับร่างกาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3.1 เอนไซม์

เอนไซม์นับเป็นกลไกสำคัญขั้นแรกที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล เอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase, SOD) เอนไซม์กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathioneperoxidase, GPX) และเอนไซม์คะตะเลส (Catalase, CAT) ที่อยู่ภายในเซลล์จะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นอนุมูลเริ่มต้นและอนุมูลเปอร์ออกไซด์ ก่อนที่อนุมูลทั้งสองจะทำปฏิกิริยาต่อโดยมีโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดอนุมูลหรือสารที่มีฤทธิ์รุนแรงมากขึ้นกว่าเดิม

2.3.3.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดกระบวนการออกซิเดชัน ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระ หรือกล่าวได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระเป็นการช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้มีผลทำลายเซลล์ โดยทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระขับไล่อนุมูลอิสระ จับกับตัวโลหะที่ส่งเสริมให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือลดการก่อตัวของ singlet oxygen ซึ่งเป็นออกซิเจนที่อยู่ในรูปที่พร้อมจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารต้านอนุมูลอิสระจะยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระโดยทำให้อนุมูลอิสระคงตัว และเป็นการหยุดการก่อตัวใหม่ของอนุมูลอิสระ ส่งผลให้หยุดวงจรการเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ (วิไลพร ปองเพียร. 2551) สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นสารธรรมชาติซึ่งได้แก่ amino acid, ascorbic acid, carotenoids, flavonoids, melanoidin, other organic acid, reduction, peptides, tannins และ tocopherols และสารสังเคราะห์ ได้แก่ tert-butyl-4-hydroxyanisol (BHA), tert-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) และ tert-butylhydroquinone (TBHQ) (อัญชนา เจนวิถีสุข. 2544 ; Matthaus. 2002)

2.3.3.3 สารคีเลทโลหะ (metal chelator)

สารคีเลทโลหะเป็นกลไกหนึ่งที่ทำหน้าที่ควบคุมอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล เพราะโลหะทรานซิชัน เช่น ธาตุเหล็กและทองแดง มีส่วนสำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระ สารที่ทำหน้าที่คีเลทโลหะในร่างกายส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่จับและแยกโลหะเข้ามารวมไว้ในโครงสร้างให้อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนโลหะ จึงไม่สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระได้ โปรตีนที่จับกับโลหะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะ ได้แก่ ทรานเฟอร์ริน (transferrin) เฟอร์ริติน (ferritin) และแลกโตเฟอร์ริน (lactoferrin) เป็นต้น

2.3.4 วิธีการวัดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนเดี่ยว (based on single electron transfer (SET) reaction) นฤมล น้อยหวอย (2551) รายงานว่า

วิธีนี้จะวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอน จะมีการแลกเปลี่ยนสีเมื่อเกิดการแลกเปลี่ยนอเล็กตรอน โดยการเปลี่ยนสีจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชัน วิธีการได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4.1 Total phenol assay

วิธีนี้เป็นการวัดการทำปฏิกิริยาของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับสารโฟลิน-ซีโอเคาทู (Folin-Ciocalteu Reagent) ฟีนอลิกจะแตกตัวให้โปรตอนกับสารโฟลิน-ซีโอเคาทู ซึ่งในสารโฟลิน-ซีโอเคาทู จะมีโมลิบดินัมเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากโมลิบดินัมเป็นสารที่ง่ายต่อการรับอิเล็กตรอน

2.3.4.2 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging

วิธีนี้จะวัดความสามารถในการยับยั้ง DPPH ซึ่งเป็นสารอนุมูลไนโตรเจนที่ค่อนข้างคงตัว โดยขณะเริ่มต้นการทดลองจะให้สารสีเข้ม เมื่อเกิดปฏิกิริยามากขึ้นสารจะมีสีซีดจางลง หากมีปริมาณสารต้านออกซิเดชันมาก สีของสารละลายก็จะลดลงเร็ว โดยแสดงค่าเป็นร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% radical scavenging activity) หรือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ ร้อยละ 50 จากปริมาณอนุมูลอิสระเริ่มต้น (IC_{50})

2.3.4.3 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay หรือ ABTS assay

วิธีนี้เป็นวิธีการวัดความเข้มข้นของ Trolox ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน ต่อ 0.1 มิลลิโมลาร์ของสารตั้งต้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS radical cation, $ABTS^{\cdot+}$) หลักการของวิธีนี้ คือ วัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการยับยั้งอนุมูลเปอร์ออกซิลของ ABTS วัดได้จากการลดลงของสีในสารละลาย

2.4 การใช้พืชสมุนไพรต่อภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ

ปัจจุบันการป้องกันรักษาโรคสัตว์น้ำมักใช้สารเคมีสังเคราะห์ และยาปฏิชีวนะ ถึงแม้ว่าการใช้วิธีการดังกล่าวอาจได้ผลดีแก่การรักษาโรค แต่ก็ยังมีข้อด้อยอยู่ กล่าวคือ สารเคมีสังเคราะห์ และยาปฏิชีวนะสามารถตกค้างอยู่ในตัวสัตว์น้ำ ถ้าใช้ในปริมาณที่มากเกินไป หรือใช้เป็นเวลานาน อาจส่งผลต่อการดื้อยาของเชื้อโรค ซึ่งความสามารถในการดื้อยาสามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่อยู่ในธรรมชาติได้ ดังนั้นจึงทำให้มีการหาพืชสมุนไพรที่สามารถนำมาใช้แทนสารเคมีและยาปฏิชีวนะในการป้องกันโรคสัตว์น้ำ สิ่งที่ได้รับความสนใจ คือ พืชสมุนไพร เนื่องจากพืชสมุนไพรสามารถหาได้จากธรรมชาติ หรือปลูกเองได้ สมุนไพรส่วนใหญ่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยจากการใช้รักษาโรคในคน หรือสัตว์ต่าง ๆ มาเป็นเวลานาน ประโยชน์จากพืชสมุนไพรต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้แก่ ลดความเครียดในสัตว์น้ำ รักษาโรค ช่วยเสริมภูมิคุ้มกัน ต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น (พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และ ปาริชาติ พุ่มขจร. 2553; ชนกันต์ จิตมนัส. 2556)

2.4.1 การสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพร

เสถียร อำพันโรจนานันท์ (2551) รายงานว่าสมุนไพรสร้างสารพฤกษเคมี (phytochemical) บางชนิดขึ้นมาในปริมาณไม่มาก ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากกระบวนการทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีวสังเคราะห์ ซึ่งส่วนใหญ่มีประโยชน์ต่อมนุษย์จึงเรียกว่า สารออกฤทธิ์ นำมาใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรคต่าง ๆ ตามแต่จะออกฤทธิ์ตามส่วนใดของร่างกาย ถ้าหากใช้เกินขนาดมักมีพิษและเกิดอันตราย สารออกฤทธิ์ต่าง ๆ เหล่านี้ พืชมักเก็บไว้ในช่องว่างในเซลล์ (vacuole) เมื่อพืชตายจึงปล่อยสารออกมาหรือต้องนำพืชไปสกัดสารออกมา วิธีการสกัดอาจมีผลอย่างมากต่อคุณภาพของสารสกัด ในขณะเดียวกันตัวทำละลายที่ใช้สกัดก็มีผลอย่างชัดเจนกับองค์ประกอบของสารสกัดในเชิงปริมาณ

2.4.2 สารสำคัญจากพืชสมุนไพร

สมุนไพรหรือสารที่แยกจากสมุนไพรหลายชนิดมีผลกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยอาจมีการเพิ่ม humoral หรือ cell mediated immune response หรือเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการจับกินและย่อยทำลายสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) เช่น ไกลเซอไรซิน (glycyrrhizin) สารลิคอริติน (liquiritin) รวมทั้งสารออกฤทธิ์อื่น ๆ เช่น โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) อัลคาลอยด์ (alkaloids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แอนทราควิโนน (anthraquinone) น้ำมันหอมระเหย (essential oil) ซาโปนิน (saponins) เป็นต้น สาระสำคัญเหล่านี้มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนู ไก่ และเซลล์ของคน สารที่สกัดจากพืชจะกระตุ้นการทำงานแบบไม่จำเพาะ และอาจยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ (พิศมัย เหล่าภัทรเกษม. 2548; ชนกันต์ จิตมนัส. 2556)

2.5 ผลของพืชสมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรคสัตว์น้ำ

กิตติมา วานิชกูล และคณะ (2550) ศึกษาการใช้สารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยให้กุ้งกินอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน 4 สูตร ได้แก่ 0, 12.5, 25 และ 50 ส่วนในล้านส่วน (ppm) การประเมินความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* องค์ประกอบทางภูมิคุ้มกัน และประเมินจำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้ง ผลการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เมื่อกุ้งได้รับการฉีดเชื้อ พบว่า อัตราการตายของกุ้งในอาหารชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์สูงสุด รองลงมา คือ กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน 50 ส่วนในล้านส่วน มีค่าเท่ากับ 46.66±23.09 และ 33.33±30.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัด 12.5 และ 25 ส่วนในล้านส่วน มีอัตราการตาย 0.00±0.00 เปอร์เซ็นต์ องค์ประกอบทางภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูงสุดในกุ้งเมื่อได้รับอาหารผสมสารสกัด 25 และ 50 ส่วนในล้านส่วน การจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด และกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียในซีรั่มของกุ้งที่ได้รับอาหารชุดควบคุมต่ำกว่ากุ้งที่ได้รับสารสกัดขมิ้นชัน และการประเมินจำนวนแบคทีเรียในลำไส้กุ้ง พบว่า เชื้อแบคทีเรียในลำไส้กุ้งที่ได้รับอาหารชุดควบคุมมีปริมาณสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชฎาธาร โทนเดียว และคณะ (2550) ศึกษาผลของใบยอและฟ้าทะลายโจรต่อการจับกินเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาวในปลาทอง ให้อาหารทดลอง 7 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 สูตรควบคุม (ไม่ผสมใบยอ ฟ้าทะลายโจรและแอสต้าแซนทิน) สูตรที่ 2 ผสมแอสต้าแซนทิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ สูตรที่ 3 ผสมแอสต้าแซนทิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ และเมทิลเซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ สูตรที่ 4 ผสมใบยอ 10 เปอร์เซ็นต์ สูตรที่ 5 ผสมฟ้าทะลายโจร 10 เปอร์เซ็นต์ สูตรที่ 6 ผสมใบยอ 10 เปอร์เซ็นต์ และแอสต้าแซนทิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ และสูตรที่ 7 ผสมฟ้าทะลายโจร 10 เปอร์เซ็นต์ และแอสต้าแซนทิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการทดลอง 4 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การจับกินเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาว และดัชนีการจับกินเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาว ซึ่งแสดงเป็นค่าประสิทธิภาพการทำงานของเม็ดเลือดขาว (phagocytosis index) ในปลาทองที่ได้รับอาหารสูตรที่ 6 ผสมใบยอ 10 เปอร์เซ็นต์ และแอสต้าแซนทิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ และสูตรที่ 7 ผสมฟ้าทะลายโจร 10 เปอร์เซ็นต์ และแอสต้าแซนทิน 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงกว่าปลาทองที่ได้รับอาหารสูตรอื่น ๆ เนื่องจากสารกลุ่ม xenonine ในใบยอ และ diterpene lactones ในฟ้าทะลายโจรสามารถเพิ่มการสร้างเม็ดเลือดขาว

จุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์ และ สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์ (2553) ศึกษาผลของสารสกัดฟ้าทะลายโจรในอาหารสำหรับเลี้ยงปลากะพง ต่อองค์ประกอบเลือด ระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคโดยผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรในอาหารที่ระดับ 0, 5 และ 10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ให้ปลากินอาหารเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ จากการทดลองผลของสารสกัดต่อองค์ประกอบของเลือดหลังจากเลี้ยงปลา 6 สัปดาห์ พบว่า จำนวนเม็ดเลือดแดงสูงสุดเมื่อปลาได้รับอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 5 กรัม จำนวนเม็ดเลือดขาว ค่าฮีมาโตคริตของปลาไม่มีความแตกต่างกันทุกชุดการทดลอง เปอร์เซ็นต์การจับกินสิ่งแปลกปลอมของปลาสูงสุดเมื่อได้รับอาหารผสมสารสกัด 5 กรัม ผลของสารสกัดฟ้าทะลายโจรต่อการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. เมื่อปลาได้รับเชื้อแบคทีเรีย พบว่า อัตราการตายของปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 5 กรัม มีเปอร์เซ็นต์อัตราการตายน้อยที่สุด

ภัทราภรณ์ สืบสำราญ และ ปวีณา ทวีกิจการ (2554) ศึกษาผลของสารสกัดพญาวานรต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา ระบบภูมิคุ้มกันและการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล โดยปลาจะได้รับอาหารต่างกัน 4 ชุดการทดลอง คือ อาหารผสมสารสกัดพญาวานรที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดของปลานิลเมื่อได้รับอาหารผสมสารสกัดพญาวานร 0.5 เปอร์เซ็นต์ ค่าโลหิตวิทยา ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และฮีโมโกลบินไม่มีความแตกต่างกันของทุกชุดการทดลอง การทดสอบการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด พบว่า ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดพญาวานร 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงสุด รองลงมา คือ ความเข้มข้นของสารสกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียในซีรั่มของปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัด 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรีย 131 และ 132 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อัตราการตายของปลาต่ำสุดเมื่อได้รับอาหารผสมสารสกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ อาหารผสมสารสกัด 0.1 และ 0.01เปอร์เซ็นต์

ณัฏฐา นิธิกุลวรวงศ์ (2555) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรสิรินธรวัลลีที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในลูกปลานิล โดยให้ปลากินอาหารผสมสารสกัด 4 ชุดการทดลอง ได้แก่ 0, 0.1, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ จากการศึกษาพบว่า น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลานิลไม่มีความแตกต่างกันทุกชุดการทดลอง แต่ปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มของอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม การทดสอบการต้านทานเชื้อแบคทีเรียของลูกปลานิล พบว่าเมื่อปลาได้รับเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* อัตราการตายของปลาต่ำสุดเมื่อปลาได้รับอาหารผสมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ ปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.5 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 33.33±3.33, 45.56±3.85 และ 47.78±5.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมมีอัตราการตาย เท่ากับ 77.44±8.39 เปอร์เซ็นต์

2.6 ปลาแฟนซีคาร์พ

ปลาแฟนซีคาร์พ (*Cyprinus carpio* Linn.) เป็นปลาในกลุ่มปลาตะเพียน มีชื่อเรียกแตกต่างกัน เช่น ปลาไนแฟนซี ปลาไนทรงเครื่อง และปลาไนสี ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในประเทศอิหร่าน ปลาชนิดนี้พบได้ทั่วโลก เพราะมีความอดทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี ประเทศไทยได้นำเข้าปลาชนิดนี้มาจากประเทศญี่ปุ่นและมีการเลี้ยงจนถึงในปัจจุบัน ลักษณะของปลาแฟนซีคาร์พจะมีรูปร่างค่อนข้างกลม ลำตัวเพรียวยาว มีครีบหลัง ครีบหาง ครีบท้อง ครีบหู ครีบอก มีเกล็ดที่แตกต่างกันไป ลักษณะความแตกต่างเพศของปลา คือ ปลาเพศเมียมีความกว้างของส่วนท้องช่องเพศของปลาใหญ่และนูน ส่วนปลาเพศผู้มีความกว้างของส่วนท้องน้อยกว่าเพศเมีย ช่องเพศมีลักษณะเรียวเล็ก เว้าเข้าสู่ด้านใน (อิทธิพร จันทร์เพ็ญ. 2531)

2.7 ประโยชน์ของพรรณไม้น้ำในอาหารสัตว์น้ำ

วุฒิพร พรหมขุนทอง และคณะ (2528) ศึกษาการใช้สาหร่ายหางกระรอก สาหร่ายพุงชะโด และผักตบชวาผสมในอาหารเพื่อใช้อนุบาลลูกปลาตะเพียนขาว เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของพืชน้ำที่เหมาะสมในอาหาร โดยผสมพืชน้ำ 3 ชนิด ๆ ละ 2 ความเข้มข้น คือ 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เวลา 8 สัปดาห์ พบว่า การเจริญเติบโตของปลาที่ได้รับอาหารผสมพืชน้ำทั้ง 3 ชนิด ในระดับที่ต่างกันไม่มีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง และอัตราการรอดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ จากผลการเจริญเติบโตของลูกปลาตะเพียนขาวที่ไม่แตกต่างกัน เนื่องจากว่าปริมาณพืชที่ผสมในอาหารมีปริมาณเยื่อใยค่อนข้างสูง ซึ่งปลาไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

Ruangdej and Laohavisuti (2011) ศึกษาการใช้สารสกัดจากพรรณไม้น้ำพรมมิในอาหารสำหรับกุ้งขาว ปลาดุก และปลากะพงขาว ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 กรัมของสารสกัดต่อกิโลกรัมอาหาร. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นเมื่อกุ้งขาวได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* และปลาได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* พบว่า กุ้งขาว ปลาดุก และปลากะพงสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ได้รับสูงกว่าสัตว์น้ำที่ได้รับอาหารชุดควบคุม

Moonsri (2007) ได้ศึกษาการพัฒนาโปรตีนทดแทนในอาหารสัตว์น้ำจากพรรณไม้น้ำ 2 ชนิด ได้แก่ สาหร่ายหางกระรอก และสาหร่ายพุงชะโดซึ่งนำมาเปรียบเทียบกับปลาป่น โดยศึกษาปริมาณธาตุอาหาร N:P ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณโปรตีนของพรรณไม้น้ำ โดยมีอัตราส่วนของ N:P 5 ระดับ ได้แก่ 0:0, 1:1, 2:1, 4:1 และ 8:1 เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า อัตราส่วนของธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อพรรณไม้น้ำทั้ง 2 ชนิด คือ 4:1 จากนั้นศึกษาคุณภาพของโปรตีนจากพรรณไม้น้ำทั้ง 2 ชนิด พบว่าสาหร่ายหางกระรอกมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 17.43 เป็น 25.78 เปอร์เซ็นต์ และสาหร่ายพุงชะโดมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 12.25 เป็น 20.51 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบของโปรตีนจากพรรณไม้น้ำกับปลาป่น พบว่า กรดอะมิโนจำเป็นและไม่จำเป็นของพรรณไม้น้ำน้อยกว่าที่พบในปลาป่น ปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพสูง แต่ก็สามารถประยุกต์ใช้เป็นโปรตีนทดแทนจากพืชในอาหารสัตว์น้ำได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

132474

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์และพืชทดลอง

3.1.1 ปลาแฟนซีคาร์พ (*Cyprinus carpio* Linn.) ที่มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยช่วง 16.66±0.08-16.69±0.01กรัม จำนวน 500 ตัว

3.1.2 พรรณไม้น้ำสาหร่ายฉัตร (*Limnophila heterophylla* Benth.) ความยาวของต้น 9-10 เซนติเมตร จำนวน 1,000 ต้น ซื้อจากตลาดจตุจักร เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร

3.2 อุปกรณ์ สารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อแบคทีเรีย

3.2.1 อุปกรณ์

3.2.1.1 เครื่องปั่นเหวี่ยง (refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ Hettich รุ่น Universal 16 R

3.2.1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (micro refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ Vision รุ่น VS -15000

3.2.1.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophometer) ยี่ห้อ Thermo scientific รุ่น Gensys 10 S

3.2.1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (blance) ยี่ห้อ Mettler toledo รุ่น PB 1502-S

3.2.1.5 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (blance) ยี่ห้อ Mettler toledo รุ่น AJ 100

3.2.1.6 หม้อนึ่งความดัน (autoclave) ยี่ห้อ Hirayama รุ่น HV-50

3.2.1.7 ตู้อบไอร้อน (hot air oven) รุ่น 1350 FX

3.2.1.8 อ่างน้ำร้อน (water bath) ยี่ห้อ Menmert รุ่น WB 14

3.2.1.9 เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) ยี่ห้อ Heidolph รุ่น Laborat 4003

3.2.1.10 เครื่องบดอาหาร ยี่ห้อ Philips

3.2.1.11 ตู้เย็น ยี่ห้อ Mitsubishi

3.2.1.12 กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Nikon compound

3.2.1.13 เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ กระบอกตวง แท่งแก้วคนสาร หลอดทดลอง เป็นต้น

3.2.1.14 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) ยี่ห้อ Astec รุ่น ABS 1200

3.2.1.15 ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อ (incubator) ยี่ห้อ Sanyo

3.2.1.16 เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer model) รุ่น CTL 107

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.17 เครื่องเขย่าสารควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator) รุ่น VS 8480SF

3.2.1.18 เครื่องนับจำนวน (counters)

3.2.1.19 เครื่องทำอาหาร

3.2.1.20 กระดาษกรอง Whatman

3.2.2 สารเคมี

3.2.2.1 เมทานอล (methanol)

3.2.2.2 เอทานอล (ethanol)

3.2.2.3 อะซีโตน (acetone)

3.2.2.4 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคลิวไฮดราซีล (2, 2-Diphenyl-l-Picrylhydrazyl; DPPH)

3.2.2.5 2,2'- อะซิโน-บิส (3-เอทิลเบนโซไทอะโซลิน-6-ซัลโฟนิก แอซิด) (2,2'-azinobis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]; ABTS)

3.2.2.6 อะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminum chloride)

3.2.2.7 โฟลิน-ซีโอเคาทู (Folin-Ciocalteu)

3.2.2.8 โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)

3.2.2.9 โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate)

3.2.2.10 โพแทสเซียม อะซิเตท (potassium acetate)

3.2.2.11 กรดไทโอบาร์บิวทูริก (thiobarbituric acid; TBA)

3.2.2.12 กรดไทคลอโรแอซิติก (trichloroacetic acid; TCA)

3.2.2.13 บิวทิลเลต ไฮดรอกซีโทลูอีน (butylated hydroxytoluene; BHT)

3.2.2.14 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO)

3.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

3.2.3.1 Tryptic Soy Broth (TSB)

3.2.3.2 Muller Hilton Agar (MHA)

3.2.4 เชื้อแบคทีเรีย

3.2.4.1 *Aeromonas hydrophila*

3.2.4.2 *Streptococcus agalactiae*

3.2.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.4.4 *Vibrio cholera*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์รวม และความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายฉัตร

3.3.1.1 จัดชุดการทดลองแบบ 2×3 factorial experiment in CRD ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 สภาพของสาหร่ายฉัตรใบสดและแห้ง ปัจจัยที่ 2 ตัวทำละลาย น้ำ เอทานอล 95 และ อะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์

3.3.1.2 นำสาหร่ายฉัตรจำนวน 900 ต้น โดยมีน้ำหนัก 827.26 กรัม ล้างด้วยน้ำให้สะอาด จากนั้นแยกออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรก ใช้เตรียมสำหรับการสกัดสาหร่ายฉัตรใบสด โดยการหั่นสาหร่ายฉัตรเป็นชิ้นเล็ก ๆ ส่วนที่ 2 การเตรียมสาหร่ายฉัตรใบแห้ง โดยนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง เมื่อแห้งแล้ว นำสาหร่ายฉัตรมาบดละเอียดเป็นผง

3.3.1.3 การเตรียมสารสกัดสาหร่ายฉัตร ใช้วิธีดัดแปลงจาก สุภาพร พงษ์มณี และกัญณาญาภัค สนามพล (2550) นำสาหร่ายฉัตรใบสดและแห้งในข้อ 3.3.1.2 สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดได้แก่ น้ำ เอทานอล 95 และ อะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนสาหร่ายฉัตร 5 กรัมต่อตัวทำละลาย 150 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง shaking incubator ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน จากนั้นนำสารสกัดมากรองด้วยผ้าขาวบางแล้วกรองซ้ำด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 เพื่อแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลาย นำไประเหยระบบสุญญากาศด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เก็บสารสกัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียมนำมาทดสอบ

3.3.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม โดยวิธี Folin-Ciocalteu (Iqbal and Bhanger. 2006) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม โดยวิธี Aluminum chloride (Pourmorad *et al.* 2006) ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH (Sreelatha and Padma. 2009) และอนุมูลอิสระ ABTS (Ksouri *et al.* 2009)

(1) ปริมาณฟีนอลิกรวม โดยวิธี Folin-Ciocalteu (Iqbal and Bhanger. 2006) ปิเปตตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายฉัตรจากข้อ 3.3.1.3 ใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocateu ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย Na_2CO_3 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวม 7 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณปริมาณฟีนอลิกรวม โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid) (ตารางภาคผนวก ก)

(2) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม โดยวิธี Aluminum chloride (Pourmorad *et al.* 2006) ปิเปตตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายฉัตรจากข้อ 3.3.1.3 ใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$AlCl_3$ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม 1M potassium acetate 0.1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์รวม โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเควอซิติน (quercetin) (ตารางภาคผนวกข)

(3) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-Diphenyl-l-Picrylhydrazyl Scavenging (DPPH) (Sreelatha and Padma. 2009) ปิเปตตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายฉัตรจากข้อ 3.3.1.3 ใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม 0.15 mM DPPH ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยแทนค่าในสมการพร้อมบันทึกผล

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = [(A_{\text{ควบคุม}} - A_{\text{ตัวอย่าง}} / A_{\text{ควบคุม}}) \times 100]$$

(4) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2'-azinobis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS) (Ksouri *et al.* 2009) ปิเปตตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายฉัตรจากข้อ 3.3.1.3 ใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมสารละลาย ABTS 950 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยแทนค่าในสมการพร้อมบันทึกผล

$$\text{ABTS scavenging effect (\%)} = [(A_{\text{ควบคุม}} - A_{\text{ตัวอย่าง}} / A_{\text{ควบคุม}}) \times 100]$$

3.3.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสาหร่ายฉัตรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ

3.3.2.1 จัดชุดการทดลองแบบ 2×4 factorial experiment in CRD ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 สภาพของสาหร่ายฉัตรใบสดและแห้ง ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของสารสกัด 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 ไมโครกรัม

3.3.2.2 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Vibrio cholerae* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์การประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง นำเชื้อมาบ่มใน slant agar เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่านำมาใช้งาน

3.3.2.3 นำสารสกัดสาหร่ายฉัตรจากข้อ 3.3.1.3 มาระเหยใน water bath ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายฉัตรแห้ง แล้วจึงละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) โดยมีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ได้แก่ 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 ไมโครกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดสาหร่ายฉัตร โดยวิธี disc diffusion ทำการเขี่ยเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ 1 ลูปใส่ในอาหารเหลวชนิด Tryptic Soy Broth (TSB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นล้างเชื้อด้วยสารละลาย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร โดยเทียบกับ Mcfarland's standard No. 0.5 จากนั้นใช้สำลีพันปลายไม้ที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อ swab ลงบน Muller Hilton Agar (MHA) นำ paper disc ที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารสกัดสาหร่ายฉัตร จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งแล้ววางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (inhibition zone) ที่เวลา 24 ชั่วโมง ส่วนยาปฏิชีวนะที่นำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพ คือ disc ยา chloramphenicol และ oxytetracycline ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม (วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล และ นนทวิชย์ อารีย์ชน. 2549)

3.3.3 การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของการเสริมสาหร่ายฉัตรในอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของปลาแฟนซีคาร์พ

3.3.3.1 จัดชุดการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) โดยแบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ ใช้ปลาจำนวน 20 ตัวต่อซ้ำ มีปริมาณสาหร่ายฉัตรในอาหารแตกต่างกัน คือ

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารควบคุมไม่ผสมสาหร่ายฉัตร
ชุดการทดลองที่ 2 อาหารผสมสาหร่ายฉัตรปริมาณ 3 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร
ชุดการทดลองที่ 3 อาหารผสมสาหร่ายฉัตรปริมาณ 6 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร
ชุดการทดลองที่ 4 อาหารผสมสาหร่ายฉัตรปริมาณ 9 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร
ชุดการทดลองที่ 5 อาหารผสมสาหร่ายฉัตรปริมาณ 12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

3.3.3.2 การเตรียมสาหร่ายฉัตรอบแห้ง ตามวิธีการในข้อ 3.3.1.2

3.3.3.3 การเตรียมอาหารผงสำเร็จรูปชื่อทางการค้าโปร-เกรด (Pro-grade) มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารสูตรควบคุม โดยผสมสาหร่ายฉัตรผงแห้งต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ 3, 6, 9 และ12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ในอาหารแล้วเติมน้ำ 60 เปอร์เซ็นต์ คลุกเคล้าอาหารให้ทั่ว จากนั้นนำอาหารไปอัดเม็ดแล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำอาหารใส่ถุงพลาสติกและเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.3.4 การเตรียมปลาทดลอง นำปลาแฟนซีคาร์พจำนวน 500 ตัวมาพักในบ่อซีเมนต์ขนาด 2×3×1 เมตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อปรับสภาพปลา ให้อาหารวันละ 2 มื้อ จากนั้นคัดเลือกปลาลงในถังพลาสติกที่เตรียมไว้ขนาด 60×60×40 เซนติเมตร ให้อาหารวันละ 3 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัวต่อวัน วันละ 2 มื้อ ช่วงเวลา 10.00 น. และ 16.00 น. ทำความสะอาดถังพลาสติกโดยการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก ๆ 3 วัน โดยปลามีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ยช่วง 16.66±0.08-16.69±0.01 กรัม

3.3.3.5 บันทึกการเจริญเติบโตของปลาแฟนซีคาร์พ โดยชั่งน้ำหนักของปลาทุก ๆ 2 สัปดาห์ จนสิ้นสุดการการทดลอง 14 สัปดาห์ เพื่อนำมาคำนวณน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการรอดตาย ดังนี้

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม) = น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย – น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (FCR) = $\frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) = $\frac{(\ln_{\text{น้ำหนักสิ้นสุด (กรัม)}} - \ln_{\text{น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)}}) \times 100}{\text{ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)}}$

อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์) = $\frac{\text{จำนวนปลาสิ้นสุดการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนปลาเริ่มต้นการทดลอง}}$

3.3.3.6 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง 14 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปลาแฟนซีคาร์พ โดยการสุ่มปลาแต่ละชุดการทดลอง มี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ตัว ทำการสลบปลาด้วย quinaldine แล้วเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดบริเวณส่วนหาง (caudal blood vessels puncture) โดยใช้กระบอกฉีดยาเคลือบ heparin เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด แบ่งตัวอย่างเลือดออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 นำเลือดปลาใส่ใน capillary tube เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ค่าฮีมาโตคริต และ diluting pipette เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว และส่วนที่ 2 นำเลือดใส่ใน eppendorf ที่มีสาร EDTA เคลือบหลอด จากนั้นนำเลือดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เสร็จแล้วทำการแยกเฉพาะที่เป็นส่วนใสเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และค่า TBARS ในเลือด เก็บตะกอนเม็ดเลือด เพื่อใช้ในการวิเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ catalase รายละเอียดดังนี้

(1) ค่าฮีมาโตคริต ใช้วิธีดัดแปลงของ Vazquez and Guerrero (2007) นำเลือดปลาใน capillary tube จากข้อ 3.3.3.6 มาปิดปลายด้านหนึ่งของหลอดด้วยดินน้ำมันสีขาว นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คำนวณเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริตดังนี้

ฮีมาโตคริต (เปอร์เซ็นต์) = $\frac{\text{(ความยาวชั้นเม็ดเลือดแดงใน microhematocrit tube} \times 100)}{\text{ความยาวของเลือดทั้งหมดใน microhematocrit tube}}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ใช้วิธีดัดแปลงของ Vazquez and Guerrero (2007) นำเลือดจากข้อ 3.3.3.6 มาถ่ายลงใน diluting pipette ให้ถึงขีด 0.5 เช็ดเลือดที่ปลายออกให้หมด ก่อนจุ่มลงในน้ำยา Yokoyama' s white cell fluid จนถึงขีด 101 จะได้เลือดที่มีความเจือจาง 1:200 ใช้นิ้วอุดที่ปลายทั้งสองด้านพลิกไปมาช้าๆ ประมาณ 2 นาที ปล่อยน้ำยาจาก diluting pipette 2-3 หยดแรกทิ้ง เพื่อกำจัดน้ำยาที่ไม่ได้รับการผสมกับเลือด จากนั้นนำส่วนปลายด้านล่างของ diluting pipette มาแตะระหว่าง counting chamber และ cover glass จากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์หาตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัสตรงกลาง 25 ช่อง จากนั้นนับจำนวนเม็ดเลือดแดงใน 5 ช่องโดยใช้กำลังขยาย 40 เท่า ส่วนการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวนับเฉพาะสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ (16 ช่อง) ที่ตำแหน่งมุมทั้ง 4 แล้วนำมาคำนวณตามสูตรดังนี้

จำนวนเม็ดเลือดแดง = จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้ 5 ช่อง×5×10×200

= (เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร)

จำนวนเม็ดเลือดขาว = จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ 16 ช่อง×10×200

= (เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร)

(3) การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในเลือด ใช้วิธีดัดแปลงของ Sanchez-Moreno *et al.* (1998) ดูดพลาสมาจากข้อ 3.3.3.6 จำนวน 0.1 มิลลิลิตร เติม DPPH 3.9 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างในหลอดทดลองถ่ายลงใน eppendorf ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ตามข้อ 3.3.1.4

(4) การวิเคราะห์ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ในเลือด โดยดูดพลาสมาจากข้อ 3.3.3.6 จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีฝาปิด เติม 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร, thiobarbituric acid (TBA) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร, trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติม butylated hydroxytoluene (BHT) ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที เมื่อครบระยะเวลาทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นนำสารในหลอดทดลองถ่ายลงใน eppendorf นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร คำนวณหาค่ากรดไทโอบาร์บิวทูริกโดยแทนในสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานมัลลัลไดแอลดีไฮด์ (MDA) แสดงผลเป็นมิลลิกรัมมัลลัลไดแอลดีไฮด์ต่อมิลลิลิตรของพลาสมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(5) การวิเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ catalase ในเลือด ใช้วิธีดัดแปลงของ Rudneva (1997) นำตะกอนเม็ดเลือดจากข้อ 3.3.3.6 ล้างตะกอนด้วย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) จากนั้นละลายตะกอนเม็ดเลือดด้วยน้ำกลั่น 5 เท่าของตะกอนเม็ดเลือด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดตัวอย่างสารละลายตะกอนเม็ดเลือด 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 7.5 มิลลิลิตร แล้วเติม H_2O_2 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม H_2SO_4 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปไตเตรทด้วย 1N $KMnO_4$ จนตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีชมพู เพื่อตรวจสอบปริมาณของ H_2O_2 Reduction ซึ่งคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\text{A, mg } H_2O_2 = \frac{1.7\,(V_{\text{ควบคุม}} - V_{\text{ตัวอย่าง}})}{30\times 0.5}$$

เมื่อ A = activity of enzyme catalase (มิลลิกรัม H_2O_2)

V = ปริมาตรของสารละลาย 1 N $KMnO_4$ (มิลลิลิตร)

0.5 = ปริมาตรของตัวอย่าง

30 = ระยะเวลาในการต้ม 30 นาที

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.4.1 นำข้อมูลจากการทดลองที่ 1 และ 2 ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์รวม ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ABTS และความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่ายฉัตรต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำมาวิเคราะห์โดยใช้ general linear model

3.4.2 นำข้อมูลจากการทดลองที่ 3 ได้แก่ การเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของปลาแฟนซีคาร์พมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองตามวิธี duncan's new multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

3.5 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการ หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 ระยะเวลาดำเนินการ

เดือนพฤศจิกายน 2555 – เดือนพฤษภาคม 2556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์รวม และความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายฉัตร

4.1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสาหร่ายฉัตร

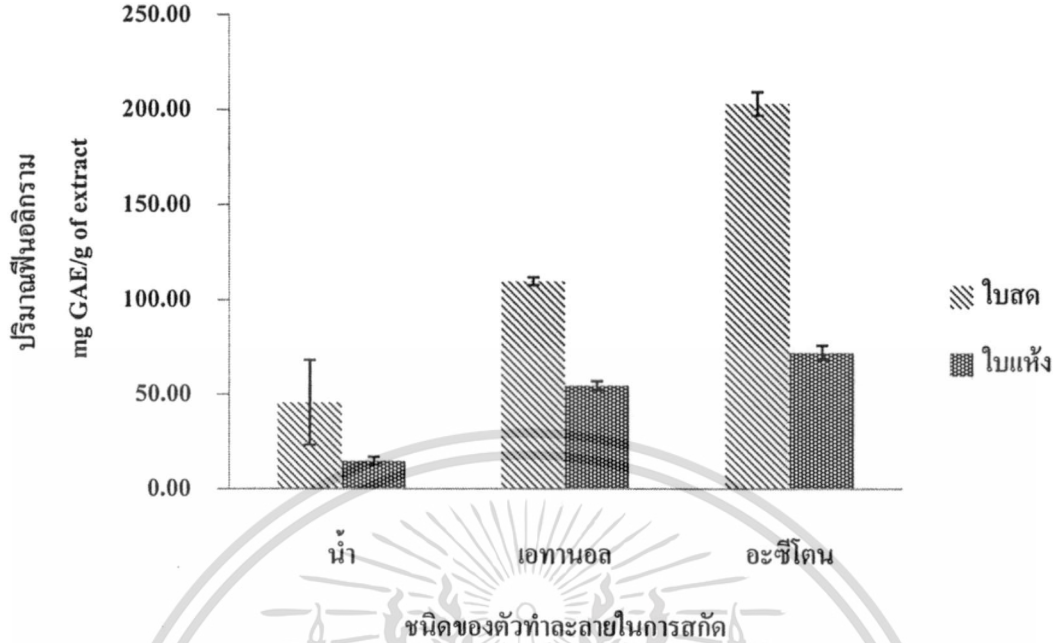
การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสาหร่ายฉัตรประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 คือ สภาพใบสดและใบแห้งของสาหร่ายฉัตร ปัจจัยที่ 2 คือ น้ำ เอทานอล 95 และอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สาหร่ายฉัตรและชนิดตัวทำละลายมีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง 2 ปัจจัย กล่าวคือ สภาพของใบร่วมกับชนิดตัวทำละลาย มีอิทธิพลต่อสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) สาหร่ายฉัตรใบสดร่วมด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด เท่ากับ 202.88±6.14 mg GAE/g of extract (ตารางภาคผนวกที่ ข.1) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสภาพใบของสาหร่ายฉัตร พบว่า สาหร่ายฉัตรใบสดมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าสาหร่ายฉัตรใบแห้ง เท่ากับ 119.56±23.78 และ 47.24±8.58 mg GAE/g of extract ตามลำดับ ($P<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยชนิดตัวทำละลาย พบว่า สาหร่ายฉัตรสกัดด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด รองลงมาได้แก่ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ เท่ากับ 137.50±29.42, 82.33±12.44 และ 30.38±12.25 mg GAE/g of extract ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (mg GAE/g of extract) ของสาหร่ายฉัตรร่วมกับตัวทำละลายที่ต่างกัน

สารสกัด	สภาพใบของสาหร่ายฉัตร		Mean±SE
	ใบสด	ใบแห้ง	
น้ำ	45.82±22.52	14.93±2.12	30.38±12.25^{c}
เอทานอล	109.98±2.07	54.68±2.33	82.33±12.44^{b}
อะซีโตน	202.88±6.14	72.11±3.86	137.50±29.42^{a}
Mean±SE	119.56±23.78^{a}	47.24±8.58^{b}	

อักษรที่ต่างกันในแนวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสาหร่ายฉัตร

4.1.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสาหร่ายฉัตร

การทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสาหร่ายฉัตร พบว่า สาหร่ายฉัตรและชนิดตัวทำละลายมีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง 2 ปัจจัย กล่าวคือ สภาพของใบร่วมกับชนิดตัวทำละลาย มีอิทธิพลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์รวมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยสาหร่ายฉัตรใบสดร่วมด้วยน้ำมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด เท่ากับ 174.75±32.48 mg quercetin eqivalent/g of extract (ตารางภาคผนวกที่ ข.2) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสภาพใบของสาหร่ายฉัตร พบว่า สาหร่ายฉัตรใบสดมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากกว่าสาหร่ายฉัตรใบแห้ง เท่ากับ 85.79±24.28 และ 18.90±3.78 mg quercetin eqivalent/g of extract ตามลำดับ ($P<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยชนิดของ ตัวทำละลาย พบว่า สาหร่ายฉัตรสกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด รองลงมา ได้แก่ อะซิโตน 95 และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 94.09±38.93, 37.69±7.04 และ 25.25±4.19 mg quercetin eqivalent /g of extract ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (mg quercetin eqivalent/g of extract) ของสาหร่ายฉัตรร่วมกับตัวทำละลายที่ต่างกัน

สารสกัด	สภาพใบของสาหร่ายฉัตร		Mean±SE
	ใบสด	ใบแห้ง	
น้ำ	174.75±32.48	13.44±4.03	94.09±38.93[a]
เอทานอล	32.21±0.80	18.30±6.24	25.25±4.19[b]
อะซีโตน	50.42±1.63	24.97±9.11	37.69±7.04[b]
Mean±SE	85.79±24.28[a]	18.90±3.78[b]	

อักษรที่ต่างกันในแนวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ภาพที่ 4.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสาหร่ายฉัตร

4.1.3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 2, 2-Diphenyl-l-Picrylhydrazyl (DPPH) ของสาหร่ายฉัตร

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสาหร่ายฉัตร พบว่าสาหร่ายฉัตรและชนิดตัวทำละลายมีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง 2 ปัจจัย กล่าวคือ สภาพของใบร่วมกับชนิดของตัวทำละลาย มีอิทธิพลต่อการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยสาหร่ายฉัตรใบสดร่วมด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด เท่ากับ 12.89±0.03 เปอร์เซ็นต์ (ตารางภาคผนวกที่ ข.3) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสภาพใบของ

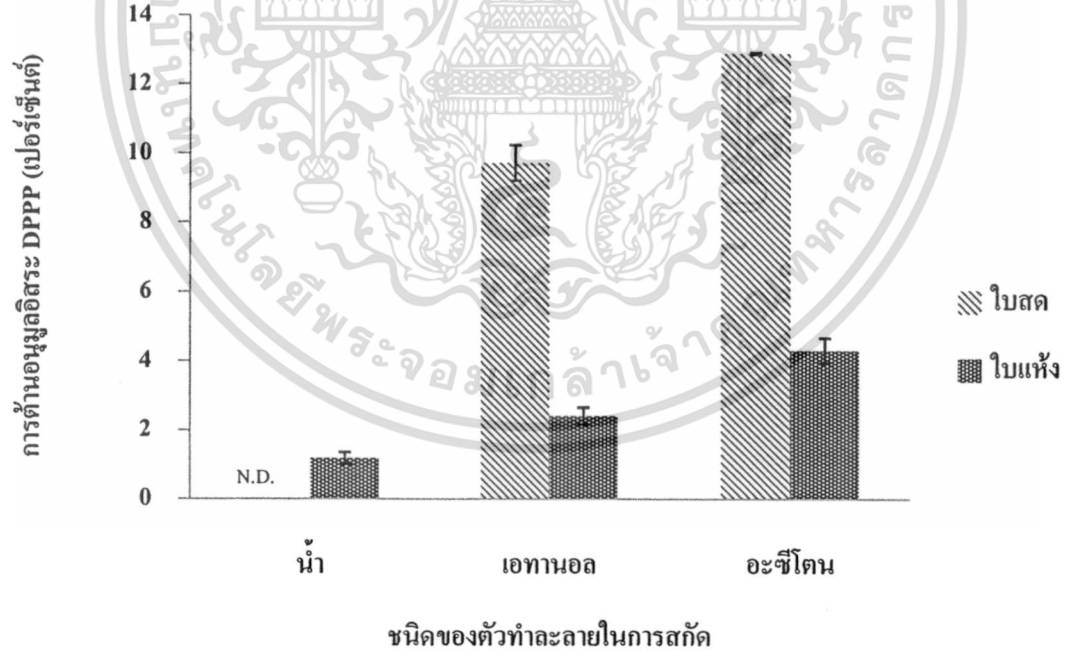
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายฉัตร พบว่า สาหร่ายฉัตรใบสดมีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่าสาหร่ายฉัตรใบแห้ง เท่ากับ 7.54±1.95 และ 2.63±0.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ($P<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยชนิดของตัวทำละลาย พบว่า สาหร่ายฉัตรสกัดด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด รองลงมา ได้แก่ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ เท่ากับ 8.60±1.93, 6.07±1.65 และ 0.59±0.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH (เปอร์เซ็นต์) ของสาหร่ายฉัตรร่วมกับตัวทำละลายที่ต่างกัน

สารสกัด	สภาพใบของสาหร่ายฉัตร		Mean±SE
	ใบสด	ใบแห้ง	
น้ำ	0.00±0.00	1.18±0.17	0.59±0.27^{c}
เอทานอล	9.72±0.52	2.41±0.25	6.07±1.65^{b}
อะซีโตน	12.89±0.03	4.30±0.36	8.60±1.93^{a}
Mean±SE	7.54±1.95^{a}	2.63±0.47^{b}	

อักษรที่ต่างกันในแนวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสาหร่ายฉัตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 2,2'-azinobis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS) ของสาหร่ายฉัตร

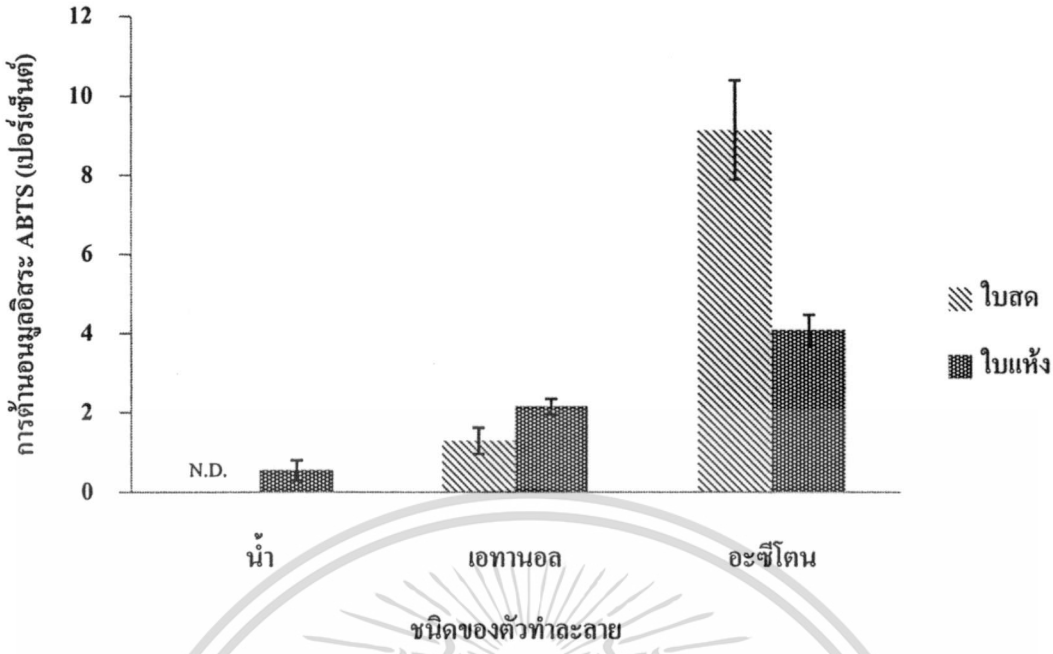
การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสาหร่ายฉัตร พบว่า สาหร่ายฉัตรและชนิดตัวทำละลายมีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง 2 ปัจจัย กล่าวคือ สภาพของใบร่วมกับชนิดของตัวทำละลาย มีอิทธิพลต่อการต้านอนุมูลอิสระ ABTS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยสาหร่ายฉัตรใบสดร่วมด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงสุด เท่ากับ 9.15±1.25 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวกที่ ข.4) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสภาพใบของสาหร่ายฉัตร พบว่า สาหร่ายฉัตรใบสดมีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS มากกว่าสาหร่ายฉัตรใบแห้ง เท่ากับ 3.48±1.48 และ 2.26±0.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ($P<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยชนิดตัวทำละลาย พบว่า สาหร่ายฉัตรสกัดด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงสุด รองลงมา ได้แก่ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ เท่ากับ 6.62±1.27, 1.72±0.26 และ 0.27±0.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS (เปอร์เซ็นต์) ของสาหร่ายฉัตรร่วมกับตัวทำละลายที่ต่างกัน

สารสกัด	สภาพใบของสาหร่ายฉัตร		Mean±SE
	ใบสด	ใบแห้ง	
น้ำ	0.00±0.00	0.55±0.25	0.27±0.17^{c}
เอทานอล	1.29±0.33	2.15±0.20	1.72±0.26^{b}
อะซีโตน	9.15±1.25	4.08±0.39	6.62±1.27^{a}
Mean±SE	3.48±1.48^{a}	2.26±0.53^{b}	

อักษรที่ต่างกันในแนวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสาหร่ายฉัตร

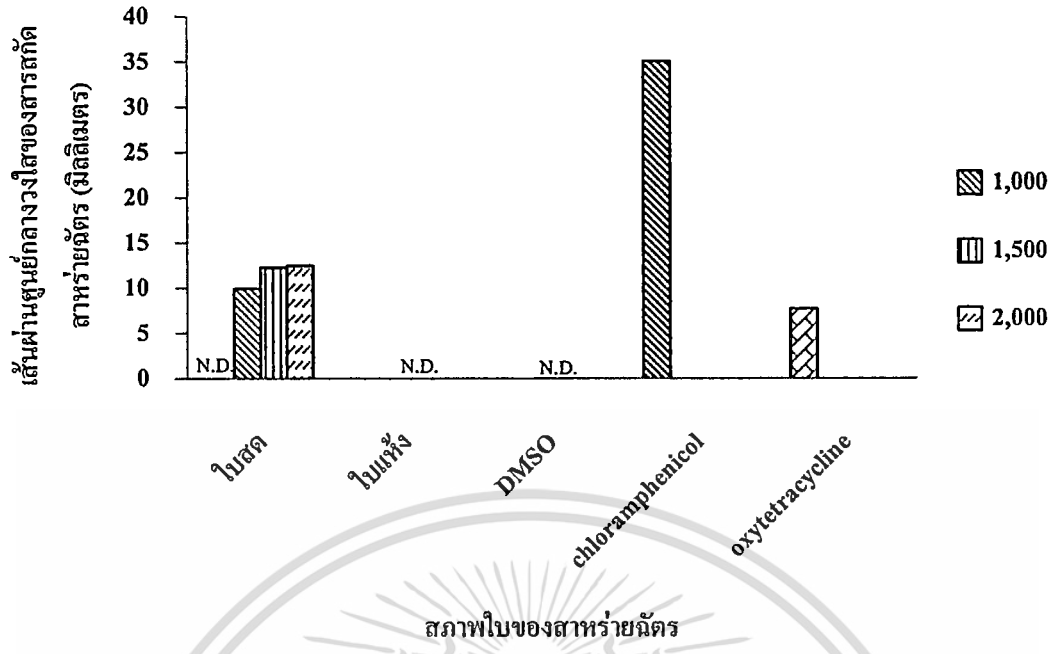
4.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสาหร่ายฉัตรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ

4.2.1 ผลของสารสกัดสาหร่ายฉัตรต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*

4.2.1.1 ผลของสาหร่ายฉัตรสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*

การทดสอบสารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีสภาพใบสาหร่ายฉัตรต่างกัน 2 ลักษณะ ได้แก่ สภาพใบสดและใบแห้ง ร่วมกับความเข้มข้นของสารสกัดต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สภาพใบสาหร่ายฉัตรและความเข้มข้นของสารสกัด มีอิทธิพลร่วมกันต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ ง.1, ตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.5,4.6) โดยสารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดที่ความเข้มข้นของสารสกัด 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* สูงสุด โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 12.52±0.33 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ของสารสกัดสาหร่ายฉัตร และความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับต่าง ๆ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่มีสภาพใบสาหร่ายฉัตร พบว่า สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสมากกว่าสาหร่ายฉัตรใบแห้ง เท่ากับ 8.70±1.55 และ 0.00±0.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ ($P<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารสกัดระดับต่าง ๆ พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัด 1,500 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส มีค่าสูงสุด เท่ากับ 6.15±2.76 และ 6.26±2.80 มิลลิเมตร รองลงมา คือ 1,000 ไมโครกรัมต่อดิส เท่ากับ 4.99±2.23 มิลลิเมตร และความเข้มข้น 500ไมโครกรัมต่อดิส ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ซึ่งเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสความเข้มข้นของสารสกัดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (มิลลิเมตร) ของสารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดต่างกัน

สภาพใบของสาหร่ายฉัตร	ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อดิส)				Mean±SE
	500	1,000	1,500	2,000	
ใบสด	0.00±0.00	9.97±0.32	12.30±0.52	12.52±0.33	8.70±1.55[a]
ใบแห้ง	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00[b]
Mean±SE	0.00±0.00[c]	4.99±2.23[b]	6.15±2.76[a]	6.26±2.80[a]	

อักษรที่ต่างกันในแนวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

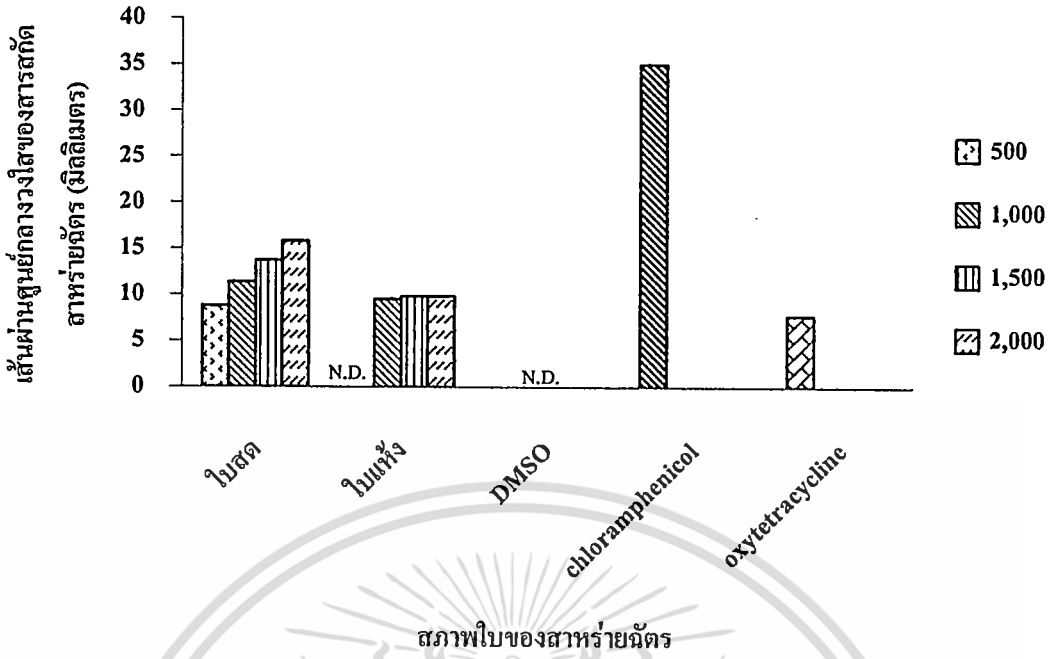
(A) 1,000 ไมโครกรัมต่อดิส (B) 1,500 ไมโครกรัมต่อดิส (C) 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส

ภาพที่ 4.6 สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดต่างกัน

4.2.1.2 ผลของสาหร่ายฉัตรสกัดด้วยอะซีโตน 95เปอร์เซ็นต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*

การทดสอบสารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีสภาพใบสาหร่ายฉัตรต่างกัน 2 ลักษณะ ได้แก่ สาหร่ายใบสดและใบแห้ง ร่วมกับความเข้มข้นของสารสกัดต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สภาพใบสาหร่ายฉัตรและความเข้มข้นของสารสกัดมีอิทธิพลร่วมกันต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ ง.2, ตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.7, 4.8 และ 4.9) โดยสารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* สูงสุด โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 15.83±0.40 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ของสารสกัดสาหร่ายฉัตร และความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับต่าง ๆ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่มีสภาพใบสาหร่ายฉัตร พบว่า สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสด มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสสูงกว่าสารสกัดสาหร่ายฉัตรใบแห้ง เท่ากับ 12.44±0.81 และ 7.31±1.28 มิลลิเมตร ตามลำดับ ($P<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารสกัดระดับต่าง ๆ พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัด 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส มีค่าสูงสุด เท่ากับ 12.84±1.35 มิลลิเมตร รองลงมา คือ 1,500, 1,000 และ 500 ไมโครกรัมต่อดิส เท่ากับ 11.78±0.90, 10.47±0.55 และ 4.40±1.97 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสความเข้มข้นของสารสกัดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (มิลลิเมตร) ของสารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยตัวทำละลายอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดต่างกัน

สภาพใบของสาหร่ายฉัตร	ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อดิส)				Mean±SE
	500	1,000	1,500	2,000	
ใบสด	8.80±0.37	11.39±0.54	13.72±0.29	15.83±0.40	12.44±0.81[a]
ใบแห้ง	0.00±0.00	9.54±0.58	9.84±0.49	9.84±0.09	7.31±1.28[b]
Mean±SE	4.40±1.97[d]	10.47±0.55[c]	11.78±0.90[b]	12.84±1.35[a]	

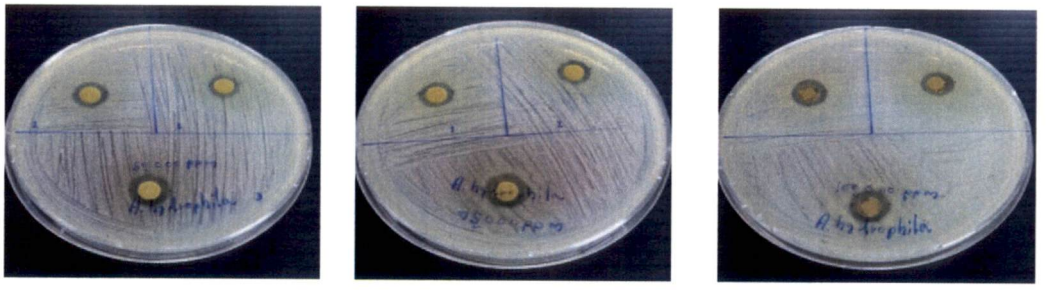
อักษรที่ต่างกันในแนวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

(A) 500 ไมโครกรัมต่อดิส (B) 1,000 ไมโครกรัมต่อดิส

(C) 1,500 ไมโครกรัมต่อดิส (D) 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส

ภาพที่ 4.8 สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(A) 1,000 ไมโครกรัมต่อดิส (B) 1,500 ไมโครกรัมต่อดิส (C) 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส

ภาพที่ 4.9 สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบแห้งด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดต่างกัน

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มของสารสกัดมีอิทธิพลร่วมกันต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยสารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* สูงสุด และสารสกัดสาหร่ายฉัตรใบแห้งทุกความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila*

การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* จากสารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มของสารสกัดมีอิทธิพลร่วมกันต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยสารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* สูงสุด และสารสกัดสาหร่ายฉัตรใบแห้งที่ความเข้มข้น 1,500 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส ให้ผลการยังยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* สูงสุด

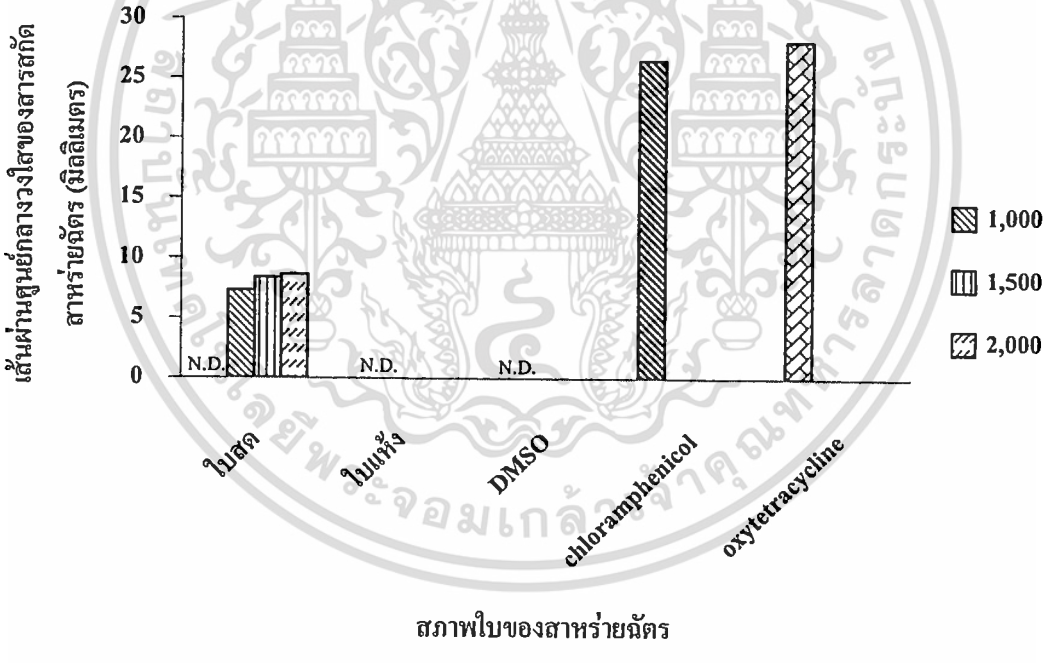
การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* จากสารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยน้ำ พบว่า สารสกัดสาหร่ายฉัตรและความเข้มข้นของสารสกัดไม่มีอิทธิพลร่วมกันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* กล่าวคือ สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดและใบแห้ง ทุกระดับความเข้มของสารสกัดไม่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* โดยเปรียบเทียบเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของสารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด กับ DMSO ดิสยา chloramphenicol และ oxytetracycline เท่ากับ 0.00±0.00, 35.08±1.94 และ 7.74±0.18 มิลลิเมตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลของสารสกัดสาหร่ายฉัตรต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*

4.2.2.1 ผลของสาหร่ายฉัตรสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*

การทดสอบสารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีสภาพใบสาหร่ายฉัตรต่างกัน 2 ลักษณะ ได้แก่ สภาพใบสดและใบแห้ง ร่วมกับความเข้มข้นของสารสกัดต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สภาพใบของสาหร่ายฉัตรและความเข้มข้นของสารสกัดมีอิทธิพลร่วมกันต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ ง.3, ตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.10, 4.11) โดยสารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* สูงสุด โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 8.68±1.47 มิลลิเมตร



ภาพที่ 4.10 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ของสารสกัดสาหร่ายฉัตรและความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับต่าง ๆ

เมื่อเปรียบเทียบค่าฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่มีสภาพใบสาหร่ายฉัตรพบว่า สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสสูงกว่าสารสกัดสาหร่ายฉัตรใบแห้ง เท่ากับ6.61±1.12 และ 0.00±0.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ ($P<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารสกัดระดับต่าง ๆ พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัด 2,000, 1,500 และ 1,000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครกรัมต่อดิส มีค่าสูงสุด เท่ากับ 4.34±2.05, 4.21±1.89 และ 3.68±1.65 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสความเข้มข้นของสารสกัดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.7 เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (มิลลิเมตร) ของสารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดต่างกัน

สภาพใบของสาหร่ายฉัตร	ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อดิส)				Mean±SE
	500	1,000	1,500	2,000	
ใบสด	0.00±0.00	7.35±0.41	8.42±0.34	8.68±1.47	6.61±1.12[a]
ใบแห้ง	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00[b]
Mean±SE	0.00±0.00[b]	3.68±1.65[a]	4.21±1.89[a]	4.34±2.05[a]	

อักษรที่ต่างกันในแนวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

(A) 1,000 ไมโครกรัมต่อดิส (B) 1,500 ไมโครกรัมต่อดิส (C) 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส

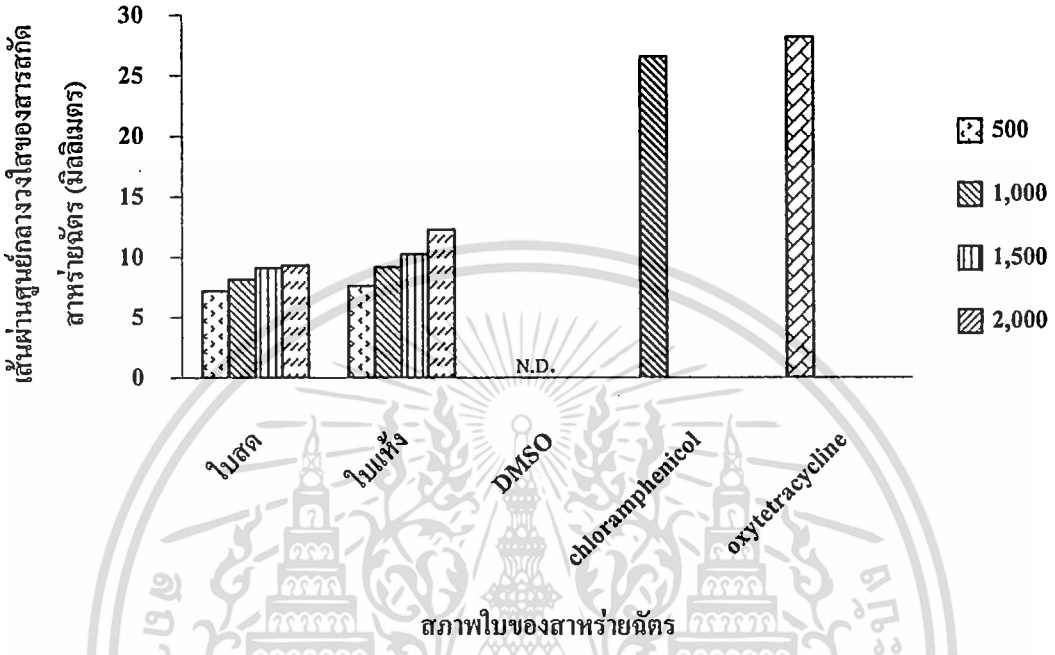
ภาพที่ 4.11 สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดต่างกัน

4.2.2.2 ผลของสาหร่ายฉัตรสกัดด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*

การทดสอบสารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีสภาพใบสาหร่ายฉัตรต่างกัน 2 ลักษณะ ได้แก่ สภาพใบสดและใบแห้ง ร่วมกับความเข้มข้นของสารสกัดต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สภาพใบสาหร่ายฉัตรและความเข้มข้นของสารสกัดมีอิทธิพลร่วมกันต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* อย่างมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางภาคผนวกที่ ง.4, ตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.12, 4.13 และ 4.14) โดยสารสกัดสาหร่ายฉัตรใบแห้งที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* สูงสุด โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 12.29±1.00 มิลลิเมตร



ภาพที่ 4.12 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ของสารสกัดสาหร่ายฉัตรและความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับต่าง ๆ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่มีสภาพใบสาหร่ายฉัตร พบว่า สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบแห้งมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสสูงกว่าสารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสด เท่ากับ 9.85±0.58 และ 8.49±0.38 มิลลิเมตร ตามลำดับ (P<0.05) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารสกัดระดับต่าง ๆ พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัด 2,000 ไมโครกรัม มีค่าสูงสุด เท่ากับ 10.82±0.9 มิลลิเมตร รองลงมา คือ ระดับความเข้มข้น 1,500, 1,000 และ 500 ไมโครกรัมต่อดิส มีค่าเท่ากับ 9.71±0.52, 8.70±0.30 และ 7.45±0.12 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสความเข้มข้นของสารสกัดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง (P<0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (มิลลิเมตร) ของสารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยตัวทำละลายอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดต่างกัน

สภาพใบของสาหร่ายฉัตร	ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อดิส)				Mean±SE
	500	1,000	1,500	2,000	
ใบสด	7.23±0.08	8.20±0.37	9.16±0.68	9.35±1.08	8.49±0.38^{b}
ใบแห้ง	7.66±0.15	9.20±0.23	10.26±0.77	12.29±1.00	9.85±0.58^{a}
Mean±SE	7.45±0.12^{c}	8.70±0.30^{bc}	9.71±0.52^{ab}	10.82±0.9^{a}	

อักษรที่ต่างกันในแนวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

(A) 1,000 ไมโครกรัมต่อดิส (B) 1,500 ไมโครกรัมต่อดิส (C) 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส

ภาพที่ 4.13 สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดต่างกัน

(A) 1,000 ไมโครกรัมต่อดิส (B) 1,500 ไมโครกรัมต่อดิส (C) 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส

ภาพที่ 4.14 สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบแห้งด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มของสารสกัดมีอิทธิพลร่วมกันต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยสารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* สูงสุด

การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จากสารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มของสารสกัดมีอิทธิพลร่วมกันต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยสารสกัดสาหร่ายฉัตรใบแห้งที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* สูงสุด

การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จากสารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยน้ำ พบว่า สารสกัดสาหร่ายฉัตรและความเข้มข้นของสารสกัดไม่มีอิทธิพลร่วมกันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* กล่าวคือ สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดและใบแห้ง ทุกระดับความเข้มของสารสกัดไม่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยเปรียบเทียบเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของสารสกัดสาหร่ายฉัตรด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด กับ DMSO ดิสยา chloramphenicol และ oxytetracycline เท่ากับ 0.00±0.00, 26.53±1.30 และ 28.13±1.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ

4.2.3 ผลของสารสกัดสาหร่ายฉัตรต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* และ *Vibrio cholerae*

จากการทดสอบสารสกัดสาหร่ายฉัตรต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* และ *Vibrio cholerae* ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีสภาพใบสาหร่ายฉัตรต่างกัน 2 ลักษณะ ได้แก่ สภาพใบสดและใบแห้ง ร่วมกับความเข้มข้นของสารสกัดต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส พบว่า สารสกัดสาหร่ายฉัตรและความเข้มข้นของสารสกัดไม่มีอิทธิพลร่วมกันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* และ *Vibrio cholerae* กล่าวคือ สารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดและใบแห้งด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด และทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัดไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* และ *Vibrio cholerae* ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของการเสริมสาหร่ายฉัตรในอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของปลาแฟนซีคาร์พ

4.3.1 ผลของการให้อาหารผสมสาหร่ายฉัตรต่อการเจริญเติบโตของปลาแฟนซีคาร์พ

การศึกษาปริมาณสาหร่ายฉัตรในอาหาร ต่อการเจริญเติบโตของปลาแฟนซีคาร์พ เมื่อได้รับอาหารที่ผสมสาหร่ายฉัตรที่ 0, 3, 6, 9 และ 12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 14 สัปดาห์ พบว่า ปลาแฟนซีคาร์พมีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (FCR) และอัตราการรอดตายไม่มีความแตกต่างอย่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 16.66±0.08, 16.67±0.07, 16.69±0.01, 16.67±0.07 และ 16.68±0.02 กรัม ตามลำดับ หลังจาก 14 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายของปลาแฟนซีคาร์พ เท่ากับ 29.74±0.89, 30.54±0.49, 28.89±0.34, 29.65±0.50 และ 28.95±0.08 กรัม ตามลำดับ ค่า SGR เท่ากับ 0.55±0.03, 0.58±0.01, 0.52±0.01, 0.55±0.01 และ 0.53±0.03 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) ค่า FCR เท่ากับ 5.59±0.25, 5.30±0.08, 5.90±0.11, 5.62±0.12 และ 5.83±0.04 ตามลำดับ และอัตราการรอดตาย เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่4.10)

ตารางที่ 4.9 การเจริญเติบโตของปลาแฟนซีคาร์พที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาหร่ายฉัตรในปริมาณต่างกัน

สาหร่ายฉัตร (กรัม/กก.)	น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัมต่อตัว)	น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย (กรัมต่อตัว)	SGR (เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)
0	16.66±0.08[a]	29.74±0.89[a]	0.55±0.03[a]
3	16.67±0.07[a]	30.54±0.49[a]	0.58±0.01[a]
6	16.69±0.01[a]	28.89±0.34[a]	0.52±0.01[a]
9	16.67±0.07[a]	29.65±0.50[a]	0.55±0.01[a]
12	16.68±0.02[a]	28.95±0.08[a]	0.53±0.03[a]

อักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการรอดของปลาแฟนซีคาร์พที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาหร่ายฉัตรในปริมาณที่ต่างกัน

สาหร่ายฉัตร (กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร)	FCR	อัตราการรอด (เปอร์เซ็นต์)
0	5.59±0.25[a]	100±0.00[a]
3	5.30±0.08[a]	100±0.00[a]
6	5.90±0.11[a]	100±0.00[a]
9	5.62±0.12[a]	100±0.00[a]
12	5.83±0.04[a]	100±0.00[a]

อักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

4.3.2 ผลของการให้อาหารผสมสาหร่ายฉัตรต่อค่าโลหิตวิทยาของปลาแฟนซีคาร์พ

เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำเลือดปลาแฟนซีคาร์พที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายที่ 0, 3, 6, 9 และ 12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มาวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cell : RBC) ปริมาณเม็ดเลือดขาว (white blood cell : WBC) และฮีมาโตคริต (haematocrit) พบว่าปริมาณเม็ดเลือดแดง และปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลาแฟนซีคาร์พทุกชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายฉัตร 0, 3, 6, 9 และ 12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P > 0.05) ปริมาณเม็ดเลือดแดงมีค่าเท่ากับ 1.45±0.36, 1.49±0.12, 1.75±0.11, 1.69±0.07 และ 1.53±0.10×10^6 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ ปริมาณเม็ดเลือดขาวมีค่าเท่ากับ 12.19±1.31, 11.85±0.28, 10.43±0.09, 12.53±0.86 และ 13.11±1.20×10^4 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ ปลาแฟนซีคาร์พที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายฉัตรที่ 6, 9 และ 12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่ามีค่า ฮีมาโตคริตสูงสุด เท่ากับ 42.09±3.81, 44.41±2.20 และ 44.49±0.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมสาหร่ายฉัตรที่ 0 และ 3 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (P<0.05) (ตารางที่ 4.11)

4.3.3 ผลของการให้อาหารผสมสาหร่ายฉัตรต่อค่า TBARS ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในเลือดและกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ของปลาแฟนซีคาร์พ

เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำเลือดปลาแฟนซีคาร์พที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายฉัตรที่ 0, 3, 6, 9 และ 12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร วิเคราะห์ค่า TBARS ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และกิจกรรมของเอนไซม์ catalase พบว่า ปลาแฟนซีคาร์พที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายฉัตร 12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีค่า TBARS ต่ำสุด เท่ากับ 0.0035±0.0001×10^{-3} ไมโครโมล MDA ต่อมิลลิลิตรของเลือดซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉัตรที่ 0,3 และ 6 กรัมต่อกิโลกรัม ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.12) เปอร์เซ็นต์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในเลือด และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ catalase ของปลาแฟนซีคาร์พทุกชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายฉัตร 0, 3, 6, 9 และ 12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 4.13)

ตารางที่ 4.11 ปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริตของปลาแฟนซีคาร์พที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาหร่ายฉัตรในปริมาณที่ต่างกัน

สาหร่ายฉัตร (กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร)	ปริมาณเม็ดเลือดแดง ($\times 10^6$ เซลล์/ลบ.มม.)	ปริมาณเม็ดเลือดขาว ($\times 10^4$ เซลล์/ลบ.มม.)	ค่าฮีมาโตคริต (เปอร์เซ็นต์)
0	1.45 ± 0.36^{a}	12.19 ± 1.31^{a}	29.47 ± 5.24^{b}
3	1.49 ± 0.12^{a}	11.85 ± 0.28^{a}	30.07 ± 3.88^{b}
6	1.75 ± 0.11^{a}	10.43 ± 0.09^{a}	42.09 ± 3.81^{a}
9	1.69 ± 0.07^{a}	12.53 ± 0.86^{a}	44.41 ± 2.20^{a}
12	1.53 ± 0.10^{a}	13.11 ± 1.20^{a}	44.49 ± 0.26^{a}

อักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.12 ค่า TBARS ในเลือดของปลาแฟนซีคาร์พที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาหร่ายฉัตรในปริมาณที่ต่างกัน

สาหร่ายฉัตร (กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร)	TBARS ($\times 10^{-3}$ ไมโครโมล MDA/มล.เลือด)
0	0.0052 ± 0.0004^{c}
3	0.0049 ± 0.0002^{bc}
6	0.0048 ± 0.0004^{bc}
9	0.0042 ± 0.0003^{ab}
12	0.0035 ± 0.0001^{a}

อักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 ค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในเลือดและกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ของปลาแฟนซีคาร์พที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาหร่ายฉัตรในปริมาณที่ต่างกัน

สาหร่ายฉัตร (กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร)	การต้านอนุมูลอิสระ DPPH (เปอร์เซ็นต์)	กิจกรรมของเอนไซม์ catalase ($\times 10^{-2}$ มิลลิกรัม H_2O_2)
0	21.76±2.42[a]	0.022±0.001[a]
3	18.05±4.41[a]	0.023±0.000[a]
6	18.15±5.19[a]	0.022±0.000[a]
9	27.17±6.88[a]	0.023±0.000[a]
12	11.57±4.32[a]	0.022±0.001[a]

อักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์รวม และความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายฉัตร

5.1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์รวมของสาหร่ายฉัตร

ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสาหร่ายฉัตรประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 คือ สภาพใบสดและใบแห้งของสาหร่ายฉัตร ปัจจัยที่ 2 คือ ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ เอทานอล 95 และ อะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สภาพใบสาหร่ายฉัตรและชนิดตัวทำละลาย มีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง 2 ปัจจัย คือ สภาพของใบร่วมกับชนิดของตัวทำละลาย มีอิทธิพลต่อสารประกอบฟีนอลิกรวมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยสาหร่ายฉัตรใบสดร่วมด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุด และสาหร่ายฉัตรใบแห้งร่วมด้วยน้ำ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต และการขยายพันธุ์ของพืช ช่วยให้เกิดสี รสชาติของผลไม้และผัก (Balasundram *et al.* 2006) สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ และไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ (รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ และคณะ. 2554) Worraratphoka *et al.* (2012) พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากผักแขยงสกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 152.41±14.20 µg GAE/ml การสกัดมีความสำคัญต่อพฤกษเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระ ผลที่ได้จากการสกัดขึ้นอยู่กับตัวทำละลาย ระยะเวลา และอุณหภูมิ (Yang *et al.* 2007) โดยปกติตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร คือ น้ำ เมทานอล เอทานอล อะซีโตน และเฮกเซน เป็นต้น ปัจจัยที่มีผลของการละลาย เช่น ความเข้มข้น ถ้าเปอร์เซ็นต์ตัวถูกละลายเพิ่มมากขึ้น จะมีผลอัตราการละลายลดต่ำลง พื้นที่ผิวและรูพรุนของอนุภาค เนื่องจากการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างตัวทำละลายและตัวถูกละลาย ทำให้มีการถ่ายเทมวลมากส่งผลให้เกิดการละลายมากขึ้น และรูพรุนของอนุภาค ถ้ามี รูพรุนน้อยมากจะไม่มีผลต่อการละลาย (เสถียร อำพันโรจนานันท์. 2551)

ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม พบว่า สภาพใบของสาหร่ายฉัตรร่วมกับชนิดของตัวทำละลายมีอิทธิพลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยสาหร่ายฉัตรใบสดร่วมด้วยน้ำมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด และสาหร่ายฉัตรใบแห้งร่วมด้วยน้ำมีปริมาณ ฟลาโวนอยด์น้อยที่สุด เนื่องจากสีของสารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดที่สกัดด้วยน้ำ มีสีที่อ่อน เมื่อเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ซึ่งมีสีเหลืองส่งผลให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่สูง Worraratphoka *et al*

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2012) พบปริมาณ ฟลาโวนอยด์รวมจากผักแขยงสกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 112.35±0.50 ไมโครกรัมคาเทชินต่อมิลลิกรัม ซึ่งฟลาโวนอยด์จากผักแขยง พบว่า มีสารสำคัญ เช่น nevadensin, nevadensin-7-*O* –β และ flavones เป็นต้น ธนศักดิ์ แซ่เลี่ยว และคณะ (2551) รายงานว่า ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของจากระชายเหลืองสูงสุด เมื่อสกัดด้วยอะซีโตน เท่ากับ 17.20 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทชิน ซึ่งผลมีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับปริมาณ ฟีนอลิกของกระชายเหลือง ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบจำพวกโพลีฟีนอล ซึ่งในธรรมชาติพบว่าฟลาโวนอยด์มีมากกว่า 4,000 ชนิด ลักษณะโครงสร้างทั่วไป คือ C_6-C_3-C_6 เป็นโครงสร้างของไดฟีนิลโพรเพน (diphenylpropanes) ฟลาโวนอยด์มีผลทางเภสัชวิทยารวมทั้งป้องกันการเกิดออกซิเดชัน ต้านการอักเสบ ป้องกันการแข็งตัวของเลือด และอาการภูมิแพ้ เป็นต้น (Miean and Mohamed. 2001) องค์ประกอบของสารฟลาโวนอยด์ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ขั้วของตัวทำละลายในการสกัด และวิธีการสกัด (Velickovic *et al.* 2007)

5.1.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของสาหร่ายฉัตร

การทดสอบความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสาหร่ายฉัตร พบว่า สาหร่ายฉัตรและชนิดของตัวทำละลายมีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง 2 ปัจจัย คือ สภาพของใบร่วมกับตัวทำละลาย มีอิทธิพลต่อการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยสาหร่ายฉัตรใบสดร่วมด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด เนื่องจากว่าสาหร่ายฉัตรใบสดร่วมด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูง จึงมีความสัมพันธ์ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ทำให้สารอนุมูลอิสระ DPPH มีความเข้มข้นลดลง ซึ่งสาร DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่มีสีม่วง เมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำให้มีสีจางลง (พิชญดา ฉายแสง. 2552) รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ และคณะ (2554) รายงานว่า ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากพืชสมุนไพรจะสอดคล้องกับปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ซึ่งถ้ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมาก ความสามารถต้านออกซิเดชันก็มากเช่นกัน งานวิจัยของ Worraratphoka *et al* (2012) รายงานว่าผักแขยงสกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 152.41±14.20 ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิลลิกรัม และความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีค่า EC_{50} เท่ากับ 24.44±0.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าเมื่อเทียบเท่ากับวิตามินซี มีค่าเท่ากับ 4.49±0.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริยานุช อินทร์รอด (2551) รายงานว่า สารสกัดจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลงด้วยเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด และมีฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ซึ่งมีผลสอดคล้องไปในทางเดียวกัน ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่ขับไล่อนุมูลอิสระ คือ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับสารออกซิไดส์ สารประกอบฟีนอลิกจะหน่วงเหนี่ยว หรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร (วิไลพร ปองเพียร. 2551) ความสามารถต้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุมูลอิสระ ABTS ของสาหร่ายฉัตร พบว่า สภาพของใบร่วมกับตัวทำละลาย มีอิทธิพลต่อการต้านอนุมูลอิสระ ABTS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยสาหร่ายฉัตรใบสดร่วมด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงสุด โดยมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกันกับความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH

5.2 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสาหร่ายฉัตรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Vibrio cholerae* จากสารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดและใบแห้งที่สกัดด้วยน้ำ พบว่า ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 4 ชนิด และสารสกัดสาหร่ายฉัตรร่วมด้วยเอทานอล 95 และ อะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* และ *V. cholerae* ได้ในทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัด ซึ่งสารสกัดจากสาหร่ายฉัตรมีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก คือ *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* เนื่องจากสารสกัดจากสาหร่ายฉัตรด้วยเอทานอล 95 และ อะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูง จึงทำให้มีความสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นผลพลอยได้จากเมทาบอลิซึมของเซลล์พืชสร้างโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อต้านทานโรค (พงศธร ล้อสุวรรณ และคณะ. 2551) สุคนธ์ ตันติไพบูลย์วุฒิ และคณะ (2555) รายงานว่าคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมดของเปลือกผลไม้ 5 ชนิด สกัดด้วยน้ำร้อน เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และอะซีโตน พบว่า สารสกัดด้วยอะซีโตนให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium*) ซึ่งสารสกัดจากเปลือกผลไม้ด้วยอะซีโตนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด และความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ ณัฏฐา นิธิกุลวรวงศ์ (2555) ศึกษาสารสกัดสมุนไพรสิรินธรวัลลีสกัดด้วยอะซีโตน และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* พบว่า สารสกัดจากใบสิรินธรวัลลีสกัดด้วยอะซีโตน และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 10.60±0.85 และ 15.53±0.65 มิลลิเมตร เนื่องจากสมุนไพรสิรินธรวัลลีมีสารที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย คือ isoliquiritigenin, isoliquiritigenin, 4-methyl ether, ethernaringenin และ luteolin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ร่วมฤดี พานจันทร์ (2553) ศึกษาฤทธิ์สารสกัดจากกระเทียมต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* โดยสกัดกระเทียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไทยและกระเทียมจีนด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และอะซีโตน พบว่า กระเทียมไทยและกระเทียมจีนสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 28.75±1.55 และ 22.75 ±1.03 มิลลิเมตร ส่วนกระเทียมที่สกัดด้วยอะซีโตน มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 13.13±1.38 และ 12.00±1.08 มิลลิเมตร ตามลำดับ เนื่องจากกระเทียมมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ คือ allicin ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้หลายชนิด และยังมีสาร *p*-coumaric ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก (ลือชัย บุตคุป. 2554)

5.3 การศึกษาผลของการเสริมสาหร่ายฉัตรในอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของปลาแฟนซีคาร์พ

5.3.1 ผลของสาหร่ายฉัตรในอาหารต่อการเจริญเติบโตของปลาแฟนซีคาร์พ

ผลการศึกษาปริมาณสาหร่ายฉัตรในอาหาร ต่อการเจริญเติบโตของปลาแฟนซีคาร์พเมื่อได้รับอาหารผสมสาหร่ายฉัตรที่ปริมาณ 0, 3, 6, 9 และ 12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 14 สัปดาห์ พบว่า ปลาแฟนซีคาร์พมีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (FCR) และอัตราการรอดตาย ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แสดงว่าการเลี้ยงปลาแฟนซีคาร์พด้วยอาหารผสมสาหร่ายฉัตรไม่มีผลการเจริญเติบโต Banerjee and Matai (1990) รายงานว่าสาหร่ายฉัตรมีปริมาณโปรตีน 15.4 เปอร์เซ็นต์ และเยื่อใย 23.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคุณภาพของโปรตีนจากพืชจะน้อยกว่าโปรตีนจากสัตว์ ความสมดุลของกรดอะมิโนมากกว่าโปรตีนจากพืช และวัตถุดิบจากพืชสามารถย่อยได้ต่ำ (อรพินท์ จินตสถาพร. 2550) ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ อนุรักษ์ เขียวขจรเขต และคณะ (2555) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากแหนแดงในอาหารปลานิลแดงแปลงเพศ โดยผสมแหนแดงแห้งในอาหารที่ระดับ 0, 8, 16, 26, 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ หรือทดแทน 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนจากปลาป่น พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมและอาหารผสมแหนแดงที่ระดับ 16 และ 26 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อการเจริญเติบโตที่ดีซึ่งพิจารณาจาก น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักของปลา ซึ่งการเสริมแหนแดงในปริมาณสูงทำให้ความสามารถในการย่อยของปลาน้อยลง และกรดอะมิโนที่จำเป็นมีน้อยเมื่อเทียบกับปลาป่น จึงส่งผลให้มีอัตราการเจริญเติบโตลดลง เช่นเดียวกันกับ จงกล พรมยะ (2555) ศึกษาผลของการใช้สาหร่ายสไปรูลินาสดและผงแห้งในอาหารปลาแฟนซีคาร์พ ที่ระดับ 0, 21 เปอร์เซ็นต์แบบสด และ 3 เปอร์เซ็นต์ผงแห้ง แต่ละสูตรมีโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารผสมสาหร่าย สไปรูลินาทั้งแบบสดและแห้ง ส่งผลให้การเจริญเติบโต น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสูงกว่าปลาแฟนซีคาร์พที่ได้รับอาหารชุดควบคุม (P<0.05) เนื่องจากสาหร่ายสไปรูลินามีโปรตีนสูงและผนังเซลล์มีองค์ประกอบที่ง่ายต่อการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ย่อย เนื่องจากไม่มีเซลลูโลส และ Moonsri (2007) รายงานว่าเมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบของโปรตีนจากพรรณไม้น้ำกับปลาป่น พบว่ากรดอะมิโนจำเป็นและไม่จำเป็นของพรรณไม้น้ำน้อยกว่าที่พบในปลาป่น แต่ก็สามารถประยุกต์ใช้เป็นโปรตีนทดแทนจากพืชในอาหารสัตว์น้ำได้

5.3.2 ผลของการให้อาหารผสมสาหร่ายฉัตรต่อค่าโลหิตวิทยาของปลาแฟนซีคาร์พ

เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำเลือดปลาแฟนซีคาร์พที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายฉัตรที่ 0, 3, 6, 9 และ 12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร วิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยาของปลาแฟนซีคาร์พ ประกอบด้วย ปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cell : RBD) เม็ดเลือดขาว (white blood cell : WRC) และค่าฮีมาโตคริต (haematocrit) พบว่า ปลาแฟนซีคาร์พที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายฉัตรในปริมาณแตกต่างกัน มีปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ค่าฮีมาโตคริตสูงสุด เมื่อปลาแฟนซีคาร์พได้รับอาหารผสมสาหร่ายฉัตร 6, 9 และ 12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (42.09±3.81, 44.41±2.20 และ 44.49±0.26 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ค่าโลหิตวิทยา (haematology) ของปลาเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่มีความสำคัญในการบ่งชี้สภาพทางสรีรวิทยา สุขภาพ และการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม ดังนั้นเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงหรือความผิดปกติในร่างกาย ก็จะส่งผลต่อองค์ประกอบเลือดโดยตรง ทั้งนี้องค์ประกอบเลือดของปลาจะแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับชนิด อายุ สุขภาพ และสิ่งแวดล้อม เป็นต้น (นพดล ศุกระกาญจน์ และคณะ. 2552) ค่าฮีมาโตคริตสูงอาจเกิดจากการเร่งสร้างเม็ดเลือดแดงหรือเกิดจากความเครียดขณะจับปลา หรือขณะเก็บตัวอย่างเลือด ทำให้เกิดภาวะเม็ดเลือดเกิน ความเครียดแบบฉับพลันทำให้พลาสมามีปริมาณลดลง เม็ดเลือดมีขนาดใหญ่ขึ้น (กำมัชพล ภูรีพงษ์. 2550)

5.3.3 ผลของการให้อาหารผสมสาหร่ายฉัตรต่อค่า TBARS ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในเลือดและกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ของปลาแฟนซีคาร์พ

5.3.3.1 ค่ากรดไทโอบาร์บิวทูริก (TBARS)

การวิเคราะห์ค่า TBARS พบว่า ปลาแฟนซีคาร์พที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายฉัตร 12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร. มีค่า TBARS ต่ำสุด ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การลดลงของค่า TBARS ในเลือดของปลาแฟนซีคาร์พ มีความสัมพันธ์กับปริมาณของสาหร่ายฉัตรที่เพิ่มขึ้น เนื่องด้วยสาหร่ายฉัตรมีสารฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกซึ่งมีคุณสมบัติช่วยลดอนุมูอิสระในร่างกาย (ลือชัย บุตคุป. 2554 ; Brahmachari. 2008) การวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดแอลดีไฮด์ (MDA) ในการตรวจวัดสารที่เกิดขึ้นจากการแตกตัวเปอร์ออกไซด์ ปฏิกิริยาการเกิดมาลอนไดแอลดีไฮด์ เป็นการตรวจวัดสารมีสีชมพู จากปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดแอลดีไฮด์กับกรดไทโอบาร์บิวทูริก (TBA) การตรวจวัดระดับ MDA เป็นการประเมิน

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาวะ oxidative stress คือ ภาวะที่มีอนุมูลอิสระมากจนสารต้านอนุมูลมีไม่เพียงพอ จึงส่งผลให้เกิดการทำลายโครงสร้างต่าง ๆ ในร่างกายได้ (เดช ดอกพวง และ วรเชษฐ์ ขอบใจ. 2556) ธรรมศาสตร์ ศรีสัตยเสถียร (2548) รายงานว่า ค่า TBARS ในเลือดของไก่เมื่อได้รับอาหารเสริมสารเคอร์คิวมินอยด์ระดับ 50, 100 และ 150 ส่วนในล้านส่วน (ppm) พบว่า เมื่อระดับเคอร์คิวมินอยด์เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้ค่า TBARS ลดลง โดยเคอร์คิวมินอยด์เป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก ซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี สอดคล้องกับอังศุมาลี แก้วดิเรก (2549) รายงานว่า ค่า TBARS ในเลือดของไก่เมื่อได้รับอาหารผสมสารสกัดจากพริกที่ให้สารแคปไซซิน ที่ระดับ 0, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่า ปริมาณสารแคปไซซินที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มค่า TBARS ลดลง สารแคปไซซินมีโครงสร้างในกลุ่มฟีนอล ซึ่งสามารถป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระได้ ถ้าค่า TBARS ต่ำแสดงว่ามีการลดปริมาณเปอร์ออกซิเดชัน ทำให้เกิดผลผลิตจากปฏิกิริยานี้น้อยลง

5.3.3.2 เปอร์เซ็นต์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในเลือดของปลาแฟนซีคาร์พ

วิเคราะห์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในเลือด พบว่า เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของปลาแฟนซีคาร์พไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ซึ่งเป็นการวัดความสามารถต้านออกซิเดชันจากปริมาณของสารที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันลดลง หรือฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันที่มีอยู่ในร่างกายซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมวัดหาความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในเลือด หรือพลาสมาในการขจัดอนุมูลอิสระ (ปฏิวิทย์ ลอยพิมาย. 2554) แนวโน้มของเปอร์เซ็นต์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่สูงของปลาแฟนซีคาร์พ เมื่อได้รับอาหารผสมสาหร่ายฉัตร 9 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ซึ่งปลาแฟนซีคาร์พสามารถใช้ประโยชน์หรือดูดซึมสารฟลาโวนอยด์จากสาหร่ายฉัตรได้ที่ระดับ 9 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร อังศุมาลี แก้วดิเรก (2549) รายงานว่า จากการตรวจสอบค่า DPPH ในเลือดไก่ที่ได้รับผสมสารสกัดจากพริกที่ให้สารแคปไซซินในระดับ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีค่า DPPH น้อยกว่ากลุ่มที่มีสารแคปไซซินระดับ 0, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เนื่องจากว่าไก่ในแต่ละช่วงอายุจะมีการตอบสนองต่อระดับแคปไซซินในสารสกัดจากพริกที่แตกต่างกัน

5.3.3.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ catalase ของปลาแฟนซีคาร์พ

ผลการศึกษาพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ catalase ของปลาแฟนซีคาร์พที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายฉัตรที่ 0, 3, 6, 9 และ 12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) สารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสามารถสร้างขึ้นเอง ได้แก่ ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide: NO) กลูต้าไธโอน (glutathione: GSH) ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase: SOD) และคะตะเลส (catalase: CAT) ถ้าร่างร่างกายขาดเอนไซม์ต่าง ๆ เหล่านี้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ โดยมีเหล็ก (Fe^{2+})

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ร้ายแรงที่สุด คือ อนุมูลไฮดรอกซิล จะเข้าทำลาย ดีเอ็นเอ (DNA) โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตของเซลล์ (จันเพ็ญ บางสำรวจ. 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากสารสกัดสาหร่ายฉัตรใบสดด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุด 202.88±6.14 95 มิลลิกรัม mg GAE/g of extract และสาหร่ายฉัตรใบสดสกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด 174.75±32.48 mg quercetin eqivalent/g of extract

2. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS พบว่าสาหร่ายฉัตรใบสดสกัดด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด 12.89±0.03 และ 9.15±1.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3. สาหร่ายฉัตรใบสดสกัดด้วยเอทานอล 95 และอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วยระดับความเข้มข้นของสารสกัด 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* สูงสุด มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส 12.52±0.33 และ 15.83±0.40 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* สาหร่ายฉัตรใบสดสกัดด้วย เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และสาหร่ายฉัตรใบแห้งสกัดด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วยระดับความเข้มข้นของสารสกัด 2,000 ไมโครกรัมต่อดิส ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อสูงสุด มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส 8.64±1.47 และ 12.29±1.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ

4. ปริมาณสาหร่ายฉัตรในอาหารที่มีปริมาณต่างกัน ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของปลาแฟนซีคาร์พ และอัตราการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในทุกชุดการทดลอง

5. ค่าโลหิตวิทยา ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ไม่มีความแตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง เปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริตสูงสุดเมื่อปลาได้รับอาหารผสมสาหร่ายฉัตรที่ 6, 9 และ 12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เท่ากับ 42.09±3.81, 44.41±2.20 และ 44.49±0.26 ตามลำดับ และค่า TBARS ต่ำสุด เมื่อปลาได้รับอาหารผสมสาหร่ายฉัตร 12 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

ข้อเสนอแนะ

1. การทดสอบความสามารถการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากสาหร่ายฉัตรนอกเหนือจากวิธี Disc diffusion แล้ว ควรเพิ่มเติมวิธี การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) เพื่อยืนยันประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การประเมินสุขภาพของปลาโดยวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา ควรมีการเพิ่มการทดสอบภูมิคุ้มกันของปลา เช่น ความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียโดยการฉีดเชื้อเข้าสู่ตัวปลา และประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของซีรั่ม เพื่อเป็นการยืนยันสุขภาพของปลาเมื่อได้รับอาหารที่ผสมสาหร่ายฉัตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กานดา ล้อแก้วมณี, วราพร หนันแดง, ภานุวัฒน์ คัมภีราวัฒน์ และ ชื่นจิต จันทจรูณพงษ์. 2552. "การยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* โดยสารสกัดผักแขยงและผักกระโดนน้ำ ในระดับห้องปฏิบัติการ." **วิทยาสารกำแพงแสน.** 7(2): 30-38.

กิตติมา วานิชกูล, นนทวิทย์ อารีย์ชน และ งามผ่อง คงคาทิพย์. 2550. "การใช้สารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)." **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45.** สาขาประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 212-220.

กำมัชพล ภูรีพงษ์. 2550. "พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและโลหิตวิทยาของปลาบางชนิดในแม่น้ำโขง". วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จงกล พรมยะ, ขจรเกียรติ์ ศรีนวลสม และ อนุภาพ วรรณคนาพล. 2553. "การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina Platensis* ในน้ำทิ้งจากโรงอาหารเพื่อเป็นอาหารในการอนุบาล และเลี้ยงปลาแฟนซีคาร์พแบบยั่งยืน." **รายงานการวิจัยมหาวิทยาลัยแม่โจ้.** มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 68 หน้า.

จงกล พรมยะ, บัญชา ทองมี และ ขจรเกียรติ์ ศรีนวลสม. 2555. "ผลของอาหารผสมสไปรูลินาต่อการเจริญเติบโต ความสมบูรณ์เพศและระบบภูมิคุ้มกันในปลาแฟนซีคาร์พ." **วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง.** มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 6(1): 11-22.

จันเพ็ญ บางสำรวจ. 2553. "กระเทียมกับการต้านอนุมูลอิสระ." **วารสาร มฉก. วิชาการ.** มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ. 14(27): 113-122.

จุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์ และ สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์. 2553. "ผลของสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) ต่อองค์ประกอบเลือด ระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch, 1790)." **วารสารการประมง.** 63(1): 56-65.

เจนจิรา จิรัมย์ และ ประสงค์ สีหานาม. 2554. "อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา." **วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์.** 1(1): 59-70.

ชฎาธาร โทนเดียว, อรพินท์ จินตสถาพร, ประทักษ์ ตาบทิพย์วรรณ และ ศรีน้อย ชุ่มคำ. 2550. "ผลของใบยอและฟ้าทะลายโจรต่อการเปลี่ยนแปลงสีและอัตราการจับกินเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาวในปลาทอง (*Carasius auratus*)." **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45.** สาขาประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 538-546.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนกันต์ จิตมนัส. 2556. "ผลของผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรต่อภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ." **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น.** 18(2): 257-269.

ณัฏฐา นิธิกุลวรวงศ์. 2555. "ประสิทธิภาพของสารสกัดสิรินธรวัลลีต่อความต้านทานเชื้อ *Streptoccous agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)." **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น.** 17(5): 715-724.

เดช ดอกพวง และ วรเชษฐ์ ขอบใจ. 2556. "สภาวะเครียดออกซิเดชันของผู้ป่วยเบาหวานและภาวะแทรกซ้อนของเบาหวานในโรงพยาบาลพะเยา." **บทความวิจัยการประชุมหาดใหญ่วิชาการ ครั้งที่ 4.**หน้า 146-154.

ธนศักดิ์ แซ่เลี่ยว, ศศิธร จันทนวรางกูร และ วรรณี จิรภาคย์กุล. 2551. ผลของตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านออกซิเดชันของกระชายเหลือง (*Boesenbergia pandurata*)." **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46** สาขาอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 538-545.

ธนาวัฒน์ เพียศักดิ์, เบญจวรรณ สิงพงษ์, กัญญา เกิดศิริ และ ภูดิส เกิดศิริ. 2555. "ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชท้องถิ่น." **การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.** หน้า 63-71.

ธรรมศาสตร์ ศรีสัตยเสถียร. 2548. "การใช้สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและสารเคอร์คิวมินอยด์ในไก่เนื้อ". วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวบาล บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตร์ศาสตร์.

ธิดารัตน์ หน่อสุวรรณ. 2553. "การสกัดวิตามินอีจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้ต้นทุนต่ำ." **รายงานวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.** มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 108 หน้า.

ธิติพร โคตรชา, วรรทณา สินศิริ, นริศ สินศิริ และ ประภัสสร บุษมั่น. 2554. "ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. ในถั่วพุ่มพันธุ์ มมส.1." **แก่นเกษตร.** 39: 184-189.

ธีระพงษ์ ขันทเจริญ, อรพิน เกิดชู และ ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์. 2553. "ประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเปลือกและเมล็ดองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล." **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร.** 3(1): 617-620.

นภดล ศุกระกาญจน์. 2549. **คู่มือปฏิบัติการโรคสัตว์น้ำ.** คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยทักษิณ.

นพดล ศุกระกาญจน์, สุภฎา ดีรีรัฐนิคม, กฤษณะ เรืองคล้าย และ พันธสิทธิ์ โชคสวัสดิกร. 2552. "การศึกษาค่าโลหิตวิทยาของปลาดุกลำพัน (*Clarias nieuhofii*) ในระบบการเลี้ยง." **รายงานการวิจัย** คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยทักษิณ. 40 หน้า.

นพวัฒน์ เพ็งคำศรี, จัตุพล กันทะมูล, ภัทราภรณ์ โตวัฒนกิจ, วชิรวิทย์ วงศ์ษารัฐ, วนิดา ใจหมั่น,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิภาพร เมืองจันทร์ และ สุภารัตน์ จันทร์เหลือง. 2554. "ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้าขิง." **วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ.** 6(3): 195-201.

นฤมล น้อยหวอย และ ศศิธร จันทนวรางกูร. 2550. "ผลกระทบของการแปรรูปต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันในบัวบก." **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45.** สาขาอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 760-767.

นฤมล น้อยหวอย. 2551. "ผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและการแปรรูปต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันและสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนในบัวบก (*Centella asiatica* (Linn.) Urban)." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นันทชัย บุญจร. 2546. "ปรสิตในปลาสวยงามบางชนิดจากฟาร์มเพาะเลี้ยงบริเวณอำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี". ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การประมง บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นันทริกา ชันซื่อ. 2549. "การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำแช่ใบหูกวางแห้งและสารสกัดฟ้าทะลายโจรต่อการงอกของหาง และปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นในปลาคาร์พ." **สัตวแพทยสาร.** 57(2): 52-62.

บังอร วงศ์รักษ์ และ ศศิลักษณ์ ปียะสุวรรณ. 2549. "ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน". ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. 2556. "อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ." **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 21(3): 276-286.

ปฏิวิทย์ ลอยพิมาย. 2554. "การประเมินความสามารถต้านออกซิเดชันรวมในหลอดทดลอง." **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 31(2): 164-170.

ปริยานุช อินทร์รอด. 2551. "ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง". ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี, มหาวิทยาลัยบูรพา.

พงศธร ล้อสุวรรณ, จิตศิริ ราชตนะพันธุ์ และ ศศิธร จันทนวรางกูร. 2551. "สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านจุลินทรีย์ของเปลือกผลไม้." **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46.** สาขาอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 554-561.

พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และ ปาริชาติ พุ่มขจร. 2553. "การใช้สมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรคในปลา." **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 12(4): 63-71.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พรรณี เดชกำแหง. 2547. "การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคบางชนิดตามตำราแพทย์แผนไทย." **รายงานการวิจัยมหาวิทยาลัยจันทรเกษม.** มหาวิทยาลัยจันทรเกษม. 69 หน้า.

พิชญดา ฉายแสง. 2552. "การผลิตและการเสริมสร้างมูลค่าของน้ำมันหอมระเหยจากเศษเหลือไม้เทพทาโร." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิศมัย เหล่าภัทรเกษม. 2548. "บทบาทของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการป้องกันและรักษามะเร็ง." **ศรีนครินเวชสาร.** 20(3): 180-189.

ภัทราภรณ์ สืบสำราญ และ ปวีณา ทวีกิจการ. 2554. "ผลของสารสกัดสมุนไพรพญาวานรต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา ค่าภูมิคุ้มกันและความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)." **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49.** สาขาประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 1-9.

ภาวนา พนมเขต, สุรศักดิ์ แว่นรัมย์ และ ธันยาการย์ ศรีวรมาศ. 2554. "ฤทธิ์ต้านจุลชีพของส่วนสกัดของพืชไทยต่อเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*." **วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด.** 23(2): 151-158.

รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์, จิราวรรณ อุ่นเมตตาอารี และ จิตรา สิงห์ทอง. 2554. "ฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดย่านาง เครือหมาน้อย และรางจืด." **รายงานการวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.** มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 53 หน้า.

ร่วมฤดี พานจันทร์ พงษ์กฤษณ์ ศิริสรณ์ และ สมวิทย์ ผาพรม. 2553. "ฤทธิ์ของสารสกัดกระเทียมต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่แยกได้จากปลาดุกลูกผสม." **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48.** สาขาประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 329-335.

ลือชัย บุตคุป. 2554. สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 31(4): 443-455.

วรพล เองวานิช. 2550. "กลไกการสร้างและทำลายอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน." **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 26(3): 294-301.

วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล และนนทวิชย์ อารีย์ชน. 2549. "ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลากัดและความเป็นพิษของสารสกัดใบหูกวางต่อปลากัด." **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44.** สาขาประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 109-116.

วัลลภ วีชะรังสรรค์ และ ประณีต โอปณะโสภิต. 2547. "ภาพรวมของอนุมูลอิสระและการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชในหลอดทดลอง." **Srinakharinwirot Journal of Pharmaceutical Science.** 9(1): 73-80.

วุฒิพร พรหมขุนทอง. 2528. การใช้สาหร่ายหางกระรอก สาหร่ายพุงชะโด และผักตบชวาผสมในอาหารเพื่อใช้อนุบาลลูกปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus* Bleeker)." **วารสารสงขลานครินทร์.** 7: 371-376.

สุกัญญา แซ่ลี้, สุมาลี บุญศรี, จินตนา ชัยสุโรจน์ และ อรุณ จันทร์คำ. 2555. ส่วนประกอบทางเคมีจากผักแขยง. **การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.** หน้า 72-79.

สุคนธ์ ตันติไพบูลย์วุฒิ, เทียนชัย น่วมเศรษฐี และ เพชรลดา เดชายืนยง. 2555. "ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลไม้บางชนิด." **วารสารวิจัยมหาวิยาลัยขอนแก่น.** 17(6): 880-894.

สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530. **พรรณไม้น้ำ.** ภาควิชาพฤกษศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภาพร พงษ์มณี และ กัญณาญาภัค สนามพล. 2550. การสกัดสารจากพืชสมุนไพรเพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**. 38(6): 54-57.

เสถียร อำพันโรจนานันท์. 2551. "การเลือกตัวทำละลายสำหรับการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติโดยใช้พารามิเตอร์การละลาย". ปริญญาวิศวกรรมศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

อนุรักษ์ เขียวขจรเขต, อมรรัตน์ วันอังคาร, กุลยาภัสร์ วุฒิจารี, ณัฐมนตรี คงกระพันธ์ และ ณัฐพงศ์ วงศ์ใหญ่. 2555. "การใช้ประโยชน์จากแหนแดงอบแห้งในอาหารปลานิลแดงแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus* Linn.)." **แก่นเกษตร.** 40(2): 518-521.

อรพินท์ จินตสถาพร. 2550. **เอกสารประกอบการสอนวิชาอาหารสัตว์น้ำ.** คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อังศุมาลี แก้วดิเรก. 2549. "การใช้สารสกัดหยาบจากพริกในอาหารไก่เนื้อ." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโภชนาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหารสัตว์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อัญชนา เจนวิถีสุข. 2544. "การตรวจหาและบ่งชี้ชนิดสารต้านอนุมูลจากผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อิทธิพร จันทร์เพ็ญ. 2531. **การเพาะเลี้ยงปลาสวยงามน้ำจืด.** กรุงเทพฯ: ช่อนนทรี.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Acharya, R., Padiya, R., Patel, E.D., CR, H. and Shukla, V.J. 2013. "Phytochemical study of an ethno medicinal plant *Limnophil arugosa* ROTH. (MERR) (Scrophulariaceae) wholeplant." **Annals of Ayurvedic Medicine.** 2: 37-40.

AOCS. 1971. **Official and tentative method of the America oil chemists society.** 3cd. Association of Official Chemist Society.

Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S. 2006. "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products : antioxidant activity, occurrence, and potential uses." **Food Chemistry.** 99: 191-203.

Banerjee, A. and Matai,S. 1990. "Composition of indian aquatic plants in relation to utilization as animal forage." **Journal of Aquatic Plant Management.** 28: 69-73.

Brahmachari, G. 2008. "*Limnophila* (Scophulariaceae) : Chemical and Pharmaceutical Aspects." **The Open Natural Products Journal.** 1: 34-43.

Brahmachari, G., Mandal, N.C., Jash, S.K., Roy, R., Mandal, L.C., Mukhopadhyay, A., Behera, B., Majhi, S., Mondal, A. and Gangopadhyay, A. 2011. "Evaluation of the antimicrobial potential of two flavonoids isolated from *Limnophila* plants." **Chemistry & Biodiversity.** 8: 1139-1151.

Iqbal, S. and Bhanger, M.I. 2006. "Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleafera* leaves growth in Pakistan." **Journal of Food Composition and Analysis.** 19: 544-551.

Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Mhamdi, B., Chaieb, K., Bakrouf, A., Magn, C. and Abdelly, C. 2009. "Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. related polyphenolic constituents." **Food and Chemical Toxicology.** 47: 2083-2091.

Kukongviriyapan, U., Luangaram, S. and Leekhaosoong, K. 2007. "Antioxidant and vascular protective activities of *Cratoxylum formosum*, *Syzygium gratum* and *Limnophila aromatic*." **Biology of Pharmaceutical Science.** 30(4): 661-666.

Matthaus, B. 2002. "Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds." **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 50: 3444-3452.

Miean, K.H. and Mohamed, S. 2001. "Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin and Apigenin) content of edible tropical plants." **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 49: 3106-3112.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Moonsri, J. 2007. "Development of protein replacement from aquatic plant in aquatic animal feed." Thesis for degree of master of science, Mahidol University.

Nanasombat, S. and Teckchuen, N. 2009. "Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of thai local vegetables." **Journal of Medicinal Plants Research.** 3(5): 443-449.

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J. and Shahabimajd, N. 2006. "Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants." **African Journal of Biotechnology.** 5(11) : 1142-1145.

Ruangdej, U. and Laohavisuti, N. 2011. "Aquarium plant, *Bacopa monnieri* L., enhances immune response of aquatic animals against bacteria." **International Journal of Arts and Sciences.** 4(2): 115-120.

Rudneva, I.I. 1997. "Blood antioxidant system of black sea elasmobranch and teleosts." **Comparative Biochemistry and Physiology.** 118(2): 255-260.

Sanchez-Moreno, C. and Larrauri, J. 1998. "A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols." **Journal of the Science of Food and Agriculture.** 76: 270-276.

Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Rizner, A., Hras, R., Simonic, M. and Knez, Z. 2005. "Phenols, proanthocyanidins, flavones in some plant materials and their antioxidant activities." **Food Chemistry.** 89: 191-198.

Sreelatha, S. and Padma, P.R. 2009. "Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleafera* leaves in two stages of maturity." **Plant Foods Human Nutrition.** 64: 303-311.

Sribusarakum, A., Bunyapraphatsara, N., Vajragupta, O. and Watanabe, H. 2004. "Antioxidant activity of *Limnophila aromatica* Merr." **Thai Journal of Phytopharmacy.** 11(2): 11-17.

Suksamrarn, A., Poomsing, P., Aroonrerk, N., Punjanon, T., Susamrarn, S. and Kongkun, S. 2003. "Antimycobacterial and antioxidant flavones from *Limnophila geoffrayi*." **Archives of Phytopharmacy Research.** 26(10): 816-820.

Vazquez, G.R. and Guerrero, G.A. 2007. "Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes)." **Tissue and Cell.** 39: 151-160.

Velickovic, D.T., Nikolova, M.T., Ivancheva, S.V., Stojanovic, J.B. and Veljkovic, V. 2007. "Extraction of flavonoids from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

glutinosa L.) sage by ultrasonic and classical maceration." **Journal of the Serbrian Chemical Society**. 72(1): 73-80.

Woraratphoka, J., Intarapichet, K-O. and Indrapichate, K. 2012. "Antioxidant activity and cytotoxicity of six selected, regional , thai vegetables." **American-Eurasian Journal of Toxicological Science**. 4(2): 108-117.

Yang, D., Wang, Q., Ke, L., Jiang, J. and Ying, T. 2007. "Antioxidant activities of various extracts of lotus (*Nelumbo nuficera* Gaertn) rhizome." **Asia Pacific Clinical Nutrition**. 16(1): 158-163.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

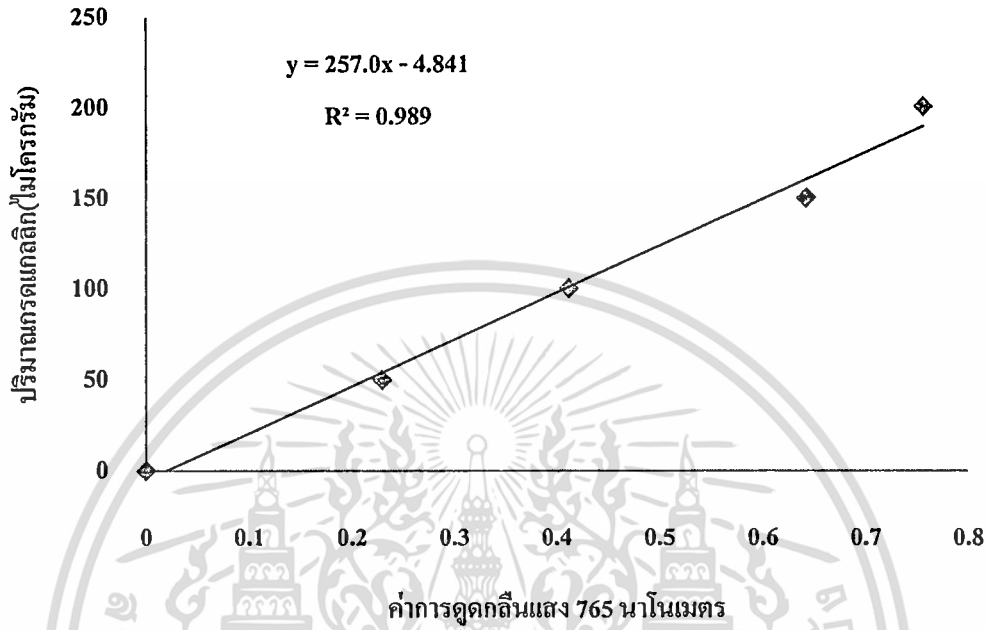
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกและตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากสาหร่ายฉัตร



ภาพที่ ก 1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (ไมโครกรัม)

1. นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างแทนค่าในสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน y = 257.0(x)-4.841 เช่น วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเท่ากับ 0.034 นำค่าการดูดกลืนแสงแทนค่าในสมการ ดังนี้

= (257.0×0.034)-4.841

= 3.897 ไมโครกรัม

= หรือ 0.003897 มิลลิกรัม

สารสกัดสาหร่ายฉัตร 1 มิลลิลิตร มีความเข้มข้น = 0.0005 กรัม

สารสกัดสาหร่ายฉัตร 0.2 มิลลิลิตร มีความเข้มข้น = 0.0001 กรัม

คำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) = $\frac{\text{ปริมาณกรดแกลลิก (มิลลิกรัม)}}{\text{ปริมาณสารสกัด (กรัม)}}$

= $\frac{0.003897}{0.0001}$

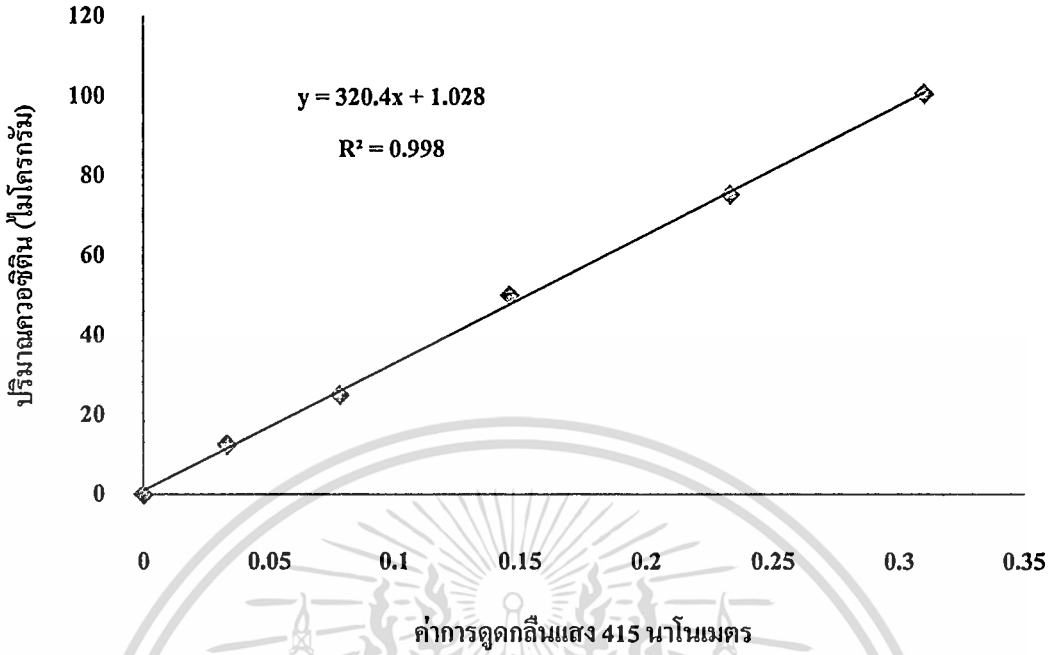
ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด = 38.97 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

กราฟมาตรฐานเควอซิทิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ข 1 กราฟมาตรฐานของเควอซิทิน (ไมโครกรัม)

1. นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างแทนค่าในสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน y = 320.4(x)+1.028 เช่น วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเท่ากับ 0.046 นำค่าการดูดกลืนแสงแทนค่าในสมการ ดังนี้

= 320.4(0.046)+1.028

= 15.7664 ไมโครกรัม

= หรือ 0.0158 มิลลิกรัม

สารสกัดสาหร่ายฉัตร 1 มิลลิลิตร มีความเข้มข้น = 0.0005 กรัม

สารสกัดสาหร่ายฉัตร 0.5 มิลลิลิตร มีความเข้มข้น = 0.0003 กรัม

คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมเควอซิทินต่อกรัมสารสกัด) = $\frac{\text{ปริมาณเควอซิทิน (มิลลิกรัม)}}{\text{สารสกัด (กรัม)}}$

= $\frac{0.0158}{0.0003}$

ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด = 52.66 มิลลิกรัมเควอซิทินต่อกรัมสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

ตารางแสดงการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์รวม การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของสาหร่ายฉัตรร่วมด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน โดยใช้ general linear model

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสาหร่ายฉัตรร่วมด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน โดยใช้ general linear model

Factor	df	Mean Square	F	P
Corrected Model	5	13221.410	46.075	.000
Intercept	1	125198.412	436.300	.000
Leave	1	23537.990	82.027	.000
Solvent	2	17217.756	60.002	.000
Leave*Solvent	2	4066.774	14.172	.001
Error	12	286.955		

ตารางภาคผนวกที่ ค.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสาหร่ายฉัตรร่วมด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน โดยใช้ general linear model

Factor	df	Mean Square	F	P
Corrected Model	5	11288.931	18.869	.000
Intercept	1	49322.076	82.438	.000
Leave	1	20135.562	33.655	.000
Solvent	2	8074.930	13.497	.000
Leave*Solvent	2	10079.617	16.847	.001
Error	12	598.292		

ตารางภาคผนวกที่ ค.3 การวิเคราะห์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสาหร่ายฉัตรร่วมด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน โดยใช้ general linear model

Factor	df	Mean Square	F	P
Corrected Model	5	78.861	321.831	.000
Intercept	1	465.430	1.899E3	.000
Leave	1	108.486	442.732	.000
Solvent	2	100.617	410.615	.000
Leave*Solvent	2	42.293	172.596	.000
Error	12	.245		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค.4 การวิเคราะห์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสาหร่ายฉัตรร่วมด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน โดยใช้ general linear model

Factor	df	Mean Square	F	P
Corrected Model	5	34.527	35.748	.000
Intercept	1	148.322	153.568	.000
Leave	1	6.686	6.922	.022
Solvent	2	66.282	68.626	.000
Leave*Solvent	2	16.692	17.282	.000
Error	12	.966		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

ตารางแสดงการวิเคราะห์ความสามารถการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสาหร่ายฉัตรร่วมด้วยความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยใช้ general linear model

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ง.1 การวิเคราะห์ความสามารถการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ของสาหร่ายฉัตรที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วยความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยใช้ general linear model

Factor	df	Mean Square	F	P
Corrected Model	7	109.794	610.800	.000
Intercept	1	453.966	2.525E3	.000
Leave	1	453.966	2.525E3	.000
Concentration	3	52.432	291.687	.000
Leave*Concentration	3	52.432	291.687	.000
Error	16	.180		

ตารางภาคผนวกที่ ง.2 การวิเคราะห์ความสามารถการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ของสาหร่ายฉัตรที่สกัดด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วยความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยใช้ general linear model

Factor	df	Mean Square	F	P
Corrected Model	7	64.882	136.701	.000
Intercept	1	2338.400	4.927E3	.000
Leave	1	158.004	332.900	.000
Concentration	3	85.454	180.044	.000
Leave*Concentration	3	13.270	27.960	.000
Error	16	.475		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ง.3 การวิเคราะห์ความสามารถการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcu agalactiae* ของสาหร่ายฉัตรที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วยความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยใช้ general linear model

Factor	df	Mean Square	F	P
Corrected Model	7	53.798	58.913	.000
Intercept	1	224.176	245.492	.000
Leave	1	224.176	245.492	.000
Concentration	3	25.402	27.817	.000
Leave*Concentration	3	25.402	27.817	.000
Error	16	.913		

ตารางภาคผนวกที่ ง.4 การวิเคราะห์ความสามารถการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcu agalactiae* ของสาหร่ายฉัตรที่สกัดด้วยอะซีโตน 95 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วยความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยใช้ general linear model

Factor	df	Mean Square	F	P
Corrected Model	7	7.678	5.965	.002
Intercept	1	2017.767	1.568E3	.000
Leave	1	11.207	8.706	.009
Concentration	3	12.411	9.642	.001
Leave*Concentration	3	1.770	1.375	.286
Error	16	1.287		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

วิธีการวิเคราะห์ TBARS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการวิเคราะห์ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ในเลือดปลา

การเตรียมสารเคมี

1. กรดไทโอบาร์บิทูริก (thiobarbituric acid; TBA) 1 เปอร์เซ็นต์ ชั่ง TBA ปริมาณ 1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร (เตรียมในน้ำอุ่น)

2. กรดไทคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid; TCA) 10 เปอร์เซ็นต์ ชั่ง TCA ปริมาณ 10 กรัม ละลายด้วยน้ำน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3. บิวทิลเลต ไฮดรอกซี่ โทลูอีน (butylated hydroxytoluene;BHT) 0.2 เปอร์เซ็นต์ ชั่ง BHT ปริมาณ 0.2 กรัม ละลายด้วยเอทานอล ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลลิตร

4. 50 mM โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 โดยชั่ง $K_2HPO_4.3H_2O$ ปริมาณ 9.24 กรัม ผสมกับ KH_2PO_4 ปริมาณ 1.3 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.4 ด้วย 1 M KH_2PO_4

5. stock MDA standard (100 ไมโครโมลาร์) โดยปีเปต standard tetramethoxypropana (TMP) 16.87 ไมโครลิตร หยด HCl 5-8 หยด จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. สลบปลาด้วย quinaldine จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดจากบริเวณส่วนหาง โดยใช้กระบอกฉีดยาเคลือบ heparin ใส่ตัวอย่างเลือดใน eppendorf ที่เคลือบสาร EDTA

2. นำ eppendorf ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. ปีเปตพลาสมาที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 50 mM โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

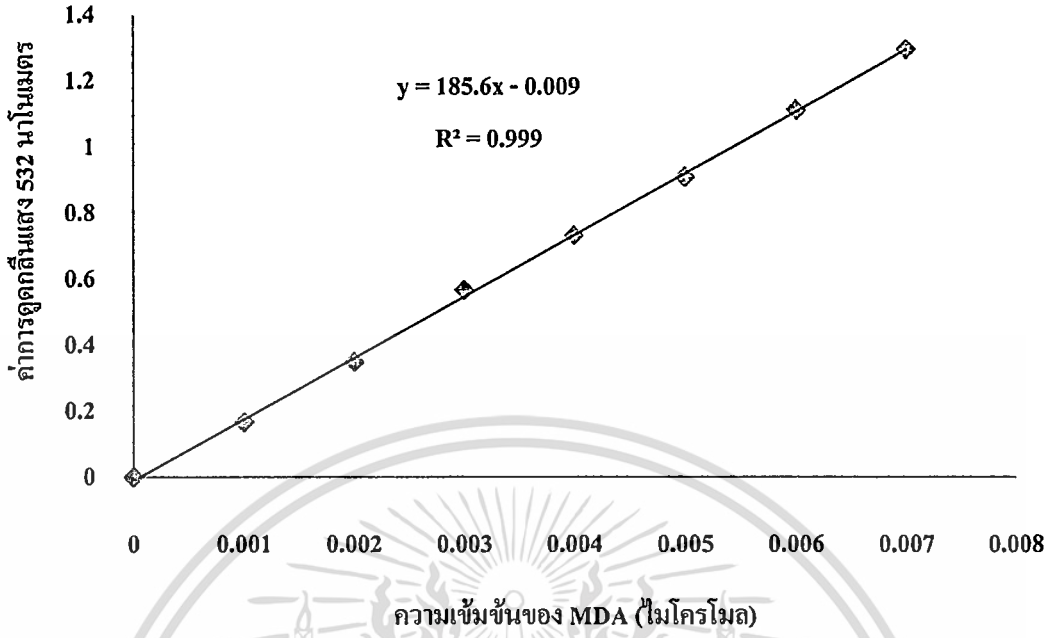
4. เติม TBA ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร TCA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ BHT ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร

5. นำไปต้มในน้ำที่มีอุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เขย่าหลอดในขณะต้ม เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำตัวอย่างทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำแข็ง

6. นำตัวอย่างถ่ายลงใน eppendorf จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของพลาสมาคำนวณหาค่ากรดไทโอบาร์บิทูริก โดยแทนในสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของมัลลัลไดแอลดีไฮด์ ดังภาพที่ จ.1 แสดงผลเป็นไมโครโมลมัลลัลไดแอลดีไฮด์ต่อมิลลิลิตรของพลาสมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ จ.1 กราฟมาตรฐานของโมลมัลลัลไดแอลดีไฮด์ (malondialdehyde: MDA) ในเลือด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ.

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว

การเตรียมน้ำยา Yokoyama's white cell fluid

ฉ.1 การเตรียม Solution A

1.1 โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ชั่งปริมาณ 4 กรัม

1.2 โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride) ชั่งปริมาณ 0.2 กรัม

1.3 เด็กซ์โตรส (Dextrose) ชั่งปริมาณ 0.0013 กรัม

1.4 40% ฟอร์มาลิน (Formalin) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

1.5 น้ำกลั่น ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

ฉ.2 การเตรียม Solution B

2.1 เมทิล ไวโอเลต (Methyl violet) ชั่งปริมาณ 0.075 กรัม

2.2 Pyronin b ชั่งปริมาณ 0.075 กรัม

2.3 น้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร

เวลาใช้ให้นำ Solution A และ Solution B มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 ควรกรองสีย้อมทุกครั้งก่อนใช้งาน

วิธีการ

1. สลบปลาด้วย quinaldine จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดจากบริเวณส่วนหาง โดยใช้กระบอกฉีดยาเคลือบ heparin ถ่ายเลือดปลาลงใน diluting pipette ให้ถึงขีด 0.5 เช็ดเลือดที่ปลายออก

2. จุ่ม diluting pipette ลงในน้ำยา Yokoyama's white cell fluid จนถึงขีด 101 ใช้นิ้วอุดที่ปลายทั้งสองด้าน พลิกไปมาช้าๆ 2 นาที

3. ปล่อยน้ำยาจาก diluting pipette 2-3 หยดแรกทิ้งเพื่อกำจัดน้ำยาที่ไม่ได้ผสมกับเลือด จากนั้นนำปลายส่วนด้านล่างของ diluting pipette แตะระหว่าง counting chamber และ cover glass

4. นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์หาตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัสตรงกลาง 25 ช่อง นับเม็ดเลือดแดงใน 5 ช่อง โดยใช้กำลังขยาย 40 เท่า ส่วนการนับเม็ดเลือดขาวนับเฉพาะสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ (16 ช่อง) ที่ตำแหน่งมุมทั้ง 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวปิยภรณ์ บุญฤทธิ์
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่ 19 เดือนกันยายน พ.ศ.2528
ที่อยู่	126/3 ม.2 ถนนยนตรการกำธร ตำบลทุ่งนุ้ย อำเภอควนกาหลง จังสตูล 91130
ประวัติการศึกษา	2550 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้