

การศึกษา 17 α -METHYLTESTOSTERONE (17MT) ในไรแดง (*MOINA*
SPP.) ที่แช่ด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์และในสมุนไพรมุ่งต่อคุณลักษณะการ
เติบโตในปลานิล (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

STUDY OF 17 α -METHYLTESTOSTERONE (17MT) IN WATER
FLEA (*MOINA* SPP.) IMMERSSED WITH SYNTHETIC HORMONE
AND 17MT IN HERBS ON GROWTH PERFORMANCES IN NILE
TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)



กัญชริกา พิลापง
KANCHARIKA PILAPANG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2567

KMITL-2024-AG-M-081-429

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY OF 17 α -METHYLTESTOSTERONE (17MT) IN WATER
FLEA (*MOINA* SPP.) IMMERSSED WITH SYNTHETIC HORMONE
AND 17MT IN HERBS ON GROWTH PERFORMANCES IN NILE
TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN FISHERIES SCIENCE
SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2024

KMITL-2024-AG-M-081-429

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2024

SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษา 17 α -Methyltestosterone (17MT) ในไรแดง (<i>Moina</i> spp.) ที่แช่ด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์และในสมุนไพรรตอ
ชื่อนักศึกษา	กัญชริกา พิลาแพง
รหัสประจำตัว	62604022
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การประมง
พ.ศ.	2567
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งตะวัน ยมหล้า

บทคัดย่อ

ศึกษาระดับความเข้มข้นในการแช่ต่อการสะสมของฮอร์โมนสังเคราะห์ 17 α -Methyl testosterone (17MT) ต่อไรแดงในห้องปฏิบัติการที่ช่วงเวลาแตกต่างกัน โดยแบ่งไรแดงออกเป็น 2 กลุ่ม การทดลอง คือ กลุ่มที่ 1 ไรแดงที่แช่ใน 17MT ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลุ่มที่ 2 แช่ในระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแต่ละชุดการทดลองมีจำนวน 3 ซ้ำ ติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ 17MT ในไรแดงและในน้ำหลังจากแช่นาน 30, 60 และ 420 นาที ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าปริมาณ 17MT ในไรแดงพบสูงสุดที่ระยะเวลาการแช่นาน 420 นาที โดยพบว่าปริมาณ 17MT ของทั้ง 2 กลุ่ม ในทุกช่วงเวลา แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน 17MT ในการสกัดสมุนไพรรตอชนิดต่างๆ กัน คือ กระจ่างดำ กวาวเครือแดง และหนามกระสุน ตรวจพบฮอร์โมน 17MT ในสารสกัดสมุนไพรรตอทุกชนิดที่ทำการศึกษา โดยพบปริมาณของฮอร์โมน 17MT ในสารสกัดกระจ่างดำ กวาวเครือแดง และหนามกระสุน เท่ากับ 4.227, 0.152 และ 0.179 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัด ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกกระจ่างดำมาทดสอบคุณลักษณะการเติบโตของสารสกัดกระจ่างดำเปรียบเทียบกับฮอร์โมนสังเคราะห์เป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน โดยใช้สารสกัดกระจ่างดำที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดกระจ่างดำแตกต่างกันผสมในอาหารแก่ลูกปลานิลที่เลี้ยงนาน 21 วัน ในการทดสอบครั้งนี้ได้ทำทดลองจำนวน 3 ครั้ง โดยการทดลองที่ 1 และ 2 ให้อาหารผสม 17MT จากสารสกัดที่ความเข้มข้น 60, 90 และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับฮอร์โมนสังเคราะห์ 17MT ที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน และการทดลองที่ 3 ให้อาหารผสมสารสกัดที่ความเข้มข้น 60 และ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม พบว่าอัตราการรอดและอัตราการเติบโตต่ำลงในกลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระจ่างดำที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น การทดลองที่ 1 และ 2 พบอัตราการรอดและอัตราการเติบโตสูงสุดในกลุ่มที่ไม่ได้รับฮอร์โมนกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับฮอร์โมนสังเคราะห์ และการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และกึ่งอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดลองที่ 3 พบอัตรารอดและอัตราการเติบโตสูงสุดในกลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำ ซึ่งแนวโน้มของการส่งเสริมลักษณะการเติบโตในปลานิลด้วยสารสกัดสมุนไพรในระยะวัยอ่อนนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมนยังส่งผลกระทบต่อเชิงลบของลักษณะอัตรารอดตายและอัตราการเติบโต

คำสำคัญ: 17 α -Methyltestosterone (17MT), Water flea, Nile tilapia,

Tribulus terrestris, *Butea superba*, *Kaempferia parviflora wallich*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Study of 17 α -Methyltestosterone (17MT) in water flea (<i>Moina</i> spp.) immersed with synthetic hormones and 17MT in herbs on growth performances in Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)
Student Name	Kancharika Pilapang
Student ID	62604022
Degree	Master of Science
Department	Fisheries Science
Year	2567
Thesis Advisor	Associate Professor Rungtawan Yomla (Ph.D.)

Abstract

The different concentrations of synthetic hormone 17 α -Methyltestosterone (17MT) were studied on the accumulation in water fleas (*Moina* spp.) in the laboratory. This experiment divided water fleas into 2 experimental groups: Group 1, water fleas immersed in 17MT at a concentration of 50 milligrams per liter and Group 2, immersed in a concentration of 100 milligrams per liter. Each set of experiments had 3 replicates. The change in the amount of 17MT in water fleas and in immersed water was followed after immersing for 30, 60 and 420 minutes using the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique. It was found that the highest amount of 17MT in water fleas at the immersion time of 420 minutes. The amount of 17MT of both groups in every time periods found significantly different ($p < 0.05$). Result of 17MT hormone in herb extracts of different types as Krachai-dum (*Kaemmpferia parviflora wallich*), Red Kwao Krua (*Butea superba*), and Gokshur (*Tribulus terrestris*) was found differences. The amount of the hormone 17MT in Krachai-dum, Red Kwao Krua, and Gokshur was 4.227, 0.152, and 0.179 microgram per milligram of herb extracts, respectively. Therefore, Krachai-dum was selected to test the growth performances in larval Nile tilapia for 21 days. The different concentrations of Krachai-dum were used to compare with synthetic hormones as a positive group and a negative control group that did not receive hormones. In this test, the experiment was done 3 times. In experiments 1 and 2, herb extracts mixed with a commercial feed at concentrations of 60, 90, and 120

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

milligrams per kilogram were used to compare with a control groups (a positive control group as synthetic hormone 17MT at 60 milligrams per kilogram and a control group that did not receive the hormone). The third experiment was used at concentrations of 60 and 90 milligrams per kilogram compared to both control groups. It was found that the survival rate and growth rate were lower in the group that received 17MT from Krachai-dum extract at a higher concentration. Experiments 1 and 2 found the highest survival rate and growth rate in the group that did not receive hormones. The third experiment found the highest survival rate and growth rate in the group that received 17MT from Krachai-dum extract. This trend of promoting growth traits in tilapia with herbal extracts at the larval stage compared to the control group that did not receive hormones also had a negative impact on survival and growth rate traits.

Keyword: 17 α -Methyltestosterone (17MT), Water flea, Nile tilapia, *Tribulus terrestris*, *Butea superba*, *Kaemmpferia parviflora wallich*

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถดำเนินมาได้จนลุล่วง และสำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์ จากรองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งตะวัน ยมหล้า อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้กรุณาสละเวลาเพื่อให้คำปรึกษาและ ข้อเสนอแนะซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังเป็นอย่างสูงที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ต่างๆ ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่คณะเทคโนโลยีการเกษตร ผู้ดูแลนักศึกษาปริญญาโท ที่ช่วยดูแลเรื่องเอกสาร ตลอดเวลาที่กำลังศึกษาอยู่ ผู้วิจัย

หวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่ได้ศึกษางานวิจัยนี้ ซึ่งหากงานวิจัยนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยต้องขออภัยมา ณ ที่นี้

นางสาวกัญชริกา พิลานพวง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และให้อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	3
1.3 สมมติฐานของการศึกษา.....	4
1.4 ขอบเขตการศึกษา.....	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ลักษณะทั่วไปของปลานิล.....	5
2.1.1 การพัฒนาของตัวอ่อน.....	6
2.1.2 การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์.....	9
2.1.2.1 การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย.....	9
2.1.2.2 การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้.....	10
2.2 ไรแดง (Water flea).....	11
2.3 การใช้ HPLC เพื่อการตรวจสอบปริมาณ 17MT และปริมาณ Phytosterol.....	15
2.3.1 การตรวจสอบปริมาณ 17MT.....	16
2.3.2 การตรวจสอบปริมาณ Phytosterol.....	18
2.4 การแปลงเพศปลานิลด้วย 17 α -Methyltestosterone (17MT).....	23
2.4.1 ความเข้มข้นของ 17MT ที่เหมาะสมในการแปลงเพศผู้ปลานิล.....	23
2.5 การศึกษาคุณลักษณะการเติบโตและการแปลงเพศผู้ด้วยสมุนไพร.....	26
2.5.1 หนามกระสุน (<i>T. terrestris</i>).....	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และแจ้งอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5.2 กวาวเครือแดง (<i>B. superba</i>).....	31
2.5.3 กระจ่างดำ (<i>K. parviflora wallich</i>)	33
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	37
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....	37
3.1.1 อุปกรณ์การเลี้ยง.....	37
3.1.2 อุปกรณ์การตรวจหา 17MT ในไรแดง.....	37
3.1.3 อุปกรณ์การเตรียมสารสกัดสมุนไพรมะเขือเทศ.....	37
3.1.4 อุปกรณ์การวิเคราะห์ HPLC.....	38
3.1.5 อุปกรณ์การเตรียมอาหาร.....	39
3.1.6 อุปกรณ์การทางจุลพยาธิวิทยา.....	39
3.2 การศึกษาปริมาณ 17MT ในไรแดงที่แช่ด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์.....	40
3.2.1 การเตรียมสารละลายฮอร์โมนสังเคราะห์ 17MT (Stock solution).....	40
3.2.2 การแช่ไรแดงด้วย 17MT.....	40
3.2.3 การเก็บตัวอย่างและเตรียมตัวอย่างสารสกัดไรแดง.....	40
3.2.4 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่และสารละลายมาตรฐาน (Standard solution).....	40
3.2.5 HPLC detection.....	41
3.2.6 การวิเคราะห์ปริมาณ 17MT ในไรแดง.....	41
3.3 การศึกษาปริมาณเทสโทสเตอโรนในสมุนไพรมะเขือเทศ.....	41
3.3.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรมะเขือเทศ.....	41
3.3.2 การเตรียมสารละลายฮอร์โมนสังเคราะห์ 17MT (Stock solution).....	41
3.3.3 การวิเคราะห์ HPLC.....	41
3.3.4 การวิเคราะห์และประเมินปริมาณเทสโทสเตอโรนในสารสกัดหนามกระสุน กระจ่างดำ และกวาวเครือแดง.....	42
3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรมะเขือเทศต่อคุณลักษณะการเติบโตในปลานิล.....	42
3.4.1 การเตรียมอาหารทดลอง.....	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง.....	42
3.4.3 การทดลอง.....	43
3.4.3.1 การทดลองที่ 1.....	43
3.4.3.2 การทดลองที่ 2.....	44
3.4.3.3 การทดลองที่ 3.....	45
3.4.4 การบันทึกผล.....	46
3.4.5 การวิเคราะห์ผล.....	49
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	51
4.1 การศึกษาปริมาณ 17MT ในไรแดงที่แช่ด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์.....	51
4.2 การศึกษาปริมาณเทสโทสเทอโรนในสมุนไพรมะขาม.....	54
4.3 การศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรมะขามต่อคุณลักษณะการเติบโตในปลานิล.....	56
4.3.1 การทดลองที่ 1.....	56
4.3.2 การทดลองที่ 2.....	60
4.3.3 การทดลองที่ 3.....	64
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	69
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	79
6.1 สรุปผลการทดลอง.....	79
6.2 ข้อเสนอแนะ.....	79
เอกสารอ้างอิง.....	80
ภาคผนวก.....	96
ภาคผนวก ก.....	97
ภาคผนวก ข.....	120
ประวัติผู้เขียน.....	123

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และทำซ้ำหรืออ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 คุณค่าทางโภชนาการของไรแดง.....	14
2.2 การวิเคราะห์ 17MT และ Phytosterol ด้วย HPLC.....	22
2.3 สายพันธุ์ปลานิล อายุลูกปลาเริ่มต้น วิธีการให้ฮอร์โมน ความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์ปลา เพศผู้.....	25
2.4 ข้อมูลชนิดสมุนไพร ส่วนของสมุนไพรที่ใช้ ชนิดปลา ความเข้มข้น และระยะเวลาในการใช้ ประโยชน์จากสมุนไพร.....	31
4.1 ปริมาณ 17MT ที่ในไรแดงที่แช่ด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 30 60 และ 420 นาที.....	51
4.2 ปริมาณ 17MT จากน้ำหลังการแช่ไรแดงที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 30 60 และ 420 นาที.....	52
4.3 ปริมาณสาร 17MT ที่ตรวจพบในสารสกัดกระชายดำ กวาวเครือแดง และหนามกระสุน.....	55
4.4 ปริมาณสารสกัดจากกระชายดำ กวาวเครือแดง และหนามกระสุน.....	55
4.5 ค่าคุณภาพน้ำในระบบทดลองแนวตั้งการทดลองที่ 1.....	59
4.6 ค่าคุณภาพน้ำในการทดลองครั้งที่ 2.....	63
4.7 ค่าคุณภาพน้ำในระบบทดลองแนวตั้งการทดลองครั้งที่ 3.....	67

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 การพัฒนาของตัวอ่อนระยะต่างๆ ของปลานิล <i>O.niloticus</i>	8
2.2 ไข่ปลาที่ระยะต่างๆ กัน.....	10
2.3 เนื้อเยื่อส่วนอวัยวะสืบพันธุ์ของปลานิลตัวผู้ที่โตเต็มวัย.....	11
2.4 วงจรชีวิตของไรแดง.....	13
2.5 โครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมน 17MT และ Testosterone (T).....	16
2.6 พิกการวิเคราะห์ฮอร์โมน 17MT (MT=17MT แล T=Testosterone).....	17
2.7 พิกการวิเคราะห์อาหารเปรียบเทียบกับอาหารผสมฮอร์โมน 17MT.....	17
2.8 โครมาโทแกรมการวิเคราะห์ฮอร์โมน 17MT.....	18
2.9 โครงสร้างทางเคมีของ Phytosterol.....	18
2.10 โครงสร้างทางเคมีของ Phytosterol, β -Sitosterol.....	19
2.11 โครงสร้างทางเคมีของ Phytosterol, β -Sitosterol, Campesterol, Stigmasterol, Brassicasterol, และ 6-Ketocholestanol (Internal standard; IS).....	19
2.12 โครมาโตกราฟีที่ได้จากสารละลายสเตอรอลมาตรฐานแบบผสมและมาตรฐานภายใน ด้วย HPLC-ECD.....	21
2.13 โครมาโตกราฟีที่ได้จากสารละลายสเตอรอลมาตรฐานแบบผสมและมาตรฐานภายใน ด้วย HPLC-FL.....	21
2.14 หนามกระสุน.....	27
2.15 กวาวเครือแดง.....	31
2.16 กระชายดำ.....	33
4.1 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน 17MT ช่วงความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	51
4.2 โครมาโทแกรม 17MT ในไรแดงที่การแช่ด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เวลาที่ 30, 60 และ 420 นาที.....	52
4.3 โครมาโทแกรม 17MT ในน้ำหลังการแช่ไรแดงที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เวลาที่ 30, 60 และ 420 นาที.....	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และเผยแพร่อย่างถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.4 Calibration curve ของสารมาตรฐาน 17MT ช่วงความเข้มข้น 1.25, 2.5, 5, 10, 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม.....	54
4.5 โคโรมาโทแกรมของสาร 17MT และสาร 17MT ในกระชายดำ กวาวเครือแดง และหนาม กระสุน.....	55
4.6 ทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy) โดยการ Spike สารมาตรฐาน 17MT ลงใน สารสกัดกระชายดำ.....	55
4.7 อัตรารอดของลูกปลานิลหลังสิ้นสุดการทดลองที่ 1.....	57
4.8 อัตราการเติบโตของลูกปลานิลหลังสิ้นสุดการทดลองที่ 1.....	58
4.9 น้ำหนักเฉลี่ยการทดลองที่ 1.....	59
4.10 ความยาวเฉลี่ยการทดลองที่ 1.....	60
4.11 อัตรารอดของลูกปลานิลหลังสิ้นสุดการทดลองที่ 2.....	61
4.12 อัตราการเติบโตของลูกปลานิลหลังสิ้นสุดการทดลองที่ 2.....	62
4.13 น้ำหนักเฉลี่ยการทดลองที่ 2.....	63
4.14 ความยาวเฉลี่ยการทดลองที่ 2.....	64
4.15 อัตรารอดของลูกปลานิลหลังสิ้นสุดการทดลองที่ 3.....	65
4.16 อัตราการเติบโตของลูกปลานิลหลังสิ้นสุดการทดลองที่ 3.....	66
4.17 น้ำหนักเฉลี่ยการทดลองที่ 3.....	67
4.18 ความยาวเฉลี่ยการทดลองที่ 3.....	68
5.1 โครงสร้างทางเคมีของ 17MT และ Phytosterol.....	70
5.2 เนื้อเยื่อตับการทดลองครั้งที่ 3.....	74
5.3 เนื้อเยื่อกลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม.....	75
5.4 เนื้อเยื่อส่วนอวัยวะสืบพันธุ์การทดลองที่ 1.....	77

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) จัดเป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจที่นิยมเลี้ยงอย่างแพร่หลายและความนิยมบริโภคปลานิลเพิ่มสูงขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2565 ปลานิลเป็นผลผลิตสูงสุดจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดและมีผลผลิตปลานิลมากถึง 269,394 ตัน (กรมประมง, 2565) และผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มสูงมากขึ้น (FAO, 2023) ในการผลิตปลานิลจะนิยมทำการเปลี่ยนเพศให้เป็นเพศผู้ เนื่องจากอัตราการเติบโตของปลานิลในเพศผู้สูงกว่าเพศเมีย และเพศผู้มีการเติบโตเร็วกว่าเพศเมียเกือบสองเท่า ซึ่งอาจเกิดจากความสามารถในการเติบโตทางสรีรวิทยาจำเพาะทางเพศ พฤติกรรมการอมไข่ในเพศเมียหรือพฤติกรรมการกินอาหารอย่างก้าวร้าวของเพศผู้ในปลานิล (Kembenya and Nyakwama, 2021) และ Mateen and Ahmed, (2015) รายงานว่าอัตราส่วนเฉลี่ยระหว่างเพศผู้และเพศเมียที่อัตราส่วนปกติอยู่ที่ 1:1 (51:49 เปอร์เซ็นต์) เนื่องจากลักษณะความแตกต่างของเนื้อ เยื่อรังไข่และอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้จะมีการปรากฏหลังการฟักออกจากไข่ (Yamamoto, 1969; Donaldson and Hunter, 1982) และการพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลานิล (Primordial germ cells; PGCs) ในช่วงที่อายุ 3 วันหลังจากการฟักออกจากไข่ (Park *et al.*, 2004; Nakamura, 2013) และในระหว่างการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เป็นช่วงที่มีความสำคัญต่อความแตกต่างทางเพศของอวัยวะสืบพันธุ์ (Nakamura *et al.*, 1998) ดังนั้นการแปลงเพศปลานิลเพื่อให้ได้เพศผู้ที่มีประสิทธิภาพลูกปลานิลควรอยู่ในระยะอายุ 3-5 วัน โดยการควบคุมลักษณะปรากฏทางเพศของนิยมนใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ (17α -Methyltestosterone) (Beardmore *et al.*, 2001) สามารถทำได้ด้วยการแช่ตัวอ่อนหรือผสมในอาหารให้กินในระยะตัวอ่อนด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์ (Donaldson and Hunter, 1982) โดยทั่วไปใช้วิธีการผสมฮอร์โมนสังเคราะห์อาหารที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ที่ระยะเวลาการให้อาหารผสมฮอร์โมนนาน 21 วัน ซึ่งพบสัดส่วนเพศผู้หลังการให้อาหารเพื่อแปลงเพศมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Marjani *et al.*, 2009; Celik *et al.*, 2011; Dergal *et al.*, 2016; Jensi *et al.*, 2016)

ในขณะที่ไรแดง *M. macrocopa* เป็นแพลงก์ตอนสัตว์น้ำจืดที่นิยมใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน (Das *et al.*, 2012) มีโปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน แร่ธาตุ กรดอะมิโน และกรดไขมันที่จำเป็นสูง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(New, 1998) ทำให้สัตว์น้ำวัยอ่อนที่ได้รับไรแดงเป็นอาหารพบว่ามียอดการรอดตายและอัตราการเติบโตสูง เนื่องจากการมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยมีโปรตีน 68.1-74.0 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 12.5 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 9.1-10.9 เปอร์เซ็นต์ (นุกูล แสงพันธุ์และคณะ. 2559ก) และนุกูล แสงพันธุ์และคณะ (2559ข) รายงานว่าไรแดงมีปริมาณโปรตีนสูงถึง 49.31-75.29 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณโปรตีนในอาร์ทีเมีย (53.7-60.5 เปอร์เซ็นต์) (Peykaran *et al.*, 2014)) และมีกรดไขมันที่จำเป็น 4.22 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้ง (Tamaru *et al.*, 1994) ซึ่งพบปริมาณโปรตีนของไรแดงมักจะเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 50 ของน้ำหนักแห้ง ในระยะตัวเต็มวัยมักมีปริมาณไขมันสูงกว่าในวัยอ่อน ปริมาณไขมันรวมต่อน้ำหนักแห้ง คือ ร้อยละ 20-27 ในตัวเต็มวัยเพศเมีย และร้อยละ 4-6 ในไรแดงวัยอ่อน (Rottmann *et al.*, 2017) นอกจากนี้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของไรแดงสูงกว่าในไรแดงสยามและไรแดงเล็กอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 13.7 ± 1.05 , 9.6 ± 1.05 และ 8.5 ± 0.77 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ตามลำดับ จึงใช้ไรแดงเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนแก่ปลาสวยงามและปลาเศรษฐกิจหลายชนิด (สันทนา ดวงสวัสดิ์, 2529)

โดยทั่วไปการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนใช้อาหารสำเร็จรูปเชิงพาณิชย์ เพราะความสะดวกต่อการให้อาหารและการคำนวณหาอัตราการให้อาหาร อาหารสำเร็จรูปเป็นอาหารที่ผสมวัตถุดิบครบถ้วนตามความต้องการของปลาในการนำไปสร้างเนื้อเยื่อของร่างกายและพลัง ในฟาร์มการผลิตและเลี้ยงปลานิธิใช้อาหารสำเร็จรูปผสมฮอร์โมนสังเคราะห์เพื่อเพิ่มผลผลิตจากการแปลงเพศผู้หรือการเป็นหมันของปลาทำให้ฟาร์มต่างๆ มีการใช้ฮอร์โมนปริมาณสูง ซึ่งจากผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นได้จากการใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์เพื่อการแปลงเพศสัตว์น้ำดังกล่าว ถึงแม้ว่าตามกลไกทางธรรมชาติ ทั้งแสงแดด อุณหภูมิ รวมทั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์มีส่วนในการย่อยสลายของฮอร์โมนสังเคราะห์ แต่อย่างไรก็ตามในบริเวณที่ปราศจากแสงแดดและอุณหภูมิต่ำอาจทำให้เกิดการสะสมของฮอร์โมนสังเคราะห์ นอกจากนี้ผลกระทบโดยตรงคือมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ และการเป็นหมัน (Fitzpatrick *et al.*, 2000) การใช้ฮอร์โมนในเกี่ยวกับกิจกรรมการแปลงเพศสัตว์น้ำในบ่อดินหรือในกระชัง อาจเกิดการสะสมในดินได้กว่า 3 เดือน อย่างไรก็ตามมีรายงานวิจัยที่มีการใช้ 17MT ที่ระดับความเข้มข้น 65 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพื่อแปลงเพศปลานิลนาน 28 วัน หลังจากหยุดอาหารแล้ว 60 วัน พบว่าระดับของ 17MT ในน้ำเหลือน้อยกว่า 0.16 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งไม่สามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของคนได้ (Dergal *et al.*, 2016) ขณะที่ Vinarukwong *et al.* (2018) รายงานว่าหลังจากการหยุดใช้ฮอร์โมน 6-8 เดือน เป็นระยะที่มีความปลอดภัยที่สุด การใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์เพื่อการแปลงเพศมีการใช้งานกันอย่างแพร่หลายจึงก่อให้เกิดความกังวลต่อความปลอดภัยทางด้านอาหารต่อผู้บริโภค และการตกค้างในธรรมชาติ (Megbowon and Mojekwu, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้มียางานการใช้สมุนไพรที่มีสารกลุ่มสเตียรอยด์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบสืบพันธุ์ ช่วยกระตุ้นความรู้สึกทางเพศและเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ (Aphrodisiac effect) อีกทั้งยังใช้เพื่อการต้านการหย่อนสมรรถภาพทางเพศในสัตว์ทดลอง (Kostova *et al.*, 2002; Mengumphan *et al.*, 2006; and Abarikwu *et al.*, 2020) รายงานการใช้สมุนไพรในการนำมาใช้ประโยชน์เพื่อการแปลงเพศในปลานิล เช่น หนามกระสุน *Tribulus terrestris* (Hassona *et al.*, 2020; Ghosal *et al.*, 2015; Ghosal *et al.*, 2016) ซึ่ง Hassona *et al.* (2020) รายงานว่าสารสกัดหนามกระสุนมีส่วนช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต เสริมสุขภาพ คุณภาพน้ำอสุจิ และประสิทธิภาพการทำงานของสเปิร์มในปลานิล รวมถึงสมุนไพรไทยอย่างกวาวเครือแดง (*Butea superba*) ซึ่ง Kiriyaakit, (2014) รายงานว่าการได้รับกวาวเครือแดงไม่ส่งผลต่ออัตราการเติบโตและอัตราการรอดในกลุ่มควบคุมและกลุ่มได้รับกวาวเครือแดง และกระชายดำ (*Kaempferia parviflora wallich*) ศึกษาผลในหนูทดลองพบว่าเมื่อผลต่อการสูบฉีดเลือดในหนูที่เพิ่มขึ้นและเพิ่มสูงขึ้นที่สุดหลังการให้สารสกัดกระชายดำ (Chaturapanich *et al.*, 2008) และกระชายดำถูกนำมาใช้ในการแพทย์แผนโบราณเพื่อรักษาอาการหย่อนสมรรถภาพทางเพศ โดยมีส่วนช่วยในกระบวนการแข่งขันตัวของอวัยวะสืบพันธุ์เพศชายได้ (Temkitthawon *et al.*, 2011) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสมุนไพรสามารถส่งเสริมการเติบโต การรอดชีวิต และเสริมสมรรถภาพทางเพศได้ ดังนั้นจึงเป็นที่มาของแนวทางการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรหนามกระสุน กวาวเครือแดง และกระชายดำ เพื่อศึกษาคุณลักษณะการเติบโตและสามารถประยุกต์ใช้ประโยชน์เพื่อการแปลงเพศในปลา อันจะมีส่วนในการช่วยลดผลกระทบของฮอร์โมนสังเคราะห์ต่อสิ่งแวดล้อม และอาจเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการผลิตปลานิลเพศผู้อย่างยั่งยืนในอนาคต

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

- (1) เพื่อการตรวจสอบหาปริมาณ 17MT ในไรแดงที่แช่ด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC
- (2) เพื่อศึกษาปริมาณเทสโทสเตอโรนในสมุนไพรชนิดต่างๆ คือ หนามกระสุน (*T. terrestris*) กวาวเครือแดง (*B. superba*) กระชายดำ (*K. parviflora wallich*) เปรียบเทียบกับฮอร์โมนสังเคราะห์ 17 α -Methyltestosterone
- (3) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพเทสโทสเตอโรนจากสมุนไพรที่มีปริมาณเทสโทสเตอโรนสูงสุดจากการศึกษาที่ 2. ในการแปลงเพศปลานิลให้เป็นเพศผู้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 สมมติฐานของการศึกษา

(1) ฮอโมนสังเคราะห์ 17MT เป็นฮอโมนที่ใช้ทั่วไปเพื่อการแปลงเพศผู้ในปลานิล และไรแดง เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ไรแดงที่แช่ฮอโมนสังเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นและเวลาที่ต่างกันย่อมตรวจพบปริมาณ 17MT ต่างกัน

(2) สมุนไพรหลายชนิดมีการใช้ประโยชน์เพื่อเป็นยาสมุนไพรที่ช่วยการส่งเสริมหรือบำรุงสุขภาพในเพศชายอย่างแพร่หลายตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบันทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ชนิดของสมุนไพรที่ต่างกันย่อมตรวจพบปริมาณ 17MT ต่างกัน

(3) จากการมีอยู่ของสารกลุ่มสเตียรอยด์ข้อที่ 2 จึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถใช้สมุนไพรเพื่อการแปลงเพศในปลานิลได้เช่นเดียวกับสารสเตียรอยด์สังเคราะห์ 17 α -Methyltestosterone เพื่อสามารถใช้ประโยชน์ในการแปลงเพศปลานิลทางเลือกได้จากสารสเตียรอยด์ที่ได้จากสมุนไพรอย่างเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและสามารถลดผลกระทบจากการใช้สารสเตียรอยด์สังเคราะห์ ซึ่งสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างกันย่อมส่งผลต่อการเติบโตที่ต่างกันด้วยเช่นกัน

1.4 ขอบเขตการศึกษา

การศึกษานี้จะศึกษาปริมาณของ 17MT ในไรแดงที่แช่ด้วยฮอโมนสังเคราะห์และในสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด คือ กวาวเครือแดง กระจ่างดำ และหนามกระสุนต่อคุณลักษณะการเติบโตในปลานิล ในการทดลองนั้นจะแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง การทดลองแรกจะตรวจสอบหาปริมาณของ 17MT ในไรแดงที่แช่ด้วยฮอโมนสังเคราะห์ การทดลองที่ 2 ตรวจสอบหาปริมาณสเตียรอยด์จากสารสกัดในสมุนไพรแต่ละชนิดโดยเปรียบเทียบกับฮอโมนสังเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC (High Performance Liquid Chromatography) หลังจากนั้นจะเลือกสมุนไพรที่มีปริมาณ 17MT สูงสุดมา 1 ชนิด เพื่อทำการทดลองที่ 3 คือการศึกษาสารสกัดสมุนไพรคุณลักษณะการเติบโตลูกปลานิล โดยจะทดสอบในลูกปลานิลอายุ 3-5 วัน ด้วยการสเปรย์สารสกัดผสมในอาหารเลี้ยงลูกปลานิล ระยะเวลาการได้รับสารสกัดนาน 21 วัน โดยควบคุมกับกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ได้รับฮอโมนสังเคราะห์ที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและกลุ่มที่ไม่ได้รับฮอโมนสังเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปลานิล (*O. niloticus*) จัดเป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจที่นิยมเลี้ยงอย่างแพร่หลายและความนิยมบริโภคปลานิลเพิ่มสูงขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2565 ปลานิลเป็นผลผลิตสูงสุดจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด และมีผลผลิตปลานิลมากถึง 269,394 ตัน (กรมประมง, 2565) และผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มสูงมากขึ้น ซึ่งในปี ค.ศ. 2015 และ 2021 มีผลผลิตสัตว์น้ำจืดรวมรวมอยู่ที่ 921.0 และ 989.9 พันตัน (FAO, 2023) การผลิตปลานิลจะนิยมทำการเปลี่ยนเพศให้เป็นเพศผู้ เนื่องจากอัตราการเติบโตของปลานิลในเพศผู้สูงกว่าเพศเมีย โดยทั่วไปการแปลงเพศปลานิลเพื่อให้ได้เพศผู้ที่มีประสิทธิภาพนิยมใช้ฮอร์โมนเพศชายสังเคราะห์ (17 α -Methyltestosterone) (Beardmore *et al.*, 2001)

การศึกษานี้จะศึกษาความเป็นไปได้ในการสกัดจากสมุนไพร หลายๆ ชนิด คือ กวาวเครือแดง กระชายดำ และหนามกระสุนต่อคุณลักษณะการเติบโตในปลานิล ในการทดลองนั้นจะแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ การทดลองแรก คือ การศึกษาปริมาณ 17MT ในไรแดงที่แช่ด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์ การทดลองที่ 2 คือ การศึกษาปริมาณเทสโทสเตอโรนในสมุนไพรชนิดต่างๆ คือ หนามกระสุน (*T. terrestris*) กวาวเครือแดง (*B. superba*) และกระชายดำ (*K. parviflora wallich*) เปรียบเทียบกับฮอร์โมนสังเคราะห์ 17MT และในการทดลองที่ 3 คือ การศึกษาประสิทธิภาพของเทสโทสเตอโรนจากสารสกัดสมุนไพรที่มีปริมาณเทสโทสเตอโรนสูงสุดจากการทดลองที่ 2 ในการศึกษาคุณลักษณะการเติบโตของปลานิลและสามารถประยุกต์ใช้ในการแปลงเพศเพศผู้ได้ในอนาคต

2.1 ลักษณะทั่วไปของปลานิล

ปลานิล ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *O. niloticus* ได้ถูกนำเข้ามาในประเทศไทยครั้งแรก โดยสมเด็จพระอริยวงศาคตญาณสมเด็จพระสังฆราชแห่งประเทศญี่ปุ่น จำนวน 50 ตัว มาทูลเกล้าฯ ถวายแด่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช เมื่อวันที่ 25 มีนาคม 2508 ในระยะแรกได้ทรงพระกรุณา โปรดเกล้าฯ ให้ปล่อยลงเลี้ยง ในบ่อดินเนื้อที่ประมาณ 10 ตารางเมตร ในบริเวณสวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ พระราชทานชื่อปลาชนิดนี้ว่า "ปลานิล" และได้พระราชทานปลานิล ขนาดยาว 3-5 เซนติเมตร จำนวน 10,000 ตัว ให้แก่ กรมประมงนำไปเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ที่แผนกทดลองและเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยง ในบริเวณเกษตรกลางบางเขนและที่สถานีประมงต่าง ๆ ทั่วพระราชอาณาจักร รวม 15 แห่ง (เรณู ว่องสว่าง, 2549)

ปลานิล เป็นปลาน้ำจืด อยู่ในตระกูล Cichlidae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *O. niloticus* (Linn.) มีถิ่นฐานเดิมแถบลุ่มน้ำในทวีปแอฟริกา มีริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาลและมีลาดพาดขวาง 9-10 แถบ ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล ตรงกลางเกล็ดมีสีเข้ม ปลานิลมีนิสัยชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง มีความอดทนและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี มีอุปนิสัยกินอาหารทั้งพืชและสัตว์ สามารถกินแพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ ซากอินทรีย์และอินทรีย์ที่เน่าเปื่อย รวมทั้งจุลินทรีย์และพืชน้ำต่างๆ ตามปกติรูปร่างภายนอกของปลานิลเพศผู้และเพศเมียจะมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก แต่จะสังเกตลักษณะเพศได้โดยการดูตั้งเพศ (Genital papillae) ที่บริเวณใกล้กับช่องทวาร โดยปลาเพศผู้จะมีตั้งเพศลักษณะเรียวยาวยื่นออกมา ปลาเพศเมียมีลักษณะตั้งเพศมีลักษณะค่อนข้างใหญ่และกลมมีรูช่วงกลางตั้ง ขนาดปลาที่จะแยกเพศได้ชัดเจนต้องเป็นปลาที่มีความยาวตั้งแต่ 10 เซนติเมตรขึ้นไป สำหรับปลาที่มีขนาดโตเต็มที่ที่สามารถสังเกตเพศได้ด้วยการดูสีที่ลำตัว โดยสีบริเวณใต้คางและลำตัวของปลาเพศผู้จะมีสีเข้มกว่าปลาเพศเมีย เมื่อถึงช่วงผสมพันธุ์สีจะยิ่งเข้มยิ่งขึ้น นอกจากนี้ ในปลาวัยเดียวกัน ปลานิลเพศผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าปลาเพศเมีย

2.1.1 การพัฒนาของตัวอ่อน

การพัฒนาของตัวอ่อนปลานิลจะมีการเริ่มต้นหลังการปฏิสนธิ ซึ่งมีการแบ่งระยะ 9 ระยะ ตามการแบ่งระยะของ Fujimura and Okada (2007) ดังนี้

(1) ระยะไซโกต (Zygote period; stage 1) หลังการปฏิสนธิ 0-1.5 ชั่วโมง มีจำนวน 1 เซลล์ และมีลักษณะเฉพาะด้วยการสะสมของไซโตพลาสซึมเพื่อสร้างบลาสโตดิสก์ (Blastodisc) และการปรากฏตัวของเพริวิทลลีน (Perivitelline) ที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 2.1; A)

(2) ระยะคลีเวจ (Cleavage period) หลังการปฏิสนธิ 1.5-4 ชั่วโมง เป็นระยะที่มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจาก 2 เซลล์ไป 16 เซลล์ ประกอบด้วย 4 ระยะ คือ ระยะที่ 2-5 (ภาพที่ 2.1; Ba-Bd) มีลักษณะเฉพาะ คือ การแบ่งไมโทติก (Mitotic) ที่แตกต่างกัน ส่งผลให้เกิดบลาสโตเมียร์ (Blastomeres) จำนวนมาก

(3) ระยะบลาสตูลา (Blastula period) หลังการปฏิสนธิ 4-22 ชั่วโมง ประกอบด้วย 3 ระยะ คือ ระยะที่ 6-8 (ภาพที่ 2.1; Ca-Cc) ระยะบลาสตูลามีลักษณะเฉพาะ คือ ชั้นบลาสโต

เดิร์ม (Blastoderm) ที่แตกต่างกัน 2 ชั้น คือ ชั้นห่อหุ้มด้านนอก (Outer enveloping layer) และ ชั้นซินไซเทียล ซึ่งเป็นไข่แดงส่วนปลาย (Peripheral yolk syncytial layer)

(4) ระยะแกสทรูลา (Gastrula period) หลังการปฏิสนธิ 22–26 ชั่วโมง ประกอบด้วยระยะเดียว คือระยะที่ 9 (ภาพที่ 2.1; D) มีลักษณะพิเศษ คือ การมีวงแหวนอยู่รอบขอบของบลาสโตเดิร์ม (Blastoderm) และเกราะป้องกันตัวอ่อน (Embryonic shield) ซึ่งจะมีการขยายจากวงแหวนไปทางขั้วของตัวอ่อนเพื่อสร้างท่อประสาท

(5) ระยะเซกเมนเทชันหรือระยะการแบ่งส่วน (Segmentation period) หลังการปฏิสนธิ 26–48 ชั่วโมง ประกอบด้วย 4 ระยะ คือ ระยะที่ 10–13 (ภาพที่ 2.1: Ea-Ed) ซึ่งพบว่ามีลักษณะเฉพาะ คือ การก่อตัวของโซไมต์ (Somite) และสมองเริ่มมีการแบ่งส่วน

(6) ระยะฟาริงกูลา (Pharyngula period) หลังการปฏิสนธิ 48–90 ชั่วโมง ประกอบด้วย 3 ระยะ คือ ระยะที่ 14–16 (ภาพที่ 2.1; Fa-Fc) มีลักษณะเฉพาะ คือ มีการปรากฏของ Pharyngeal arches ในช่วงระยะแรกเกิด (Primordia)

(7) ระยะฟักไข่ (Hatching period) หลังการปฏิสนธิ 90–120 ชั่วโมง ประกอบด้วย 2 ระยะ คือ ระยะที่ 17-18 (ภาพที่ 2.1; Ga-Gb) ซึ่งไข่ปลาส่วนใหญ่ฟักออกมาในระยะที่ 17 (5 วันหลังการปฏิสนธิ) แม้ว่าไข่บางฟองจะฟักออกมาเร็วกว่าที่ระยะ 15 (4 วันหลังการปฏิสนธิ) หรือหลังจากนั้นในระยะที่ 18 (6 วันหลังการปฏิสนธิ) ระยะฟักไข่มีลักษณะเป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงร่างปลา

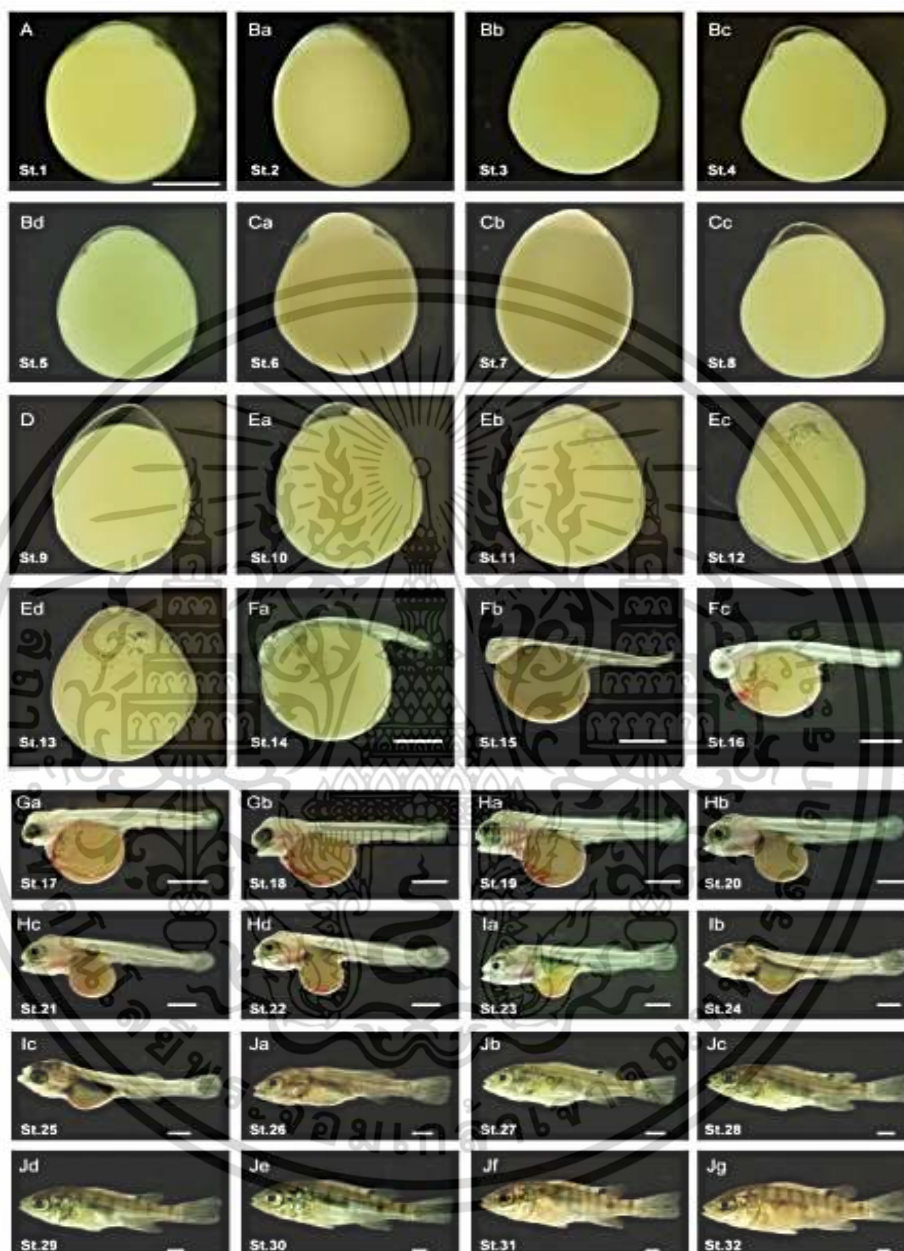
(8) ระยะตัวอ่อน Larval: การพัฒนาตัวอ่อนเริ่มต้นหลังจากระยะฟักไข่และเป็นระยะเริ่มมีการดูดซึมไข่แดง (ระยะที่ 19–25) การพัฒนาตัวอ่อนแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ ตัวอ่อนระยะแรกและตัวอ่อนระยะปลาย ตัวอ่อนระยะแรกประกอบด้วย 4 ระยะ คือ ระยะที่ 19–22 (ภาพที่ 2.1; Ha-Hd) ตัวอ่อนระยะนี้เริ่มค่อยๆ ขยับกราม Opercular flaps และครีบอก (Pectoral fin) ระยะตัวอ่อนตอนปลายประกอบด้วย 3 ระยะ ระยะที่ 23–25 (ภาพที่ 2.1; Ia-Ic) ระยะตัวอ่อนตอนปลายมีลักษณะเฉพาะ คือ การพองตัวของถุงลมว่ายน้ำ (Swimbladder) และการทำงานของโครงกระดูกในระยะแรกเริ่ม ก่อนเริ่มการให้อาหารจากภายนอก

(9) ระยะตัวอ่อนหรือวัยอ่อน Juvenile: การพัฒนาของตัวอ่อนเริ่มต้นด้วยการดูดซึมไข่แดงเป็นอาหารและจนกระทั่งเริ่มมีเจริญเติบโตเต็มของเซลล์สืบพันธุ์ คือ ระยะที่ 26–32 (ภาพที่ 2.1; Ja-Jg) ในช่วงวัยอ่อนตอนต้น มีลักษณะเฉพาะ คือ การเริ่มให้อาหารจากภายนอกและการปรากฏตัวของ 'จุดปลานิล' คือ สีเฉพาะของปลานิลในวัยอ่อนที่อยู่ตรงกลางครีบหลัง (Barel *et al.*

1977; Holden and Bruton, 1992) ในวัยอ่อนช่วงปลายจุดปลานิลจะค่อยๆ หายไปที่ประมาณ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

100 วันหลังการปฏิสนธิ ซึ่งอาจมาพร้อมกับการเจริญเต็มที่ของเซลล์สืบพันธุ์ (Nakamura and Nagahama, 1985) ซึ่งทั่วไปแล้วปลาทัวผู้จะพัฒนาได้เร็วกว่าปลาทัวเมีย



ภาพที่ 2.1 การพัฒนาของตัวอ่อนระยะต่างๆ ของปลานิล *O. niloticus* (A=Zygote, Ba-Bd= Cleavage, Ca-Cc=Blastula, D=Gastula, Ea-Ed=Segmentation, Fa-Fc= Pharyngula, Ga-Gb=Hatching, Ha-Ic=Larval และ Ja-Jg=Juvenile)

ที่มา: Fujimura and Okad (2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์

การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonad) ของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด (Primordial germ cells; PGC) เมื่ออวัยวะสืบพันธุ์มีการพัฒนาสมบูรณ์จะสามารถแยกเพศลูกปลาด้วยความแตกต่างของเพศเมียด้วยเซลล์ไข่ (Oocyte หรือ Ovary) และเพศผู้ด้วยอสุจิ (Sperm) หรือพบท่อนำอสุจิ (Seminiferous tubules) เป็นต้น ซึ่ง El-Greisy and El-Gamal (2012) รายงานว่าตำแหน่งของอวัยวะสืบพันธุ์แรกเริ่มของลูกปลานิลที่อายุระหว่าง 15-35 วัน โดยตำแหน่งที่พบจะอยู่บริเวณระหว่างลำไส้ (Gut) กับไต (Kidney) นอกจากนี้ อานุกาพ วรณคณาพล (2563) รายงานว่าอวัยวะสืบพันธุ์ปลาเป็นแบบ Tubular โดยอยู่ต่ำกว่าไตและกระดูกสันหลังตามลำดับ มีลักษณะเป็นเส้นยาว 2 พู พื้นผิวเรียบ อยู่ภายในตัวปลา ติดกับช่องท้องส่วนบนทอดยาวไปจนถึงส่วนท้าย (หัวไปหาง) ของช่องท้องไปเปิดที่ตึงเพศ (Urogenital papilla) ตรงส่วนปลายเรียกว่าช่องเพศ (Urogenital pore) อยู่ใกล้กับทวารหนัก (Anus)

2.1.2.1 การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย

การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (Ovary) แบ่งออกเป็น 6 ระยะ ตามการแบ่งระยะของ Jarimopas *et al.* (1994) และ ปวีณา กิจสวัสดิ์ (2530) ดังนี้

ระยะที่ 1 (Oocyte stage 1; Oogonia) เซลล์ไข่ระยะแรกเริ่มเรียกว่า Oogonia พบเป็นเซลล์ขนาดเล็ก มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันล้อมรอบ มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ บริเวณกลางเซลล์ส่วน Cytoplasm ติดสีชมพู

ระยะที่ 2 (Oocyte stage 2) เซลล์ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น cytoplasm ติดสีน้ำเงินเข้ม พบนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีการติดสีชมพูจางกว่า Cytoplasm ยังไม่มีการพัฒนาของเซลล์เยื่อ Follicular (Follicular cell) เริ่มพบ Nucleolus ในนิวเคลียส

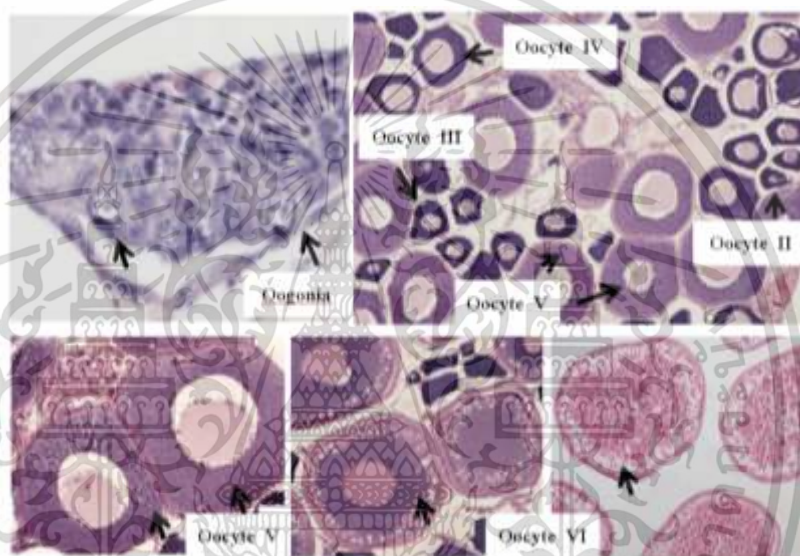
ระยะที่ 3 (Oocyte stage 3) เซลล์ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น นิวเคลียสเริ่มเคลื่อนไปอยู่ด้านใดด้านหนึ่ง มีการพัฒนาของ Follicular cell เริ่มพบ Provitelline nucleoli กระจายทั่วเป็นจุดในนิวเคลียส

ระยะที่ 4 (Oocyte stage 4) เซลล์ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น พบ Provitelline nucleoli เคลื่อนไปอยู่บริเวณขอบนิวเคลียส นิวเคลียสยังติดสีชมพู และ Cytoplasm ติดสีน้ำเงินจางลงเมื่อเทียบกับระยะที่ 2 และ 3 เริ่มเห็น Yolk granule และ Fat vacuole และ Nucleoli มีการหดเล็กลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะที่ 5 (Oocyte stage 5) เซลล์ไ้ระยะนี้จะพบ Yolk granule ติดสีชมพู และพบ Fat vacuole มีการเพิ่มมากขึ้นในบริเวณขอบ Cytoplasm นิวเคลียสยังติดสีชมพูเห็นชัดเจน

ระยะที่ 6 (Oocyte stage 6) เซลล์ไ้ระยะนี้จะพบ Yolk granule ที่มีขนาดใหญ่มากขึ้นและติดสีชมพูเข้มขึ้นในส่วน Cytoplasm กระจายทั่วใน Fat vacuole นิวเคลียสติดสีชมพูและมีขนาดเล็กลง ส่วนผนังล้อมรอบเซลล์ไ้หนาไม่เท่ากัน แต่ยังคงเห็น Zona radiate, follicular และ Theca ชัดเจน



ภาพที่ 2.2 ไ้ปลาที่ระยะต่างๆ กัน
ที่มา: ดัดแปลงจาก Zhao *et al.* (2023)

2.1.2.2 การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (Testis) แบ่งออกเป็น 5 ระยะ ตามการแบ่งระยะของ Billard (1986) และ Jarimopas *et al.* (1994) ดังนี้

ระยะที่ 1 (Spermatogonia) เป็น Germ cell ขนาดใหญ่ เกิดขึ้นใน Gonadallamella นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ cytoplasm ติดสีชมพู

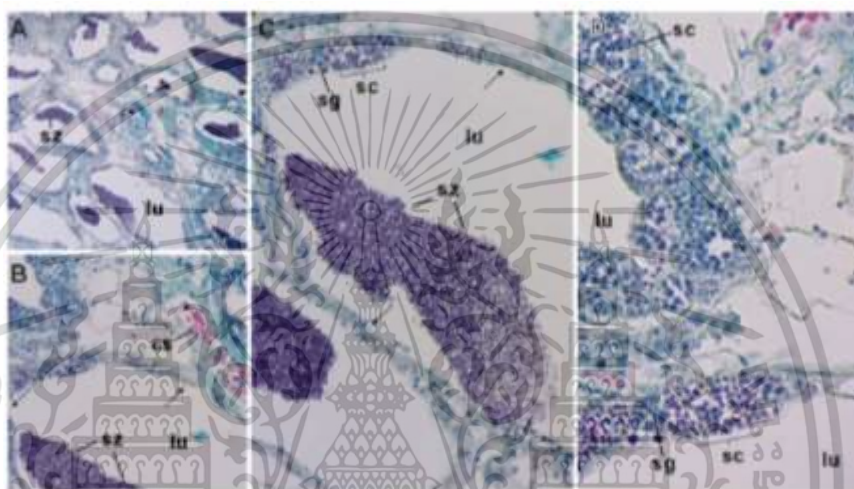
ระยะที่ 2 (Primary spermatocyte) เซลล์มีขนาดเล็กและติดสีเข้มกว่า Spermatogonia ภายในนิวเคลียสพบกลุ่ม Chromatin ติดสีน้ำเงินเข้ม
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะที่ 3 (Secondary spermatocyte) เซลล์มีขนาดเล็กกลาง

Chromatin ติดสีน้ำเข้ม มีจำนวนมากกว่า Primary spermatocyte

ระยะที่ 4 (Spermatid) เป็นระยะที่เกิดการแบ่งเซลล์ของ Secondary spermatocyte ซึ่งมีขนาดเล็กกลาง Chromatin ติดสีน้ำเงินทึบ

ระยะที่ 5 (Spermatozoa; sperm) เป็นระยะที่ Spermatid จะมีการเปลี่ยนรูปร่างไปเป็น Spermatozoa โดยไม่มีการแบ่งเซลล์ แต่มีหางเกิดขึ้น



ภาพที่ 2.3 เนื้อเยื่อส่วนอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาน้ำจืดตัวผู้โตเต็มวัย A-D: แสดงการขยายขนาดและรายละเอียดต่างๆ ที่กำลังขยายต่างกัน (lu, Lumen ในท่อ Seminiferous tubule; sc, Spermatocyte; sg, Spermatogonia; sz, Sperm; cs, Blood cells; ↑, Germline epithelium ที่เชื่อมต่อกับ Spermatocyte; ที่ย้อมด้วย Hematoxylin และ Gomori trichrome)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Pacheco *et al.* (2021)

2.2 ไโรแดง (Water flea)

ไโรแดง (*Moina* spp.) เป็นแพลงก์ตอนขนาดใหญ่ในกลุ่มครัสเตเชีย (Crustacean) สามารถอยู่รอดและพบได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อย ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 5-30 องศาเซลเซียส และที่ค่า pH กลางจนถึงต่ำเล็กน้อย (Ivleva, 1973) และ กมลศิริ พันธนิยะ (2555) ไโรแดงเป็นสัตว์น้ำที่มีขนาดเล็กมากและสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยมีการลำดับอนุกรมวิธานดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Classification

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Branchiopoda (Phyllopoða)

Order Cladocera (Water fleas)

Suborder Calyptomera

Family Daphnidae

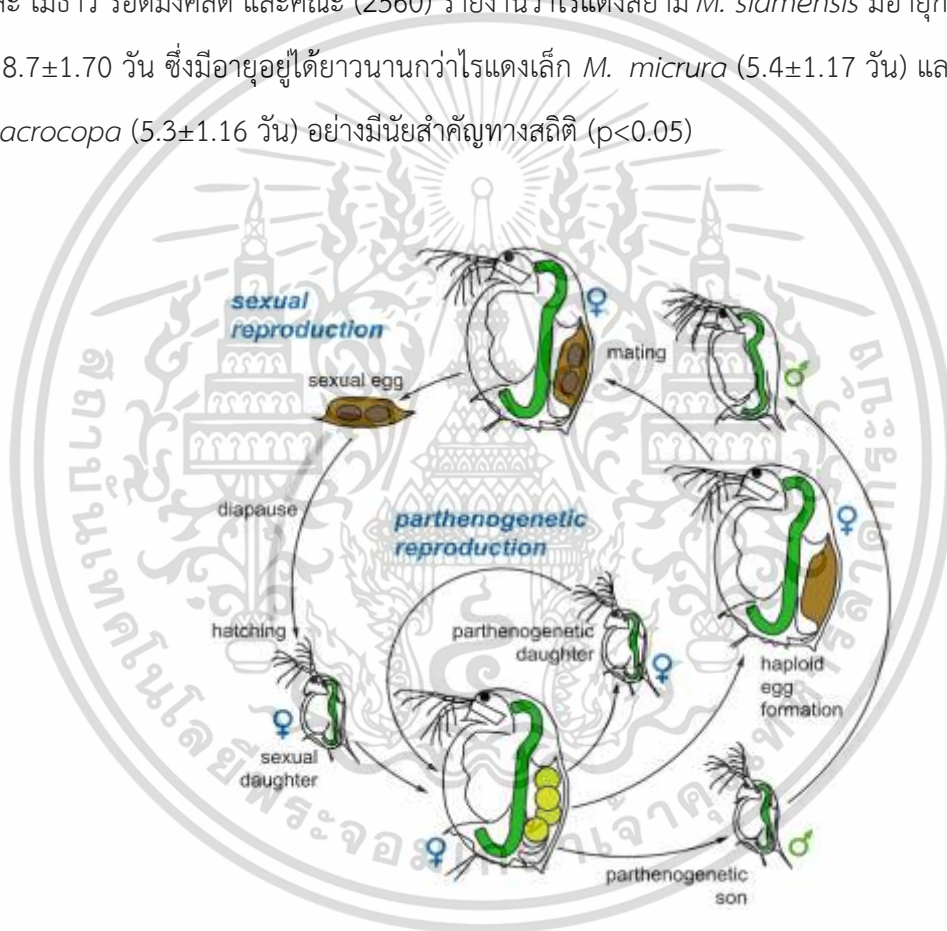
Genus Moina

Edmondson (1966)

ตัวอ่อนไรแดงที่ออกมาจากถุงเก็บไข่ (Brood chamber) จะมีขนาด 0.5 มิลลิเมตร ลักษณะทั่วไปของไรแดง ส่วนหัวกว้าง มีตารวมขนาดใหญ่ มีแอ่งที่บริเวณซอกคอ (Cervical sinus) หนองคู่แรกมีขนาดใหญ่สั้นไม่แบ่งเป็นปล้อง ปลายหนวดมีขนาดเล็กๆ 5-6 เส้นตรงเกือบกึ่งกลางมีขนรับความรู้สึก (Sense hair) 1 เส้น และหนวดคู่ที่ 2 มีขนาดใหญ่ ตรงปลายแบ่งเป็น 2 แขนง แต่ละแขนงมี 3 ปล้องขนาดเท่าๆกัน ลำตัวมีเปลือกหรือฝาคลุมแบบ 2 ฝาประกบกัน ส่วนฝาด้านท้องมีหนามเล็กๆ ที่ท้องส่วนท้าย (Post abdomen) มีหนาม (Spine) เรียงกันเป็นแถว 9 อัน หนามอันแรกที่อยู่ใกล้ฐานของท้องส่วนท้าย หนามมีขนาดใหญ่ ปลายแยกเป็น 2 แฉก เรียกว่า ไบเดนท์ (Bident) และในไรแดงเพศผู้ ขาคู่แรกลักษณะงอเป็นตะขอ (Hook) หนวดคู่แรกมีขนาดเล็กและยาวกว่าเพศเมีย ปลายหนวดที่มีขนาดเล็กๆ จะมีตะขอเล็กอยู่ประมาณ 5 อัน ไรแดงเพศเมียตัวโตเต็มวัยส่วนมากจะเห็นตัวอ่อน หรือไข่ที่กำลังเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนอยู่ภายในถุงเก็บตัวอ่อนประมาณ 7-10 ตัว ในสภาวะปกติจะมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Parthenogenesis) (กมลศิริ พันธนีละ, 2555)

นุกูล แสงพันธุ์ และคณะ (2559) ศึกษาและเพาะเลี้ยงไรแดงที่พบในไทย ได้แก่ ไรแดงสยาม (*Moina siamensis*) ซึ่งเป็นไรแดงในสกุลเดียวกับไรแดง (*Moina macrocopa*) ไรแดงเล็ก (*Moina micrura* Kurz) และไรแดงเทศ (*Daphnia magna* Straus) โดยจากการศึกษาวงจรชีวิตของไรแดงตัวอ่อนจะเจริญเติบโตโดยวิธีการลอกคราบ และเมื่อโตเต็มวัยในเพศเมียจะสร้างไข่ที่มีโครโมโซมเป็น diploid (2n) ซึ่งไม่ได้รับการผสมพันธุ์จากเพศผู้ และถูกเก็บไว้ในผนังของถุงไข่ที่ด้านหลังของลำตัว ตัวอ่อนจะเจริญเป็นเพศเมีย การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะดำเนินต่อไปจนกระทั่งสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมกับการดำรงชีวิต เช่น อาหารลดลง จำนวนประชากรมากเกินไป อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงไป หรือแหล่งน้ำที่อาศัยเริ่มแห้ง การสืบพันธุ์จึงสลับไปเป็นแบบอาศัยเพศ โดยเพศเมียจะผลิตไข่ที่เจริญเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปเป็นเพศผู้และเพศเมีย และเพศเมียจะผลิตไข่ที่มีโครโมโซมเป็น Haploid (n) เมื่อมีการผสมพันธุ์กับเพศผู้จะได้ไข่พัก (Resting egg) ไข่ที่ได้รับการผสมจะมีขนาดใหญ่และมีเพียง 1-2 ฟอง มีเปลือกหนาห่อหุ้ม และตัวอ่อนที่อยู่ภายในจะแบ่งตัวจนถึงระยะแกสทรูล่า (Gastrula) จึงหยุดการแบ่งตัวชั่วคราว และไข่ในระยะนี้สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี เมื่อสภาพแวดล้อมมีความเหมาะสมไข่ที่อยู่ในระยะพักจะฟักเป็นตัวอ่อนและเจริญเติบโตต่อไป (ภาพที่ 2.4) ไรแดงมีการพัฒนาวงจรชีวิตในระยะแรกยังไม่สมบูรณ์ มีการเจริญเติบโตที่เร็วและจากระยะตัวอ่อนจนเป็นตัวเต็มวัยใช้เวลาเพียง 48-60 ชั่วโมง และมีวงจรชีวิตสั้น สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เพียง 4-6 วัน (วิรัตดา สีตะสิทธิ์, 2544) และ เมธาวี รอตมมงคลดี และคณะ (2560) รายงานว่าไรแดงสยาม *M. siamensis* มีอายุการดำรงชีวิตที่ 8.7 ± 1.70 วัน ซึ่งมีอายุอยู่ได้ยาวนานกว่าไรแดงเล็ก *M. micrura* (5.4 ± 1.17 วัน) และไรแดง *M. macrocopa* (5.3 ± 1.16 วัน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 2.4 วงจรชีวิตของไรแดง

ที่มา : Ebert (2022)

ไรแดง *M. macrocopa* เป็นแมลงก่ตอนสัตว์น้ำจืดที่นิยมใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน (Das et al., 2012) มีโปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน แร่ธาตุ กรดอะมิโน และกรดไขมันที่จำเป็นสูง (New, 1998) ทำให้สัตว์น้ำวัยอ่อนที่ได้รับไรแดงเป็นอาหารมีอัตราการรอดตายและอัตราการเติบโตสูง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยมีปริมาณโปรตีน 68.1-74.0 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 12.5 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 9.1-10.9 เปอร์เซ็นต์ (นุกูล แสงพันธ์ุ และคณะ. 2559ก) และนุกูล แสงพันธ์ุ และคณะ (2559ข) รายงานว่าในไรแดงมีปริมาณโปรตีนสูงถึง 49.31-75.29 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณโปรตีนในอาร์ทีเมีย (53.7-60.5 เปอร์เซ็นต์) (Peykaran *et al.*, 2014)) และมีกรดไขมันที่จำเป็น 4.22 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง (Tamaru *et al.*, 1994) และ Manklinniam *et al.*, (2018) รายงานว่าในไรแดง *M. macrocopa* มีปริมาณโปรตีนอยู่ที่ 76.26 ± 2.84 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรตอยู่ที่ 14.56 ± 3.04 เปอร์เซ็นต์ และไขมันอยู่ที่ 11.83 ± 0.87 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปริมาณของสารอาหารในไรแดงจะแตกต่างกันไปมากขึ้นขึ้นอยู่กับอายุและประเภทของอาหารที่ไรแดงได้รับ แต่ปริมาณโปรตีนของ ไรแดงมักจะเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 50 ของน้ำหนักแห้ง ในระยะตัวเต็มวัยมักมีปริมาณไขมันสูงกว่าในวัยอ่อน ปริมาณไขมันรวมต่อน้ำหนักแห้ง คือ ร้อยละ 20-27 ในตัวเต็มวัยเพศเมีย และร้อยละ 4-6 ในวัยอ่อน (Rottmann *et al.*, 2017) นอกจากนี้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของไรแดง *M. macrocopa* สูงกว่าใน ไรแดงสยามและไรแดงเล็กอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) พบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 13.7 ± 1.05 , 9.6 ± 1.05 และ 8.5 ± 0.77 เปอร์เซ็นต์ต่อวันตามลำดับ จึงนิยมใช้ไรแดงเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน ทั้งในปลาสวยงามและปลาเศรษฐกิจหลายชนิด (สันทนา ดวงสวัสดิ์, 2529) (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางโภชนาการของไรแดง

โปรตีน	คาร์โบไฮเดรต	ไขมัน	อ้างอิง
68.1-74.0 (%)	12.5 (%)	9.1-10.9 (%)	นุกูล แสงพันธ์ุ และคณะ (2559ก)
49.31-75.29 (%)	NA	NA	นุกูล แสงพันธ์ุ และคณะ (2559ข)
50 (%/ต่อน้ำหนักแห้ง)	NA	20-27 (%/ต่อน้ำหนักแห้ง)	Rottmann <i>et al.</i> , (2017)
76.26 ± 2.84 (%)	14.56 ± 3.04 (%)	11.83 ± 0.87 (%)	Manklinniam <i>et al.</i> , (2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การใช้ HPLC เพื่อการตรวจสอบปริมาณ 17MT และปริมาณ Phytosterol

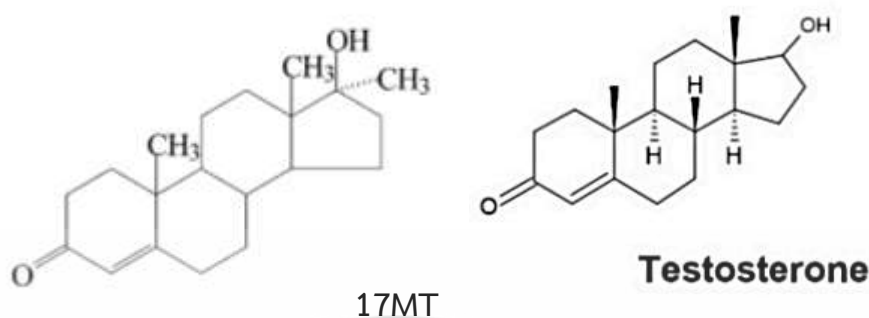
ปัจจุบันการแปลงเพศปลาด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์ 17MT เป็นวิธีการที่นิยมกันอย่างแพร่หลายในการเพิ่มผลผลิตปลาของเกษตรกร แต่การใช้ฮอร์โมนสเตียรอยด์สังเคราะห์เหล่านี้ ก่อให้เกิดความกังวลต่อความปลอดภัยของผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม (พุทธรัตน์ เบ้าประเสริฐกุล และคณะ. 2556) การตรวจสอบ 17MT มีหลายเทคนิคในการตรวจสอบ เช่น การศึกษาของพุทธรัตน์ เบ้าประเสริฐกุล และคณะ (2556) ใช้เทคนิค HPLC และ LC-MS/MS ในการวิเคราะห์ฮอร์โมน 17MT ในตัวอย่างน้ำ และเนื้อปลา ทราย ยี่นปิง และคณะ (2554) วิเคราะห์ปริมาณของฮอร์โมน 17MT ที่มีการตกค้างในน้ำ ด้วยวิธี ECLIA (Electrochemiluminescence immunoassay) และวิเคราะห์ปริมาณของฮอร์โมน 17MT ที่สะสมในเนื้อปลา ด้วยวิธี HPLC (High performance liquid chromatography) เป็นต้น

HPLC คือ เครื่องมือสำหรับการแยกและวิเคราะห์สารประกอบที่ผสมอยู่ในตัวอย่างซึ่งอาศัยหลักการความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบบนเฟสคงที่ (Stationary phase) โดยมีเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นตัวพา โดยสารแต่ละชนิดจะถูกแยกออกมาเป็นส่วนๆ ในเวลาที่ต่างกัน สารที่แยกออกมาแต่ละชนิดจากคอลัมน์จะผ่านเข้าสู่อุปกรณ์ตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัด (Detector) สัญญาณที่บันทึกได้จะถูกแปลผลออกมาในรูปโครมาโทแกรม (Chromatogram) โดยมีลักษณะเป็นพีค (Peak) ในการวิเคราะห์ผลจะได้จากการนำพื้นที่ใต้พีค (Area) ในแต่ละสารตัวอย่างมาคำนวณผลโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) จะทราบถึงปริมาณของสารตัวอย่าง เครื่อง HPLC สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพ (Qualitative analysis) และเชิงปริมาณ (Quantitative Analysis) นิยมใช้วิเคราะห์สารประกอบที่มีระเหยยาก (Low volatile substitution) หรือมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (High molecular weight compounds) โดยสามารถใช้กับงานด้านต่างๆ เช่น วิเคราะห์หาปริมาณวิตามิน กรดอะมิโน น้ำตาล สารกระตุ้น ยาปฏิชีวนะ และยาฆ่าแมลง เป็นต้น

ซึ่งในการวิเคราะห์ด้วย HPLC นั้นสามารถวิเคราะห์ได้จากคอลัมน์และเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) แตกต่างกัน ซึ่งจากการศึกษาข้อมูล ชนิด ความยาว และความกว้างของคอลัมน์ที่ใช้จะมีความแตกต่างกัน ส่วนเฟสเคลื่อนที่ที่มีการใช้เป็นส่วนใหญ่ คือ Acetonitrile และในแต่ละการศึกษาจะมีความแตกต่างกันของอัตราส่วนที่ใช้ในการของเฟสเคลื่อนที่ ขนาดคอลัมน์ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน อุณหภูมิ ความยาวคลื่น ปริมาตรที่ใช้ฉีด และอัตราไหลที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 การตรวจสอบปริมาณ 17MT



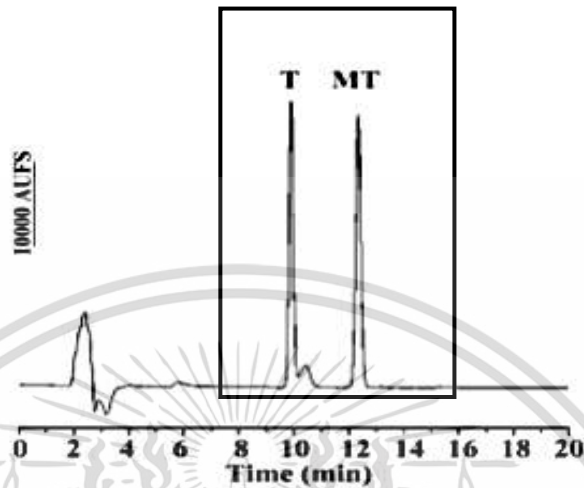
ภาพที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมน 17MT และ Testosterone (T)

ที่มา: Chu *et al.* (2006) และดัดแปลงจาก Nunes *et al.* (2022)

การศึกษาของ Barbosa *et al.* (2013) ตรวจสอบฮอร์โมน 17MT และ Testosterone โดยใช้ C_{18} reverse phase column กับเฟสเคลื่อนที่เป็น Acetonitrile : Ultrapure water (60:40 v/v) ที่อัตราไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร และปริมาตรฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน เท่ากับ 50-2000 ไมโครกรัมต่อลิตร พบพีคที่ปรากฏตรงกับกราฟมาตรฐานที่ระยะเวลาใกล้เคียงกัน คือ 10 และ 12 นาที (ภาพที่ 2.6) สอดคล้องกับการศึกษาของ Marwah *et al.* (2005) ทำการตรวจสอบฮอร์โมน 17MT โดยใช้ Zorbax-SB C_{18} column กับเฟสเคลื่อนที่เป็น Acetonitrile : Water (20:80 v/v) ที่อัตราไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร และปริมาตรที่ใช้ฉีดเท่ากับ 5 ไมโครลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน เท่ากับ 0.75, 1.5, 3.0, 4.5 และ 6.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบพีคตัวอย่างที่ตรงกับกราฟมาตรฐานที่ระยะเวลาใกล้เคียงกัน คือ 12 นาที (ภาพที่ 2.7)

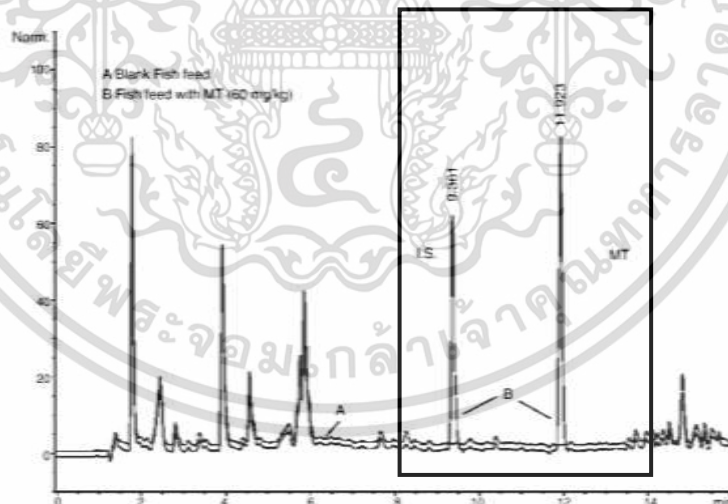
แต่อย่างไรก็ตามผลเวลาที่พบพีคจากโครมาโทแกรมการศึกษาของการศึกษาของพุทธรัตน์ บำประเสริฐกุล และคณะ (2556) ตรวจสอบฮอร์โมน 17MT โดยใช้ Sunfire C_{18} reverse phase column กับเฟสเคลื่อนที่เป็น Acetonitrile: Milli-Q water (60:40 v/v) ที่อัตราไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร และปริมาตรที่ใช้ฉีดเท่ากับ 20

ไมโครลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน เท่ากับ 0.005, 0.01, 0.1 0.25, 0.5 และ 1 พีพีเอ็ม ซึ่งพบพีคของตัวอย่างที่เวลา 4.7-4.8 นาที (ภาพที่ 2.8)



ภาพที่ 2.6 โครมาโทแกรมการวิเคราะห์ฮอร์โมน (MT=17MT) และ (T=Testosterone)

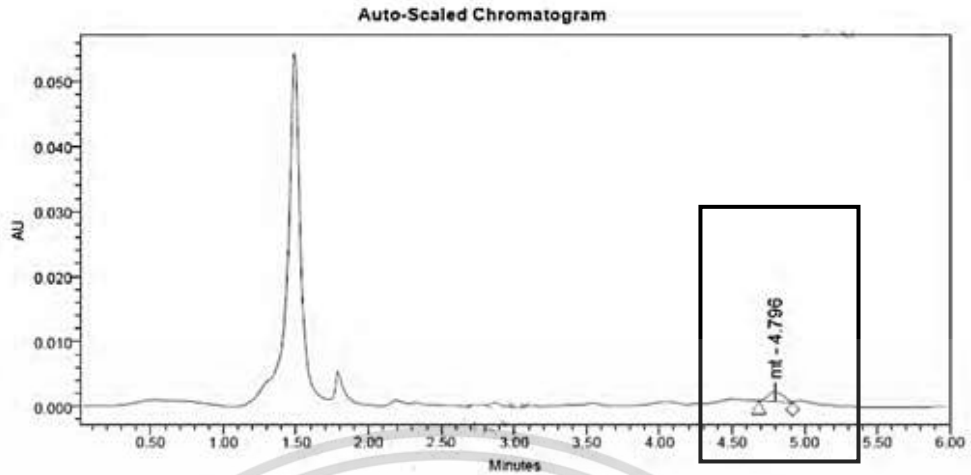
ที่มา: ดัดแปลงจาก Barbosa *et al.* (2013)



ภาพที่ 2.7 โครมาโทแกรมการวิเคราะห์อาหารเปรียบเทียบกับอาหารผสมฮอร์โมน 17MT

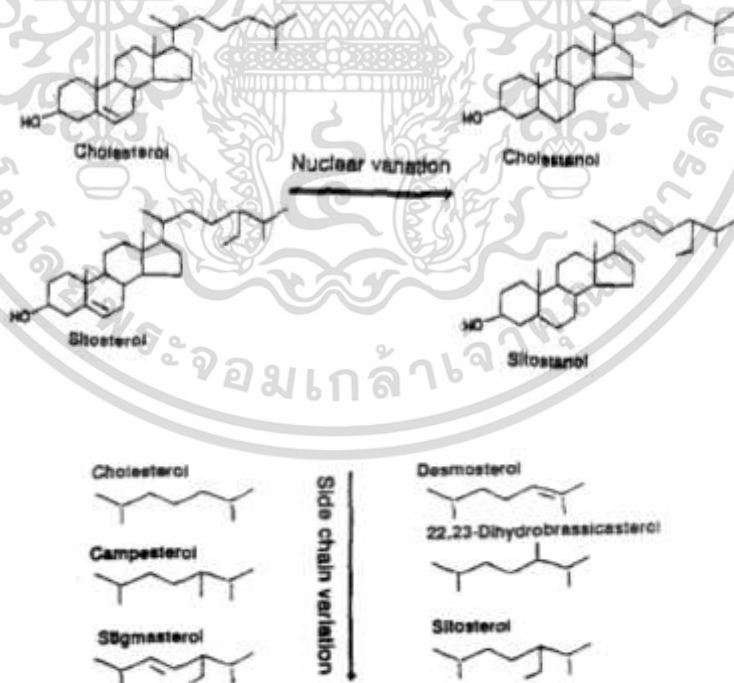
ที่มา: Marwah *et al.* (2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.8 โครมาโทแกรมการวิเคราะห์ฮอร์โมน 17MT
ที่มา : ดัดแปลงจากพุทธรัตน์ เบ้าประเสริฐกุล และคณะ (2556)

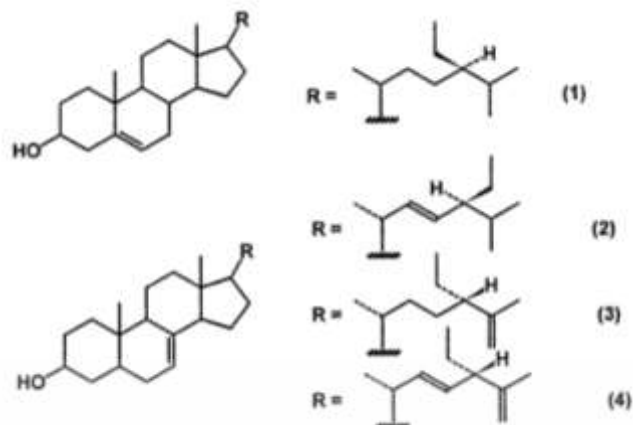
2.3.2 การตรวจสอบปริมาณ Phytosterol



ภาพที่ 2.9 โครงสร้างทางเคมีของ Phytosterol

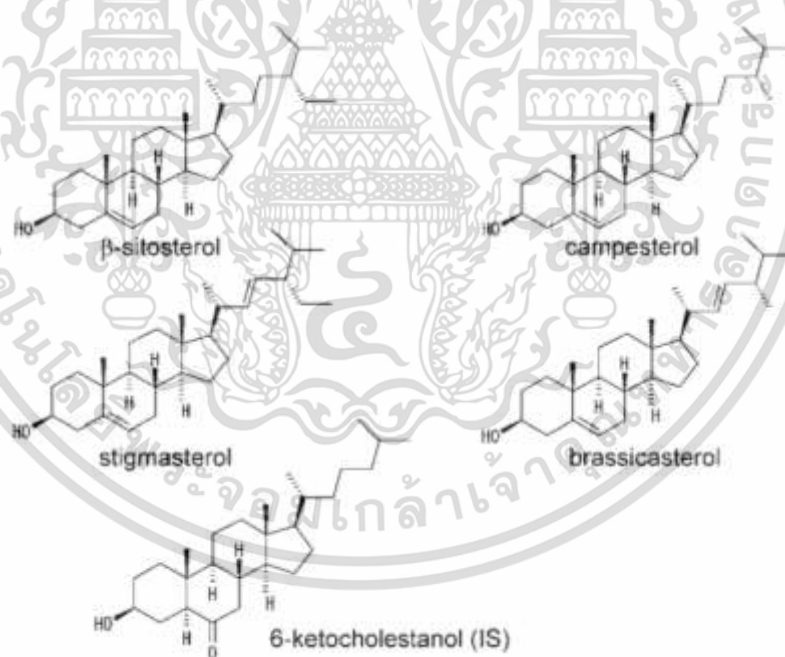
ที่มา: Ling and Jones (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.10 โครงสร้างทางเคมีของ Phytosterol และ β -Sitosterol (1=D7-Phytosterols, 2=Spinasterol, 3=Stigmasta-7,25-dienol, 4=Stigmasta-7,22,25-trienol)

ที่มา: Coors (1991) และ Ito *et al.* (2017)



ภาพที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีของ Phytosterol, β -Sitosterol, Campesterol, Stigmasterol, Brassicasterol, และ 6-Ketocholestanol (Internal standard; IS)

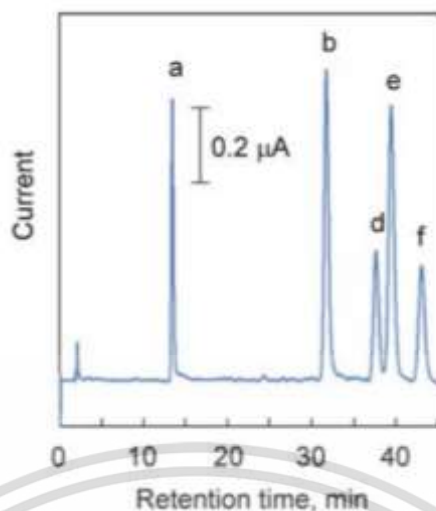
ที่มา: Coors (1991) และ Ito *et al.* (2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สเตอรอล (Sterol) เป็นไขมันที่สำคัญสำหรับสิ่งมีชีวิต และหลายชนิดพบได้ในเซลล์ยูคาริโอต (Eukaryote) สเตอรอลจากพืชบนดินเรียกว่าไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) ในขณะที่สเตอรอลจากสัตว์ เรียกว่า คอเลสเตอรอล (Cholesterol) สเตอรอลทั้งสองชนิดมีโครงสร้างคล้ายคลึงกันมาก Oka *et al.* (1973) และ Ito *et al.* (2017) ซึ่งไฟโตสเตอรอลมีโครงสร้างสัมพันธ์กับคอเลสเตอรอล แต่จะมีความแตกต่างกันที่โครงสร้างสายด้านข้าง โดยไฟโตสเตอรอลที่พบบ่อยที่สุดในธรรมชาติ คือ Campesterol, β -Sitosterol, Stigmasterol ดังนั้นการไฮโดรจิเนชัน (Hydrogenation) หรือการยับยั้งการสลายตัวโดยการเพิ่มไฮโดรเจนให้กับโมเลกุลของไฟโตสเตอรอล จึงเกิดเป็นไฟโตสเตอรอลที่อิ่มตัว เช่น Campestanol และ Sitostanol (Ling and Jones, 1995)

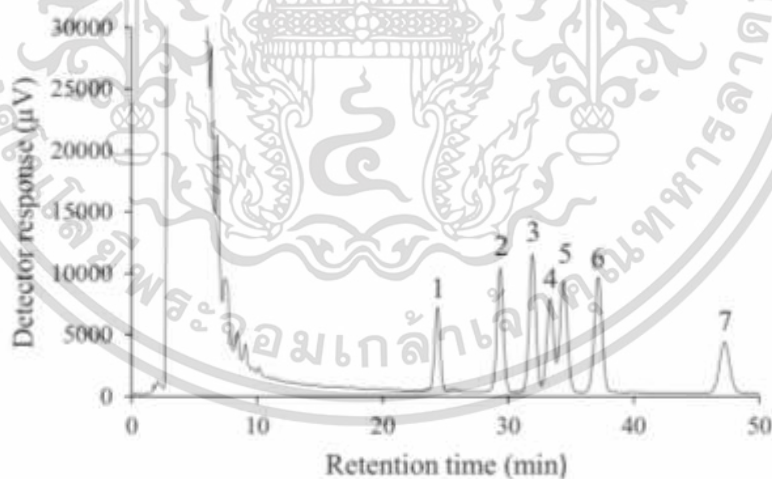
Ito *et al.* (2010) วิเคราะห์สเตอรอล (Brassicasterol, Campesterol, Stigmasterol และ β -Sitosterol) โดยใช้ UV-HPLC พร้อมด้วยคอลัมน์ C_{30} โครมาโทกราฟีพบว่าสามารถแยกสาร Stigmasterol จาก Campesterol ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ภาพที่ 2.12) ด้วยระบบ HPLC-ECD ประกอบด้วยคอลัมน์ C_{30} Develosil UG-3 (ขนาด 150x4.6 มิลลิเมตร; 3 ไมโครเมตร) ร่วมกับเฟสเคลื่อนที่ Acetonitrile ที่ประกอบด้วย 10 mM L^{-1} $LiClO_4$ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลอยู่ที่ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรการฉีด 5 ไมโครลิตร ผลโครมาโทแกรมของไฟโตสเตอรอลชนิดต่างๆ จะอยู่เริ่มพบที่เวลาประมาณ 14-40 นาที (ภาพที่ 2.12) และการศึกษาของ Ito *et al.* (2017) ตรวจสอบปริมาณไฟโตสเตอรอลต่างๆ ด้วยวิธี HPLC-FL ประกอบด้วยคอลัมน์ C_{30} (Develosil XG-30M-5, ขนาด 250x4.6 มิลลิเมตร; 5 ไมโครเมตร) ซึ่งมีการไหลแบบ Isocratic solution โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ Acetone/Acetonitril/Hexane/Water (71:20:4:5 v/v) ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปริมาตรการฉีด 10 ไมโครลิตร และการตรวจจับการเรืองแสงการกระตุ้น (FL) ที่ 370 นาโนเมตร และการปล่อยแสงที่ 470 นาโนเมตร ในพืชบก เช่น เห็ดหูหนู ถั่วเหลือง และผักชีฝรั่ง รวมถึงสาหร่ายทะเล เช่น Hiziki (Phaeophyta), Ogonori (Rhodophyta), และ Heraiwazuta (Chlorophyta) ผลโครมาโทแกรมของไฟโตสเตอรอลชนิดต่างๆ จะอยู่เริ่มพบที่เวลาประมาณ 14-40 นาที (ภาพที่ 2.13)

โดยข้อมูลต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการวิเคราะห์ 17MT และ Phytosterol ด้วย HPLC สรุปไว้ดังตารางที่ 2.2



ภาพที่ 2.12 โครมาโตกราฟีที่ได้จากสารละลายสเตอรอลมาตรฐานแบบผสมและมาตรฐานภายในด้วย HPLC-ECD ซึ่งตัวเลขบนโครมาโตแกรมแสดงถึงสารประกอบต่อไปนี้ คือ a=6-Ketocholestanol (IS), b=Brassicasterol, d=Campesterol, e=Stigmasterol, และ f= β -Sitosterol

ที่มา: Ito *et al.* (2010)



ภาพที่ 2.13 โครมาโตกราฟีที่ได้จากสารละลายสเตอรอลมาตรฐานแบบผสมและมาตรฐานภายในด้วย HPLC-FL ซึ่งตัวเลขบนโครมาโทแกรมแสดงถึงสารประกอบต่อไปนี้: 1= Ergosterol, 2=Fucosterol, 3=Cholesterol, 4=Stigmasterol, 5=Campesterol, 6= β -Sitosterol, 7=Internal standard

ที่มา: Ito *et al.* (2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 การวิเคราะห์ 17MT และ Phytosterol ด้วย HPLC

Sample	Column (size)	Mobile phase	Injection volume	Flow rate: Temp : WL: Retention time	References
17MT	C ₁₈ reverse phase column (250x4.6 mm; 5 µm)	Acetonitrile: Ultrapure water (45:55 v/v)	20 µl	1 ml/min: 25°C: 245 nm :12 min	Barbosa <i>et al.</i> (2013)
	Sunfire C ₁₈ reverse phase column (150x4.6 mm; 5 µm)	Acetonitrile: Milli-Q water (60:40 v/v)	20 µl	1 ml/min:40°C: 245 nm: 4.7-4.8 min	พุทธรัตน์ เข้าประเสริฐกุล และคณะ (2556)
	Zorbax-SB C ₁₈ column (150x3.0 mm; 5 µm)	Acetonitrile: Water (20:80 v/v)	5 µl	0.5 ml/min: 40°C: 245 nm :12 min	Marwah <i>et al.</i> (2005)
Phyto sterol	Develosil C ₃₀ UG-3 column (250x4.6 mm)	Acetonitrile ที่ ประกอบด้วย 10 mM L ⁻¹ LiClO ₄	5 µl	1.5 ml/min: 30° C: NA: 10-14 min	Ito <i>et al.</i> (2010)
	Develosil C ₃₀ XG-30M-5 (250x4.6 mm)	Acetone/ Acetonitrile/ Hexane/Water (71:20:4:5 v/v)	10 µl	1 ml/min: 25° C: NA: 10-14 min	Ito <i>et al.</i> (2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การแปลงเพศปลานิลด้วย 17 α -Methyltestosterone (17MT)

การแปลงเพศปลา (Sex reversal) เป็นการเปลี่ยนเพศปลาจากเพศผู้ให้เป็นเพศเมียหรือเพศเมียให้เป็นเพศผู้ เพื่อประโยชน์ทางการเพิ่มผลผลิตที่เกี่ยวข้องกับความแตกต่างของเพศปลาด้านการเติบโตที่มีผลต่ออัตราการเติบโตที่แตกต่างกัน ซึ่งการเปลี่ยนเพศของปลาทำได้หลายวิธีแต่ที่นิยมกันมากคือการแปลงเพศปลาด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์ควบคู่กับการผสมในอาหารปลาหรือการแช่ ในปลานิลเพศผู้ที่มีอัตราการเติบโตที่กว่าเพศเมียเนื่องจากพลังงานจากกระบวนการเมแทบอลิซึมในเพศผู้จะถูกส่งไปช่วยในด้านการเติบโต แต่ในปลานิลเพศเมียจะถูกส่งไปช่วยในการสืบพันธุ์หรือสร้างรังไข่ (Tran-Duy *et al.*, 2008; Angienda *et al.*, 2010; El-Greisy and El-Gamal, 2012) การแปลงเพศในปลานิลจะนิยมใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ 17 α -Methyltestosterone (17MT) ซึ่งมีการเลียนแบบฮอร์โมนเพศชายที่ผลิตขึ้นตามธรรมชาติ (El-Greisy and El-Gamal, 2012) การแปลงเพศผู้ในปลานิล ควรเริ่มตั้งแต่ลูกปลามีอายุ 2-3 วันหลังจากการฟัก อย่างไรก็ตามการศึกษาอื่น ๆ แนะนำให้เริ่มการแปลงเพศหลังจากลูกปลานิลมีอายุ 7 วัน หลังการฟักออกจากไข่จนกระทั่งลูกปลามีอายุ 30 วัน (Nakamura and Iwahashi, 1982)

2.4.1 ความเข้มข้นของ 17MT ที่เหมาะสมในการแปลงเพศผู้ในปลานิล

การศึกษาการแปลงเพศโดยทั่วไปการเตรียมสารละลายฮอร์โมนสังเคราะห์นิยมทำละลายด้วยเอทานอล ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาในประเทศไทย ธงชัย เย็นปิง และคณะ (2554) ศึกษาการแปลงเพศลูกปลานิลอายุ 3-5 วัน โดยเตรียมสารละลายฮอร์โมน 17MT ด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยศึกษาการแปลงเพศที่ระยะเวลาแตกต่างกันที่ 0 15 18 และ 21 วัน ตามลำดับ หลังสิ้นสุดการทดลองทำการเลี้ยงลูกปลานิลด้วยอาหารสำเร็จรูปจนลูกปลานิลมีอายุ 49 วัน จึงทำการตรวจเพศด้วยการย้อมสีอวัยวะสืบพันธุ์ด้วยสีย้อมอะซีโตคาามิน ซึ่งตรวจพบปลานิลเพศผู้ที่อยู่เท่ากับ 51.1 \pm 3.34, 85.2 \pm 1.95, 90.6 \pm 1.02 และ 96.6 \pm 0.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากผลแสดงให้เห็นว่าเวลาในการให้อาหารผสมฮอร์โมนแปลงเพศมีผลต่อสัดส่วนผลผลิตเพศผู้ ซึ่งสรุปได้ว่าการทดลองผลิตลูกปลานิลแปลงเพศโดยให้ลูกปลากินอาหารผสมฮอร์โมน 17MT อัตราความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 21 วัน เหมาะสมที่สุดเพื่อการแปลงเพศผู้ในปลานิล นอกจากนี้การศึกษาของต่างประเทศซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในประเทศไทย อาทิ การศึกษาของ Jensi *et al.* (2016) ศึกษาความเข้มข้นในการแปลงเพศลูกปลานิลอายุ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัน ด้วยฮอร์โมน 17MT ที่ความเข้มข้น 50, 60 และ 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม จำนวน 3 ซ้ำ เป็นเวลา 21 วัน พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบจำนวนปลาเนิลเพศผู้เป็นร้อยละเท่ากับ 83.3, 93.3 และ 90.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นของ 17MT ที่ 60 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร สามารถผลิตปลาเนิลเพศผู้ได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รวมถึง Marjani *et al.* (2009) ศึกษาการแปลงเพศลูกปลาเนิลด้วยฮอร์โมน 17MT ที่ความเข้มข้น 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 21 วัน พบจำนวน ปลาเนิลเพศผู้หลังสิ้นสุดการทดลองเป็นร้อยละ 74.29, 98.09 และ 79.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่ง จากผลความเข้มข้นที่สามารถผลิตปลาเนิลเพศผู้ได้มากที่สุด คือ ความเข้มข้นที่ระดับ 75 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม และ Celik *et al.* (2011) ศึกษาความเข้มข้นในการแปลงเพศลูกปลาเนิลอายุ 3 วัน ด้วย ฮอร์โมน 17MT ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 0, 20, 30, 40, 50 และ 60 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 28 วัน พบจำนวนปลาเนิลเพศผู้หลังการทดลองคิดเป็นร้อยละ 57.1, 69.8, 69.4, 70.9, 86.1 และ 93.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ 17MT ที่ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มี จำนวนปลาเนิลเพศผู้มากที่สุด

นอกจากนี้การใช้ฮอร์โมน 17MT ในระดับความเข้มข้นที่สูง (60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) หลังการแปลงเพศฮอร์โมนส่วนหนึ่งจะถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม โดยการขับถ่ายและบางส่วนจะ ยังคงอยู่ในตัวปลา ซึ่งสารเหล่านี้อาจถูกถ่ายโอนไปยังน้ำ อาหาร และผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำต่างๆ หาก ไม่ได้รับการควบคุมอย่างดีและยังมีหลักฐานรายงานจำนวนมากระบุว่า การสัมผัสกับฮอร์โมน สังเคราะห์ในระดับต่ำอาจทำให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์น้ำในธรรมชาติ (Risto *et al.*, 2013) จากการศึกษาของ Green and Teichert-Coddington (2000) ทดลองความเข้มข้น ในการแปลงเพศปลาเนิลคาดการณ์ว่าความเข้มข้นของ 17MT จะลดลงอย่างน้อย 100 พิโคกรัมต่อ กรัม ในช่วง 8-40 วันหลังการแปลงเพศด้วย 17MT และใช้ระยะเวลาการถอนถึง 120 วันหลังจาก การแปลงเพศ ซึ่งต้องเลี้ยงปลาเนิลจนกว่าจะได้ขนาดที่ต้องการของตลาด 4-5 เดือนหรือจนกว่าจะได้ ขนาดที่โตเต็มวัยจึงจะทำให้ความเข้มข้นของฮอร์โมนลดลง โดยมีการสรุปข้อมูลสายพันธุ์ปลา อายุลูก ปลาเริ่มต้น วิธีการให้ฮอร์โมน ความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์ปลาเพศผู้ที่พบจากการรวบรวมเอกสาร การศึกษาต่างๆ สรุปไว้ดังตารางที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 สายพันธุ์ปลา อายุลูกปลาเริ่มต้น วิธีการให้ฮอร์โมน ความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์ปลาเพศผู้

สายพันธุ์ปลานิล	อายุลูกปลาเริ่มต้น (วัน)	วิธีการให้ฮอร์โมน	ระยะเวลาที่ได้รับฮอร์โมน (วัน)	ความเข้มข้น (mg/kg)	เพศผู้ (%)	อ้างอิง
<i>O. massambicus</i>	3	กิน	21	50	74.3	Marjani <i>et al.</i> (2009)
				75	98.1	
				100	79.4	
			0		51.1	
<i>O. niloticus</i>	3-5	กิน	15		85.2	รังชัย เย็นปิง และคณะ (2554)
			18	40	87.1	
			21		96.6	
				20	69.8	
				30	69.4	
	หลัง yolk หมด	กิน	28	40	70.9	Celik <i>et al.</i> (2011)
				50	86.1	
				60	93.7	
	10	กิน	28	65	97.8	Dergal <i>et al.</i> (2016)
				50	83.3	Jensi <i>et al.</i>
	3	กิน	21	60	93.3	(2016)
				100	90.0	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การศึกษาคุณลักษณะการเติบโตและการแปลงเพศผู้ด้วยสมุนไพร

การศึกษาผลของสมุนไพรต่อคุณลักษณะการเติบโตเป็นอีกหนึ่งความสำคัญที่ต้องมีการศึกษา เพื่อประเมินความเข้มข้นและชนิดของสมุนไพรที่ใช้ศึกษา ซึ่งพบการรายงานว่าสมุนไพร เช่น หนามกระสุนสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและสุขภาพ คุณภาพน้ำอสุจิ ประสิทธิภาพและการทำงานการสืบพันธุ์ (Hassona *et al.*, 2020) เพิ่มความสามารถในการฟักไข่ ช่วยเพิ่มความอยากอาหาร การใช้อาหาร การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว รวมถึงความแตกต่างทางเพศและการสร้างอสุจิ (Yeganeh *et al.*, 2017; Donaldson, 1982; Jayaprakas and Sindhu, 1996; Mukhopadhyay *et al.*, 1986) และสมุนไพรสามารถช่วยเร่งการเจริญเติบโตของลูกปลานิลที่ได้รับสารสกัดได้จากการเพิ่มขึ้นของระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในปลา (Asad *et al.*, 2010) ซึ่งจากรายงานข้างต้นพบว่าสมุนไพรมีส่วนช่วยด้านการเติบโตในปลา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ประโยชน์สมุนไพรเพื่อการพัฒนาประสิทธิภาพทั้งในด้านการเติบโตและเป็นแนวทางในการแปลงเพศทางเลือกอย่างเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องการใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์เพื่อการแปลงเพศในปัจจุบันก่อให้เกิดความกังวลต่อสิ่งแวดล้อม ด้านการตกค้างของฮอร์โมนในธรรมชาติ และความปลอดภัยทางด้านอาหารต่อผู้บริโภค (Megbowon and Mojekwu, 2013) โดยมีการรายงานว่าสมุนไพรมีสารกลุ่มสเตียรอยด์ (Steroid) ที่สามารถรบกวนกลไกการทำงานของระบบสืบพันธุ์ รวมถึงมีการออกฤทธิ์กระตุ้นความรู้สึกทางเพศ และช่วยเพิ่มสมรรถภาพทางเพศได้ (Abarikwu *et al.*, 2020; Dinchev *et al.*, 2008; Affaf *et al.*, 2019; Mengumphan *et al.*, 2006) อีกทั้งในทางการแพทย์ยังใช้ในการต้านการห้อยสมรรถภาพทางเพศ อาการบวม น้ำ อากาศท้องอืด โรคหัวใจและหลอดเลือด (Kostova *et al.*, 2002) ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์เพื่อการแปลงเพศในปลาได้ เช่น หนามกระสุน *T. terrestris* (Dinchev *et al.*, 2008; Affaf *et al.*, 2019; Ghosal *et al.*, 2015; Ghosal *et al.*, 2016) ใบผักปลัง *B. alba* เมล็ดหมามุ่ย *M. pruriens* (Ghosal *et al.*, 2015; Ghosal *et al.*, 2016) รากสามสิบ *Asparagus racemosus* (Mukherjee *et al.*, 2018) กวาวเครือแดง *B. superba* (Mengumphan *et al.*, 2006) และกระชายดำ *K. parviflora wallich* (Chaturapanich *et al.*, 2008) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1 หนามกระสุน (*T. terrestris*)



ภาพที่ 2.14 หนามกระสุน

ที่มา: <http://ippc.acfs.go.th/pest/G001/T010/WEED086>

ชื่อไทย: หนามกระสุน โคนกระสุน

ชื่อสามัญ: Gokshur, Gokharu, Puncture vine, Goathead, Hard thorns เป็นต้น

ชื่อวิทยาศาสตร์: *T. terrestris*

สกุล: Zygophyllaceae

ถิ่นที่พบ: หนามกระสุนเป็นพรรณไม้ท้องถิ่นของเขตอบอุ่น และเขตร้อนของโลกโดยเชื่อกันว่ามีถิ่นกำเนิดอยู่หลายแหล่งตามทวีปต่างๆ เช่น ในเขตอบอุ่นทางยุโรปตอนใต้ และออสเตรเลีย ส่วนในเขตร้อนได้แก่ บริเวณเอเชียใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และแอฟริกา เป็นต้น สามารถพุ่มนาหรือตามไร่สวนและของเกษตรกร รวมถึงตามริมทาง ริมถนน พบการปลูกแถบทะเลเมดิเตอร์ เรเนียน และในภูมิภาคกึ่งเขตร้อน เช่น อินเดีย จีน ไทย อเมริกาใต้ เม็กซิโก สเปน บัลแกเรีย และปากีสถาน เป็นต้น

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: หนามกระสุนจัดเป็นไม้เถาล้มลุกเลื้อยคลุมดิน มักแตกกิ่งก้านไปโดยรอบ ส่วนของปลายยอดจะชูตั้งขึ้น ตามลำต้นมีขนขึ้นปกคลุมโดยแต่ละต้นสามารถยืมน้ำได้ถึง 150 เซนติเมตร ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกชั้นเดียว ออกเรียงตรงกันข้ามเป็นคู่ มีใบย่อย ซึ่งมีขนาดประมาณ 2.5x6.5 เซนติเมตร ปลายใบแหลมมน ขอบใบเรียบ และมีขนปกคลุมทั้งสองด้าน ดอกออกเป็นดอกเดี่ยว สีเหลืองมีกลีบดอก 5 กลีบ เป็นรูปไข่กลับ กว้าง 3-5 มิลลิเมตร ยาว 4-8 มิลลิเมตร โดยดอกจะออกตามซอกใบ หรือ ตามข้อของลำต้น ผลเป็นรูปแบบกลมแบบแห้งแล้วแตก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยซีกผลเป็นแบบผลฝักซี กว้าง 2-3 มิลลิเมตร ยาว 4-5 มิลลิเมตร แบ่งได้เป็น 5 ซีก ส่วนเปลือกผลหนา และแข็งเป็นหนามแหลม ที่เรียงเป็น 2 คู่ เนื้อแข็งซึ่ง ใน 1 พู จะมี 2-5 เมล็ด

ประโยชน์และสรรพคุณ: ช่วยขับปัสสาวะ แก้หนาว แก้กษัย แก้หนองใน ขับระดูขาวแก้ไตพิการ แก้ปัสสาวะพิการ แก้หน้ามืดและวิงเวียน ช่วยบำรุงตับ ไต สายตาและกระดุกช่วยลดความดันโลหิต แก้อาการปวดทางเดินปัสสาวะ ช่วยป้องกันการชักแก้ปวดฟัน บำรุงอสุจิในเพศชาย แก้โรคในระบบทางเดินปัสสาวะ และช่วยเสริมสมรรถภาพทางเพศ เพิ่มฮอร์โมนเพศชาย ใช้กระตุ้นการสร้างมวลกล้ามเนื้อเพื่อเพิ่มความแข็งแรง

หนามกระสุนใช้เป็นสมุนไพรทางการแพทย์ใช้เพื่อการรักษาความบกพร่องทางเพศทั่วโลก เช่น ยุโรป อินเดีย และจีน (Bucci, 2000) มีสรรพคุณสามารถใช้เพิ่มระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ (Cek *et al.*, 2007) นอกจากนี้ ยังมีการระบุสมรรถภาพใช้เพื่อการส่งเสริมสุขภาพ ความต้องการทางเพศ การหลังของฮอร์โมนทางเพศ (ฮอร์โมนเพศชายและฮอร์โมน LH) และเพิ่มจำนวนอสุจิ อีกทั้งยังช่วยในการเจริญเติบโต เพิ่มความอยากอาหาร ภูมิคุ้มกัน และฤทธิ์ต้านจุลชีพของปลาที่เลี้ยงจากการมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ฟีนอล สเตียรอยด์ และน้ำมันหอมระเหย (Chakraborty *et al.*, 2015)

การศึกษาของ Hassona *et al.* (2020) พบว่าการเสริมอาหารปลานิลที่ความเข้มข้นของสารสกัดหนามกระสุนที่แตกต่างกันที่ 250, 500 และ 750 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เทียบกับกลุ่มควบคุมควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มควบคุม พบอัตราการเติบโตเท่ากับ 1.167, 1.314, 1.374, 0.854 และ 0.796 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีส่วนช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต เสริมสุขภาพ คุณภาพน้ำอสุจิ และประสิทธิภาพการทำงานของสารสืบพันธุ์ และอาหารเสริมสารสกัดจากหนามกระสุนให้การเติบโตที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มปลาที่เลี้ยงด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์ ดังนั้นจึงอาจคาดเดาได้ว่าอาหารที่เสริมด้วยพืชช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของปลาได้ดีกว่าฮอร์โมนสังเคราะห์ และการศึกษาของ Yeganeh *et al.* (2017) พบว่าสารสกัดหนามกระสุนที่เสริมเป็นอาหารเสริมสำหรับปลาหมอฆ่าลาย *Cichlasoma nigrofasciatum* ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการฟักไข่ นอกจากนี้หนามกระสุนยังเพิ่มความอยากอาหาร การใช้อาหาร และการสังเคราะห์โปรตีนเนื่องจากผลของแอนโดรเจน (Donaldson, 1979; Jayaprakas and Sindhu, 1996; Mukhopadhyay *et al.*, 1986) และ Mansour *et al.* (2018) การทดลองให้อาหารเป็นเวลา 84 วัน เพื่อตรวจสอบผลของสารสกัดจากโสม (GE) หนามกระสุน (TE)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และละอองเกสรอินทผลาลัม (DPPG) ต่อการเจริญเติบโต ระดับฮอร์โมนเพศชาย และการใช้สารอาหารของปลานิล ผลการวิจัยพบว่ากลุ่มที่ได้รับการเสริมสารสกัดในอาหารทั้งหมดมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุม การใช้สารอาหารเพิ่มขึ้นด้วยการเสริมไฟโตเคมีคอลในปริมาณที่สูงขึ้น ระดับเทสโทสเตอโรนในพลาสมาหลังได้รับสารสกัดที่ระดับ TE 1.2, GE 0.4, TE 0.6 และ DPPG 6 กรัมต่อกิโลกรัม ระดับเทสโทสเตอโรนในพลาสมาอยู่ที่ 86.27, 64.58, 57.35 และ 24.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุม และมีการใช้สารอาหารเพิ่มขึ้นจากการเสริมไฟโตเคมีคอลในปริมาณที่สูงขึ้น สรุปได้ว่า GE, TE และ DPPG ในปริมาณที่สูงขึ้นสามารถใช้เร่งการเจริญเติบโตและกระตุ้นฮอร์โมนเพศโทสเตอโรนสำหรับปลานิลได้

Ghosal *et al.* (2015) ศึกษาการแปลงเพศด้วยสารสกัดใบผักปลัง *B. alba* และเมล็ดหนามกระสุน *T. terrestris* พบเปอร์เซ็นต์การรอดตายที่ 94.96 ± 0.6 เปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตที่สูงนี้บ่งชี้ว่ากลุ่มของสารสกัดจากพืชทั้งสองชนิดไม่มีผลเสียต่อสุขภาพของปลา และ Ghosal and Chakraborty, (2020) ทุกกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดกระสุนด้วยเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 0.0, 2.0, 2.5, 3.0 กรัมต่อกิโลกรัม แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงชันอย่างมีนัยสำคัญที่ 100 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (93.33 ± 1.76) และ Ghosal *et al.* (2021) รายงานว่าลูกปลานิลที่ได้รับอาหารผสม 17MT (10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม), สารสกัดใบผักปลัง (1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม), สารสกัดเมล็ดหนามกระสุน (2.0 กรัมต่อกิโลกรัม), สารสกัดเมล็ดหนามมูย (0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม), และสารสกัดรากสามสิบ (0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เป็นเวลา 30 วัน พบว่าอัตราการรอดชีวิตไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ในทุกกลุ่มการทดลอง (92.67, 95.33, 96.67, 94, 96.67 และ 92.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) นอกจากนี้พบอัตราการรอดในปลาหมอม้าลาย *C. nigrofasciatum* ที่ 100 เปอร์เซ็นต์. ในกลุ่มอาหารเสริมด้วยหนามกระสุนแบบผงที่ 1 และ 2 กรัมต่อกิโลกรัม

Hassona *et al.* (2020), Ghosal *et al.* (2015), และ Ghosal *et al.* (2016) นำหนามกระสุนมาใช้ประโยชน์เพื่อการแปลงเพศปลานิล นอกจากนี้ Ghosal *et al.* (2015) ศึกษาการแปลงเพศปลานิลด้วยสารสกัดจากใบผักปลัง *B. alba* และเมล็ดหนามกระสุน *T. terrestris* โดยมีการผสมอาหารที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 0.5, 1, และ 1.5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร หลังสิ้นสุดการให้อาหารเป็นเวลา 21 วัน พบจำนวนปลานิลเพศผู้ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดจากใบผักปลังสูงที่สุดที่ความเข้มข้น 1 กรัม และพบจำนวนปลานิลเพศผู้สูงสุดที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดจากเมล็ดหนามกระสุนที่ระดับความเข้มข้น 1.5 กรัม และ Ghosal *et al.*, (2016) ศึกษาการแปลงเพศปลานิลด้วย

สารสกัดจากใบผักปลังและเมล็ดหนามกระสุน ในลูกปลานิลอายุ 3 วัน ด้วยการผสมอาหารที่ระดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใดโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 5, 10, และ 15 กรัมต่อกิโลกรัม ระยะเวลาให้อาหารนาน 30 วัน หลังสิ้นสุดการทดลองตรวจพบปลาไนลเพศผู้ที่กินอาหารผสมสารสกัดจากใบผักปลัง เท่ากับ 61.1 ± 0.6 , 70.3 ± 1.2 และ 53.3 ± 1.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยพบจำนวนปลาไนลเพศผู้หลังได้รับอาหารผสมสารสกัดเมล็ดหนามกระสุนเท่ากับ 55.8 ± 2.4 , 64.1 ± 0.8 , และ 76.6 ± 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการแช่ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 0.05, 0.1, และ 0.15 กรัมต่อลิตร ทดสอบการแช่นาน 30 วัน จำนวน 1 ครั้งต่อสัปดาห์ ผลการตรวจสอบเพศหลังการแช่จำนวน 4 ครั้ง หลังสิ้นสุดการทดลองตรวจพบปลาไนลเพศผู้หลังจากการแช่ด้วยสารสกัดจากใบผักปลังเท่ากับ 55.8 ± 2.4 , 64.1 ± 0.8 , และ 76.6 ± 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบสัดส่วนปลาไนลเพศผู้หลังการแช่ด้วยสารสกัดเมล็ดหนามกระสุนเท่ากับ 61.1 ± 1.4 , 71.9 ± 1.9 และ 56.6 ± 0.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบผักปลังและสารสกัดเมล็ดหนามกระสุนสามารถใช้เพื่อการแปลงเพศปลาไนลเป็นเพศผู้ได้ แต่สารสกัดเมล็ดหนามกระสุนมีประสิทธิภาพในการใช้เพื่อการแปลงเพศได้ดีกว่าสารสกัดใบผักปลัง นอกจากนี้มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนปลาเพศผู้จากการใช้หนามกระสุนเป็นอาหารเสริมในอาหารปลาตุ๊กแอฟริกา (*Clarias gariepinus*) (Turan and Cek, 2007)

รวมถึงการแช่ปลาหางนกยูงแรกฟัก (*Poecilia reticulata*) ในสารละลายสกัดเมล็ดหนามกระสุนสัปดาห์ละครั้งเป็นเวลา 2 เดือนจะทำให้เกิดการแปลงเพศผู้เพิ่มขึ้น และปลาที่ทดสอบส่วนใหญ่ (80 เปอร์เซ็นต์) เป็นปลาตัวผู้ซึ่งมีการเจริญเติบโตดีกว่าปลาที่ไม่ได้รับการแช่สารสกัด (Cek et al., 2007) และ Hassona et al. (2020) ศึกษาการเสริมอาหารปลาไนลที่ความเข้มข้นของสารสกัดหนามกระสุนแตกต่างกันที่ 500 และ 750 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต สุขภาพ คุณภาพน้ำอสุจิ และประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ โดยไม่มีผลกระทบที่เป็นอันตรายต่อคุณภาพน้ำ และอาหารเสริมสารสกัดจากหนามกระสุนที่เลี้ยงปลาให้คุณค่าที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มปลาที่เลี้ยงด้วยฮอโมนสังเคราะห์ ดังนั้นจึงอาจคาดเดาได้ว่าอาหารที่เสริมด้วยพืชช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของปลาได้ดีกว่าฮอโมนสังเคราะห์ (Hassona et al., 2020)

2.5.2 กวาวเครือแดง (*B. superba*)



ภาพที่ 2.15 กวาวเครือแดง

ที่มา: <https://www.skherbstore.com>

ชื่อไทย: กวาวเครือแดง

ชื่อสามัญ: Red Kwao Krua

ชื่อวิทยาศาสตร์: *B. superba* Roxb

สกุล: Papilionaceas

ถิ่นที่พบ: ไทย อินเดีย จีน เป็นต้น

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: กวาวเครือแดงอยู่ในจำพวกไม้เลื้อย เป็นเถาวัลย์ เนื้อแข็ง มักชอบพาดขึ้นกับต้นไม้ใหญ่ ใบใหญ่คล้ายใบต้นทองกวาว แต่มีขนาดใหญ่กว่า ดอกใหญ่สีส้มแสดคล้ายดอกแคแสด แต่เป็นพวงระย้าคล้ายดอกทองกวาว หัวกวาวเครือแดงมีหลายขนาดลักษณะทรงกระบอก เมื่อสะกัดที่เปลือก จะมียางสีแดงคล้ายเลือด มีรากแขนงขนาดใหญ่ แยกจากเหง้าเลื้อยไปรอบๆ หลายเมตร

ประโยชน์และสรรพคุณ: ช่วยบำรุงเนื้อหนังให้เต่งตึง บำรุงสุขภาพ ใช้เป็นยาอายุวัฒนะ ช่วยเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ เพิ่มจำนวนอสุจิ แก้ปวดเมื่อยตามร่างกาย ปรับสมดุลของฮอร์โมนเพศชาย แก้ลมอัมพาต แก้อาการปวดฟัน บำรุงโลหิต แก้โรคลมที่เป็นพิษ ช่วยบำรุงประสาทและสมอง แก่ริดสีดวง ฆ่าพยาธิ ช่วยดับพิษ ถอนพิษไข้ สมานลำไส้ เบื่อเมา และแก้พิษงู

กวาวเครือแดงเป็นสมุนไพรที่ผู้ชายไทยใช้เป็นยาสมุนไพรมาเป็นเวลานานเพื่อการฟื้นฟูความแข็งแรงทางร่างกายและเพิ่มประสิทธิภาพทางเพศชาย รากหัวประกอบด้วยไอโซฟลาโวน ฟลาโวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอยด์ ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ และไฟโตสเตอรอล (Nimsoongnern *et al.*, 2008) ซึ่งการศึกษาในห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) พบว่าสารฟลาโวนอยด์และสารฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์มีฤทธิ์ยับยั้ง cAMP Phosphodiesterase (Roengsumran *et al.*, 2000) และ Cherdshewasart *et al.* (2004) พบว่าสารสกัดจากกวาวเครือแดงอาจมีกลไกต่อต้านเอสโตรเจนหรือฤทธิ์พิษต่อเซลล์ที่มีศักยภาพเนื่องจากฤทธิ์ด้านการแพร่กระจายของเลือดต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ซึ่งบ่งชี้ถึงฤทธิ์ต้านฮอร์โมนเอสโตรเจนบนเซลล์ตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน (ER+) นอกจากนี้จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง (*In vivo*) พบการเพิ่มจำนวนอสุจิและการเคลื่อนไหวของอสุจิในหนูตัวผู้ (Manosroi *et al.*, 2006)

และรายงานการใช้สมุนไพรไทยในการแปลงเพศปลา เช่น การศึกษาของ Kiriyakit, (2014) ศึกษาการแปลงเพศผู้ในปลานิลด้วยการผสมผงกวาวเครือแดงที่ระดับความเข้มข้น 40, 80, 120, 160 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เทียบกับกลุ่ม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร และกลุ่มควบคุม เป็นเวลา 28 วัน ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของอัตราการเติบโตที่ 4 เปอร์เซ็นต์ และในทุกกลุ่มการทดลอง ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการรอดชีวิต (69.93, 71.47, 67.33, 75.73, 72.0, 72.07 และ 71.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบปลานิลเพศผู้สูงสุดในกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือแดงที่ระดับ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร และมีเปอร์เซ็นต์เพศผู้ไม่แตกต่างกับการแปลงเพศด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (100 เปอร์เซ็นต์) และ Mengumphan *et al.* (2006) ศึกษาการแปลงเพศ ในปลานิลแดง ปลานิลสายพันธุ์กานาและปลานิลจิตรลดา ที่ระดับความเข้มข้นของกวาวเครือแดง 0, 100, 200 และ 300 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เทียบกับกลุ่ม 17MT ที่ 40 และ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบอัตราการรอดของปลานิลแดง อยู่ที่ 77.3, 67.7, 33.3, 86.7, 85.0 และ 89.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อัตรารอดของปลานิลสายพันธุ์กานาอยู่ที่ 81.3, 98.0, 92.3, 92.3, 92.3 และ 93.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อัตรารอดของปลานิลสายพันธุ์จิตรลดาอยู่ที่ 78.0, 85.7, 72.0, 88.7, 76.3 และ 90.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบเพศผู้ปลานิลแดงอยู่ที่ 29.5, 69.3, 73.3, 57.9, 48.2 และ 52.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบเพศผู้ปลานิลสายพันธุ์กานาอยู่ที่ 47.2, 83.3, 93.3, 62.2, 72.2 และ 68.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเพศผู้ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดาอยู่ที่ 69.2, 70.1, 94.4, 60.2, 70.9 และ 52.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งพบอัตราการรอดและเพศผู้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเข้มข้นกวาวเครือแดงต่างกัน แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของสายพันธุ์ต่ออัตราการรอดและเพศผู้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 กระชายดำ (*K. parviflora wallich*)



ภาพที่ 2.16 กระชายดำ

ที่มา: <https://www.minervashops.com>

ชื่อไทย: กระชายดำ

ชื่อสามัญ: Krachai-dum, Krachai-dam

ชื่อวิทยาศาสตร์: *K. parviflora wallich*

สกุล: Zingiberaceae

ถิ่นที่พบ: มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบได้หนาแน่นในแถบมาเลเซีย สุมาตรา เกาะบอร์เนียว อินโดจีน และในประเทศไทย และมีเขตการกระจายพันธุ์ทั่วไปในเอเชียเขตร้อน ในประเทศจีนตอนใต้ อินเดีย และพม่า ประเทศไทยพบการปลูกกระชายดำมากในจังหวัด พิษณุโลก เพชรบูรณ์ น่าน เลย ตาก กาญจนบุรี และจังหวัดอื่นๆ ทางภาคเหนือ เป็นต้น

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: กระชายดำจัดเป็นไม้ล้มลุกมีอายุหลายปีมีเหง้าอยู่ใต้ดินเป็นพืชตระกูลเดียวกับ ขิง ข่า ไพล โดยในแต่ละส่วนมีรายละเอียดดังนี้

เหง้ากระชายดำ: ลักษณะเป็นรูปทรงกลม เป็นปุ่มเรียงต่อกัน มักมีขนาดเหง้าเท่าๆ กัน มีหลายเหง้าและอวบน้ำ ผิวเหง้ามีสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม และอาจพบรอยที่ผิวเหง้าเป็นบริเวณที่จะงอกของต้นใหม่ ส่วนเนื้อภายในของเหง้ามีสีม่วงอ่อนหรือสีม่วงเข้มไปจนถึงม่วงดำ เหง้ามีกลิ่นหอมเฉพาะตัว และมีรสชาติขมเล็กน้อย โดยสมุนไพรกระชายดำที่ดื่มนั้นจะต้องมีสีม่วงเข้มถึงสีดำ

ใบกระชายดำ: มีใบเป็นใบเดี่ยว ลักษณะเป็นรูปรีหรือรูปไข่ มีความกว้างประมาณ 5–10

เซนติเมตร และยาวประมาณ 10–15 เซนติเมตร ปลายใบแหลม ขอบใบหยักตามเส้นใบ ผิวใบเป็นเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร่องคลื่นตลอดใบตามแนวของเส้นใบ ใบกระชายดำมีสีเขียวสด บริเวณโคนก้านใบมีลักษณะเป็นกาบหุ้มลำต้นไว้ ขอบก้านใบมีสีแดง ส่วนกลางก้านเป็นร่องลึก

ดอกกระชายดำ: ดอกออกเป็นช่อมีการแทรกขึ้นมาจากบริเวณโคนกาบใบ ก้านช่อดอกมีความยาวประมาณ 5-6 เซนติเมตร กลีบดอกส่วนโคนเชื่อมเป็นหลอดยาวประมาณ 3-3.2 เซนติเมตร ส่วนปลายดอกแยกเป็นแฉก เกสรตัวผู้สีขาวเป็นหมัน มีความกว้างที่ประมาณ 3 มิลลิเมตร และความยาวประมาณ 10 -13 มิลลิเมตร ส่วนปลายกลีบดอกมีสีม่วง

ประโยชน์และสรรพคุณ: ใช้ในการบำรุงกำลัง แก้อาการปวดเมื่อยและเหนื่อยล้า ช่วยเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ ขับลมพิษ เป็นยาอายุวัฒนะ แก้จุกเสียด แก้อาการปวดท้อง แก้โรคมดลูกพิการหรือมดลูกหย่อน ใช้กวาดคอเด็กและแก้โรคตานขางในเด็ก บำรุงฮอร์โมนเพศชาย บำรุงผิวพรรณของสตรีให้สดใส ฟันพุดิวให้สวยงาม บำรุงประสาท บำรุงโลหิตของสตรี รักษาโรคมะเร็ง ช่วยขับลมแก้ท้องอืด แก้อาการตกขาวในสตรี แก้อาการประจำเดือนมาไม่ปกติ ช่วยรักษากลากเกลื้อน และการติดเชื้อผิวหนังที่เกิดจากเชื้อรา รักษาโรคเกาต์ แก้อาการเหน็บชา

กระชายดำเป็นหนึ่งในสมุนไพรไทยซึ่งเป็นที่รู้จักในการเสริมสมรรถภาพทางเพศชายในไทย ซึ่งมีการรายงานว่ากระชายดำถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง และความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร ตลอดจนใช้เป็นยาเสริมสมรรถภาพทางเพศและใช้รักษาอาการติดเชื้อรา (Pengcharoen, 2002) การศึกษาทางเภสัชวิทยาคุณประโยชน์ต่างๆ ของกระชายดำ และสาร Methoxyflavone ที่มีประสิทธิผลหลักๆ ต่อการควบคุมการเผาผลาญของเซลล์ การต้านมะเร็ง การผ่อนคลายหลอดเลือด และการทำงานของหัวใจ การเสริมสมรรถภาพทางเพศ ปกป้องระบบประสาท ป้องกันอาการแพ้ ต้านการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระ ในประเทศไทยเป็นยาชูกำลังและเป็นยาเสริมสมรรถภาพทางเพศ (Chen *et al.*, 2018) ในการแพทย์แผนไทย มีรายงานว่ากระชายดำที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถใช้รักษาการติดเชื้อรา ความอ่อนแอ ภูมิแพ้ โรคหอบหืด โรคเกาต์ ท้องเสีย โรคบิด รักษาแผลในกระเพาะอาหารและเบาหวาน และสารสกัดจากส่วนเหง้าหรือส่วนหัวของกระชายดำมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น 3,5,7,4'-Tetramethoxyflavone, 5,7,4'-Trimethoxyflavone และ 5,7,3',4'-Tetramethoxyflavone (Yenjai *et al.*, 2004) เหง้ากระชายดำสดมักใช้ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นส่วนผสมในอาหารและยาสมุนไพรพื้นบ้านเพื่อใช้ในการรักษาโรคต่างๆ เช่น รักษาแผลในกระเพาะอาหาร อาการปากแห้ง อาการไม่สบายท้อง อาการตกขาว และโรคบิด (Saralamp, 1996; Chuakul, 1996; Temsirikkul, 1996) นอกจากนี้ Chaturapanich *et al.*, (2008) รายงานว่าสาร

สกัดจากกระชายดำมีผลต่อการสูบน้ำเลือดในหนูที่เพิ่มขึ้นและเพิ่มสูงขึ้นที่สุดหลังการให้สารสกัด เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระชายดำจากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ถูกนำมาใช้ในการแพทย์แผนโบราณเพื่อรักษาอาการหย่อนสมรรถภาพทางเพศ โดยมีส่วนช่วยในกระบวนการแข็งตัวของอวัยวะสืบพันธุ์เพศชายได้อย่างปกติจากยับยั้ง Phosphodiesterase (PDE) (Temkitthawon *et al.*, 2011) นอกจากนี้มีรายงานว่ากระชายดำสามารถใช้เพื่อการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบโดยการยับยั้งไนตริกออกไซด์ (NO) และการปลดปล่อยของสาร Prostaglandin E2 (PGE2) (Tewtrakul and Subhadhirasakul, 2008) อย่างไรก็ตามไม่พบรายงานการทดลองการใช้กระชายดำในปลา แสดงให้เห็นว่าสามารถช่วยในการส่งเสริมสุขภาพของปลาได้

จากการศึกษาต่างๆ ชำงต้น แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ประโยชน์จากสมุนไพรในการผลิตปลานิลเพศผู้ได้ ซึ่งในการศึกษานี้จะมีศึกษาปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเทอโรนจากสมุนไพรชนิดต่างๆ และมีการทดสอบประสิทธิภาพด้วยการใช้สมุนไพร ถือเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการผลิตปลานิลเพศผู้อย่างเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ลดการตกค้าง การนำเข้าและค่าใช้จ่ายจากการใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ของเกษตรกร อีกทั้งยังเป็นการส่งเสริมและการเพิ่มมูลค่าแก่เกษตรกรผู้ผลิตสมุนไพร ข้อมูลชนิดสมุนไพรส่วนของสมุนไพรที่ใช้ ชนิดปลา ความเข้มข้น และระยะเวลาในการให้ใช้สมุนไพรเพื่อการศึกษาดังกล่าว สรุปลงไว้ดังตาราง 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 ข้อมูลชนิดสมุนไพร ส่วนของสมุนไพรที่ใช้ ชนิดปลา ความเข้มข้น และระยะเวลาในการใช้ประโยชน์จากสมุนไพร

ชนิด	ส่วนที่ใช้	ชนิดปลา	ความเข้มข้น	ระยะเวลาให้อาหาร	อ้างอิง
หนามกระสุน <i>T. terrestris</i>	เมล็ด	ปลานิล	0.5, 0.1, 0.15 กรัมต่อกิโลกรัม	30 วัน	Ghosal <i>et al.</i> (2015) and Ghosal <i>et al.</i> (2016)
		ปลากัด	0.05, 0.1, 0.15 กรัมต่อลิตร	60 วัน	Cek <i>et al.</i> (2007)
		ปลาหางนกยูง	100, 150, 200, 250, 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	2 เดือน	Kavitha and Subramanian (2011)
ผักปลัง <i>B. alba</i>	ใบ	ปลานิล	0.5, 0.1, 0.15 กรัมต่อกิโลกรัม	30 วัน	Ghosal and Chakraborty (2014), Ghosal <i>et al.</i> (2015) and Ghosal <i>et al.</i> (2016)
หมามู๋ <i>M. pruriens</i>	เมล็ด	ปลานิล	2.0, 3.5, 5.0 กรัมต่อกิโลกรัม	30 วัน	Mukherjee <i>et al.</i> (2015) and Mukherjee <i>et al.</i> (2018)
รากสามสิบ <i>A. racemosus</i>	ราก	ปลานิล	0.1, 0.15, 0.2 กรัมต่อกิโลกรัม	30 วัน	Mukherjee <i>et al.</i> (2018)
กวาวเครือแดง <i>B. superba</i>	ราก	ปลานิล	40, 80, 120, 160, 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	28 วัน	Kiriyakit (2014)
			100, 200, 300 กรัมต่อกิโลกรัม	60 วัน	Meangumphan <i>et al.</i> (2006)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์การเลี้ยง

- (1) ถังไฟเบอร์กลาส
- (2) สายออกซิเจน
- (3) หัวทราย
- (4) สวิง
- (5) เกลือ
- (6) ก่องทดลอง

3.1.2 อุปกรณ์การตรวจหา 17MT ในไรแดง

- (1) สวิงขนาดเล็ก
- (2) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- (3) แก้วพลาสติก
- (4) ซ้อนพลาสติก
- (5) อลูมิเนียมฟอยล์
- (6) ไมโครปิเปตขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร
- (7) ทิชชู
- (8) หลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- (9) ปีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร
- (10) ปีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
- (11) กระจบอขวดขนาด 100 มิลลิลิตร
- (12) ขวดแบนด์
- (13) เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน
- (14) น้ำกลั่น

3.1.3 อุปกรณ์การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

- (1) ผงเมล็ดหนามกระสุน
- (2) ผงกาวเครือแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (3) ผงกระชายดำ
- (4) ขวดลูกชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร
- (5) 70% Ethanol
- (6) เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่ง

3.1.4 อุปกรณ์การวิเคราะห์ HPLC

- (1) Polypropylene syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
- (2) กระบอกฉีด (Syringe) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- (3) ขวด Duran ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- (4) ขวด Duran ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร
- (5) ชุดกรองเฟสเคลื่อนที่ Mobile phase
- (6) Inspire™ C₁₈ normal phase column (ขนาด 150x4.6 มิลลิเมตร)
- (7) Water Reliant™ C18 reverse phase column (ขนาด 250x4.6 มิลลิเมตร)
- (8) Phenomenex Security Guard column
- (9) ฮอร์โมนสังเคราะห์ 17MT
- (10) 99.9% Ethanol
- (11) 50% Ethanol
- (12) ขวดสีขาขนาด 200 มิลลิลิตร
- (13) กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร
- (14) น้ำกลั่น
- (15) Acetonitrile
- (16) Ultrapure water
- (17) Methanol
- (18) ขวดไวโอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
- (19) ไมโครปิเปตขนาด 200 ไมโครลิตร
- (20) ไมโครปิเปตขนาด 1000 ไมโครลิตร
- (21) ทิป
- (22) เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่ง
- (23) ซ้อนตักสาร
- (24) อลูมิเนียมฟอยล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.5 อุปกรณ์การเตรียมอาหาร

- (1) อาหารสำเร็จรูป
- (2) ขวดสเปรย์
- (3) น้ำกลั่น
- (4) 95% Ethanol
- (5) ทิป
- (6) ชุดไมโครปิเปต
- (7) ถาดอลูมิเนียม
- (8) กระจกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร
- (9) สารสกัดสมุนไพรรักษาชาดำ
- (10) สารละลายฮอร์โมนสังเคราะห์ 17MT
- (11) ถูชิปล๊อค
- (12) เครื่องชั่งตวง 4 ตำแหน่ง

3.1.6 อุปกรณ์การทางจุลพยาธิวิทยา

- (1) ชุดผ่าตัด
- (2) ชุดย้อมสไลด์เนื้อเยื่อถาวร
- (3) สไลด์
- (4) กระจกปิดสไลด์
- (5) กล้องจุลทรรศน์
- (6) Cassette box
- (7) Mold
- (8) Paraffin
- (9) Davidson's fixative
- (10) 70% Ethanol
- (11) Decalcification solution
- (12) อ่างควบคุมอุณหภูมิ
- (13) เครื่อง microtome
- (14) Tissue processor
- (15) Slide warmer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การศึกษาปริมาณ 17MT ในไรแดงที่แช่ด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์

แผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยกลุ่มทดลองคือระยะเวลาการแช่ที่เวลาต่างๆ กันนาน 30, 60 และ 420 นาที และชุดการทดลองมีจำนวน 2 ชุด คือระดับความเข้มข้นของ 17MT 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และระดับความเข้มข้นของ 17MT 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละชุดการทดลองมีจำนวน 3 ซ้ำ

3.2.1 การเตรียมสารละลายฮอร์โมนสังเคราะห์ 17MT (Stock solution)

เตรียมสารละลายฮอร์โมน 17MT เข้มข้น ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Jensi *et al.* (2016) โดยละลาย 100 มิลลิกรัมด้วย 99.9% เอทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บสารละลายฮอร์โมนเข้มข้น (Stock solution) ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ Barbosa *et al.* (2013)

3.2.2 การแช่ไรแดงด้วย 17MT

แช่ไรแดงน้ำหนัก 0.26 กรัม ในสารละลายฮอร์โมน 17MT ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาแตกต่างกัน 3 ช่วงเวลา คือ 30, 60 และ 420 นาที ทดลองการแช่ในขวดแบนด์ที่ปริมาตร 40 มิลลิลิตร

3.2.3 การเก็บตัวอย่างและเตรียมตัวอย่างสารสกัดไรแดง

กรองตัวไรแดงล้างด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไรแดงใส่หลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร บดตัวอย่างไรแดงด้วยทึบจากนั้นเติมเอทานอลเข้มข้นปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และดูดส่วนใส (Supernatant) เก็บใส่หลอดเก็บตัวอย่าง จากนั้นกรองสารตัวอย่างสกัดฮอร์โมนจากการแช่ไรแดง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผ่านไซริงค์ฟิลเตอร์เพื่อเตรียมตรวจสอบปริมาณ 17MT ในไรแดงที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ทดสอบต่างๆ

3.2.4 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่และสารละลายมาตรฐาน (Standard solution)

เตรียมเฟสเคลื่อนที่โดยผสมสาร Acetonitrile (HPLC grade) และ Ultrapure water (HPLC grade) ที่อัตราส่วน 60:40 (v/v) และสารละลายมาตรฐานเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.01-0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย 50% เอทานอลแล้วกรองด้วยไซริงค์ฟิลเตอร์ใส่ขวดไวโอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดัดแปลงจากวิธีการของพุทธรัตน์ เบ้าประเสริฐกุล และคณะ (2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 HPLC detection

วิเคราะห์ HPLC อ้างอิงตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Barbosa *et al.* (2013) ด้วย UV detection ที่ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร ซึ่งคอลัมน์ที่ใช้ คือ Inspire™ C₁₈ reverse phase column (ขนาด 150x4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร) เฟสเคลื่อนที่ คือ Acetonitrile: Ultrapure water (60:40 v/v) ที่ปริมาตรการฉีด 10 ไมโครลิตร ด้วยอัตราการไหล (Flow rate) 1 มิลลิิตรต่อนาที และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.2.6 การวิเคราะห์ปริมาณ 17MT ในไรแดง

คำนวณปริมาณฮอร์โมนจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้น 17MT มาตรฐานกับพื้นที่ใต้พีคจากสมการกราฟมาตรฐานและวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนของปริมาณฮอร์โมน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS 16.0

3.3 การศึกษาปริมาณเทสโทสเทอโรนในสมุนไพรมะขาม

3.3.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรมะขาม

ซึ่งผงพืชสมุนไพรมะขามทั้ง 3 ชนิด ชนิดละ 100 กรัม เติมน้ำในเอทานอลเข้มข้น 70% (v/v) ปริมาตร 1000 มิลลิิตร นำไปสกัดด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) กำหนดความเร็วรอบในการเขย่า 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no.1 นำไประเหยเอทานอลด้วยเครื่อง Rotary evaporator แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer (Namchaiw *et al.*, 2021)

3.3.2 การเตรียมสารละลายฮอร์โมนสังเคราะห์ 17MT (Stock solution)

เตรียมสารละลายฮอร์โมน 17MT เข้มข้น ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Jensi *et al.* (2016) โดยละลาย 17MT 100 มิลลิกรัมด้วย 99.9% เอทานอลที่ปริมาตร 10 มิลลิิตร จากนั้นเก็บสารละลายฮอร์โมนเข้มข้น (Stock solution) ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ Barbosa *et al.* (2013)

3.3.3 การวิเคราะห์ HPLC

เทคนิค HPLC–UV ปรับปรุงจากวิธีการของ ประดับ มีสวัสดิ์ (2565) โดยวิเคราะห์หาปริมาณสาร 17MT ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) บริษัท Waters (USA) รุ่น e2695 ตรวจวัดสัญญาณด้วย UV detector กำหนดความยาวคลื่นที่ 245 นาโนเมตร ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คอลัมน์ Water Reliant™ C₁₈ reverse phase ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6x250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร เฟสเคลื่อนที่ใช้คือ Acetonitrile (ACN) และ 0.5% Trifluoroacetic (TFA) ที่อัตราส่วน 70:30 (v/v) กำหนดการไหลแบบ Isocratic elution สัดส่วน 90:10 อัตราการไหลที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรของสารที่ฉีด 10 ไมโครลิตร ระยะเวลาที่ใช้วิเคราะห์ (Run time) 15 นาที

3.3.4 การวิเคราะห์และประเมินปริมาณเทสโทสเตอโรนในสารสกัดหามกระดูก กระชวยดำและกวางเครือแดง

ประมวลผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Empower pro chromatography data software เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 17MT ตามวิธีของระดับ มีสวัสดี (2565) จากนั้นเลือกสมุนไพรมะเขือเทศที่มีปริมาณเทสโทสเตอโรนสูงที่สุดเพื่อการศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรมะเขือเทศต่อการแปลงเพศผู้ในปลานิลต่อไป

3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรมะเขือเทศต่อคุณลักษณะการเติบโตในปลานิล

3.4.1 การเตรียมอาหารทดลอง

(1) เตรียมอาหารสเปร์ยสารสกัดสมุนไพรมะเขือเทศที่มีปริมาณเทสโทสเตอโรนมากที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 60 90 และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร โดยผสมกับ 95% เอทานอล ที่ปริมาตร 25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร สเปร์ยบนอาหารที่มีโปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์ แล้วผึ่งให้แห้ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงจากวิธีการ Ghosal *et al.*, 2016)

(2) เตรียมอาหารสเปร์ยฮอร์โมนแปลงเพศสังเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ผสมสารละลายเข้มข้นกับ 95% เอทานอล ปริมาตร 25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหารสเปร์ยบนอาหารผึ่งให้แห้ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เมธาวิ รอดมงคลดี และวิวัฒนะลีลาภัทร, 2560)

(3) เตรียมอาหารสำหรับทดลองทุกชุดการทดลองผสมสารละลายวัน 1 เปอร์เซ็นต์เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีการเตรียมแบบทุกสัปดาห์

3.4.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

(1) ทำความสะอาดบ่อสำหรับพักปลาและบ่อทดลองปริมาตร 200 ลิตร จากนั้นเติมน้ำลงไป 1/2 บ่อและเติมเกลือที่อัตราส่วน 1 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร เพิ่มระบบเติมอากาศในน้ำ

ด้วยหัวทราย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) นำลูกปลานิลระยะที่ถุงไข่ (Yolk) ยังไม่ยุบ มาพักในบ่อ (อายุประมาณ 3-4 วันหลังฟักออกจากไข่) จากนั้นสุ่มลูกปลาลงบ่อทดลอง บ่อทดลองละ 100 ตัว (ดัดแปลงจากการศึกษาของ Ghosal *et al.*, 2016)

3.4.3 การทดลอง

3.4.3.1 การทดลองที่ 1

แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ประกอบด้วย 5 ชุดการทดลอง ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
อาหาร

ชุดการทดลองที่ 2 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
อาหาร

ชุดการทดลองที่ 3 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
อาหาร

ชุดการทดลองที่ 4 ให้ฮอร์โมนสังเคราะห์ 17MT ที่ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัม
ต่อกิโลกรัมอาหาร

ชุดการทดลองที่ 5 อาหารสำเร็จรูป

ทำการทดลองในระบบหมุนเวียนน้ำแนวตั้งแบบปิด ณ บ้านสวนรุ่งตะวัน เขต
หนองจอก กรุงเทพมหานคร โดยลูกปลานิลอายุประมาณ 3 วัน ซึ่งนำมาจากสถาบันเทคโนโลยีแห่ง
เอเชีย (Asian Institute of Technology; AIT)

(1) สุ่มลูกปลานิลระยะ 3-4 วัน มาเลี้ยงแยกบ่อทดลองในระบบหมุนเวียนน้ำ
แนวตั้งแบบปิด ตามแผนการทดลองละ 100 ตัวต่อชุดการทดลองละจำนวน 3 ซ้ำ อาหารผสม
17MT สารสกัดกระชายดำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันที่ 60, 90, 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
กลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน

(2) อนุบาลลูกปลานิลด้วยอาหารแต่ละชุดการทดลอง โดยมีการให้อาหาร
แบบเต็มอิ่ม วันละ 4 ครั้ง นาน 21 วัน (ดัดแปลงจากวิธีการ Ghosal *et al.*, 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) ระบบหมุนเวียนน้ำแนวตั้งแบบปิดใช้ปั๊มสำหรับตู้ปลา (280 ลิตรต่อชั่วโมง) ซึ่งปรับอัตราไหลที่ 30 ลิตรต่อชั่วโมง เพื่อให้ไหลลงสู่ภาชนะพลาสติกแต่ละใบโดยไม่ต้องเติมอากาศ

(4) สิ่งขับถ่ายและอาหารที่เหลือที่ด้านล่างของภาชนะพลาสติกจะถูกดูดออกเพื่อนำออกทุกๆ 3 วัน

(5) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง น้ำหนักรวมของปลา จำนวนรอดชีวิต และความยาวแต่ละตัวจะถูกบันทึกหลังอดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสุ่มตัวอย่างปลา 10 ตัว เพื่อการตรวจเพศต่อไป

3.4.3.2 การทดลองที่ 2

แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ประกอบด้วย 5 ชุดการทดลอง ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

ชุดการทดลองที่ 2 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

ชุดการทดลองที่ 3 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

ชุดการทดลองที่ 4 ให้ฮอร์โมนสังเคราะห์ 17MT ที่ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

ชุดการทดลองที่ 5 อาหารสำเร็จรูป

ทำการทดลองในระบบหมุนเวียนน้ำแนวตั้งแบบปิด ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยลูกปลานิลอายุประมาณ 3 วัน นำมาจากสถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (Asian Institute of Technology; AIT)

(1) สุ่มลูกปลานิลระยะอายุ 3-4 วัน มาเลี้ยงแยกกล่องทดลองขนาดกว้าง 24 ยาว 35 สูง 20 เซนติเมตร ที่ระดับน้ำสูง 15 เซนติเมตร ตามแผนการทดลองละ 100 ตัว ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ อาหารผสม 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือ 60, 90, 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม กลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน

(2) อนุบาลลูกปลานิลด้วยอาหารแต่ละชุดการทดลอง โดยให้อาหารแบบเต็มอิ่ม วันละ 4 ครั้ง นาน 21 วัน (ดัดแปลงจากวิธีการ Ghosal *et al.*, (2016))

(3) ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำในระบบที่เลี้ยงวันเว้นวัน วัดค่าคุณภาพน้ำ pH DO และอุณหภูมิทุกสัปดาห์

(4) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง น้ำหนักรวมของปลา จำนวนรอดชีวิต และความยาวแต่ละตัวจะถูกบันทึก หลังอดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายลงบ่อเลี้ยงซีเมนต์เพื่อทำการเลี้ยงต่อไปจนอายุอย่างน้อย 30 วัน เพื่อการตรวจเพศด้วยเนื้อเยื่อ

3.4.3.3 การทดลองครั้งที่ 3

แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD)

ประกอบด้วย 4 ชุดการทดลอง ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

ชุดการทดลองที่ 2 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

ชุดการทดลองที่ 3 ให้ฮอร์โมนสังเคราะห์ 17MT ที่ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารสำเร็จรูป

ทำการทดลองในระบบหมุนเวียนน้ำแนวตั้งแบบปิด ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยลูกปลานิลอายุประมาณ 3-4 วัน นำมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด จังหวัดสมุทรปราการ

(1) ลูกปลานิลระยะอายุ 3-5 วัน มาเลี้ยงแยกบ่อตามแผนการทดลองละ 100 ตัว ชุดการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ โดยอาหารผสม 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 60, 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทดลองเลี้ยงในระบบหมุนเวียนน้ำแนวตั้งแบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปิดระบบที่ 1 กลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน ทดลองเลี้ยงในระบบหมุนเวียนน้ำแนวตั้งแบบปิดระบบที่ 2

(2) อนุบาลลูกปลานิลด้วยอาหารแต่ละชุดการทดลอง โดยให้อาหารแบบเต็ม อิ่ม วันละ 4 ครั้ง นาน 21 วัน (ดัดแปลงจากวิธีการ Ghosal *et al.*, (2016))

(3) ระบบระบบหมุนเวียนน้ำแนวตั้งแบบปิดที่ 1 ใช้ปั๊มสำหรับตู้ปลา 2800 ลิตรต่อชั่วโมง ระบบระบบหมุนเวียนน้ำแนวตั้งแบบปิดที่ 2 ใช้ปั๊มสำหรับตู้ปลา 4000 ลิตรต่อ ชั่วโมง เพื่อให้ไหลลงสู่ภาชนะทดลองแต่ละใบโดยไม่ต้องเติมอากาศ

(4) สิ่งขับถ่ายและอาหารที่เหลือที่ด้านล่างของภาชนะพลาสติก จะถูกดูดออก เพื่อนำออกทุก 1-3 วัน

(5) ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำในถังพัก 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำในระบบที่ เลี้ยงวันเว้นวัน สุ่มวัดค่าคุณภาพน้ำ pH DO และอุณหภูมิทุกสัปดาห์

(6) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง น้ำหนักรวมของปลา จำนวนรอดชีวิต และความยาว แต่ละตัวจะถูกบันทึกหลังอดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสุ่มตัวอย่างปลา 10 ตัว เพื่อการ ตรวจเพศต่อไป

3.4.4 การบันทึกผล

(1) บันทึกการเติบโตโดยวัดความยาว (Total length) และชั่งน้ำหนัก (Body weight) ทุกสัปดาห์ นับจำนวนรอดชีวิตเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 21 วัน

(2) ตรวจสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาวิธีสีย้อมและเนื้อเยื่อตับ ดัดแปลงจากวิธีการของ Mumford (2004) ดังนี้

การดองตัวอย่าง (Fixative)

(1) เตรียมน้ำยาดองให้เพียงพอ โดยทั่วไปการดองจะใช้ปริมาณ 1:10 (ตัวอย่าง 10 กรัม จะใช้น้ำยาดอง 100 มิลลิลิตร)

(2) การเตรียมน้ำยาดองเดวิดสัน (Davidson's fixative) มีส่วนประกอบดังนี้

(2.1) 95% Ethyl alcohol 320 มิลลิลิตร

(2.2) 37% Formalin 220 มิลลิลิตร

(2.3) Glacial acetic acid 115 มิลลิลิตร

(2.4) Distilled water 335 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) นำลูกปลาใส่ขวดตอง เติมน้ำยาตองเดวิดสันแช่ 24 ชั่วโมง ให้น้ำยาตองท่วมตัวอย่าง แล้วเปลี่ยนเป็น 70% เอทานอลแทนที่หลังครบ 24 ชั่วโมง

การเตรียมตัวอย่างเพื่อเข้าขั้นตอน Dehydration Decalcification และ Clearing ด้วย Tissue processor

(1) นำตัวอย่างลูกปลาย้ายลง cassette box แช่ในน้ำไหลผ่านอย่างน้อย 30 นาที เติมน้ำยากำจัดแคลเซียม แช่ตัวอย่างนาน 24 ชั่วโมง การเตรียมน้ำยากำจัดแคลเซียม มีส่วนประกอบดังนี้

(1.1) $AlCl_3$	7 กรัม
(1.2) HCl	8.5 มิลลิลิตร
(1.3) Formic acid	5 มิลลิลิตร
(1.4) Distilled water	87 มิลลิลิตร

(2) นำตัวอย่างลูกปลาหลังกำจัดแคลเซียมแช่ในน้ำไหลผ่านอย่างน้อย 30 นาที และตัดแต่งชิ้นส่วนเนื้อเยื่อโดยอัดชิ้นเนื้อด้วยฟองน้ำลง Cassette box และนำตัวอย่างเข้าเครื่อง Tissue processor

ขั้นตอนการทำงานของ Tissue processor ดังนี้ ตามลำดับ

(2.1) 50% Ethyl alcohol	1 ชั่วโมง
(2.2) 70% Ethyl alcohol	1 ชั่วโมง
(2.3) 80% Ethyl alcohol	1 ชั่วโมง
(2.4) 95% Ethyl alcohol	1 ชั่วโมง
(2.5) 100% Ethyl alcohol I	1 ชั่วโมง
(2.6) 100% Ethyl alcohol II	1 ชั่วโมง
(2.7) 100% Ethyl alcohol III	1 ชั่วโมง
(2.8) Xylene I	1 ชั่วโมง
(2.9) Xylene II	1 ชั่วโมง
(2.10) Paraffin I	1 ชั่วโมง
(2.11) Paraffin II	1 ชั่วโมง

(3) นำตัวอย่างออกจากเครื่องเพื่อเตรียมบล็อกและฝังตัวอย่างลงพาราฟิน

การเตรียมบล็อกและฝังตัวอย่างลงพาราฟิน (Embedding)

- (1) ก่อนนำตัวอย่างออกจากเครื่อง Tissue processor ควรทำการเปิดแท่นอุ่นบล็อกพาราฟินและหม้อต้มพาราฟินให้ละลาย ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส
- (2) หลังจากนำตะกร้าใส่บล็อกตัวอย่างออกจากเครื่อง นำบล็อกตัวอย่างไปอุ่นในแท่นอุ่นพาราฟินที่ละลายแล้ว
- (3) แกะฝาปิดตลับบล็อกออก แล้วใช้ปากคีบคีบขึ้นเนื้อตัวอย่างออกจากตลับ ตรวจดูแนวการวางชิ้นเนื้อว่าจะวางแนวใดให้เรียบร้อย
- (4) เติมพาราฟิน ที่ละลายแล้วจากหม้อต้มพาราฟิน ใส่ Mold ให้สูง 1/2 ของ Mold แล้ววางชิ้นเนื้อตัวอย่างลงไป
- (5) วางบล็อกทับ Mold แล้วเติมพาราฟินลงไป 1/2 ของบล็อก รอให้พาราฟินแข็งตัว โดยสังเกตได้จากสีของพาราฟินที่จะเปลี่ยนเป็นสีขุ่น จากนั้นเติมพาราฟินลงไปให้เต็มบล็อกแล้วรอให้พาราฟินแข็งตัว แกะบล็อกชิ้นเนื้อออกจาก Mold และรอดตัดด้วยเครื่อง Microtome ต่อไป

การเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อ (Section)

- (1) เปิดเครื่อง Cooling plate ทิ้งไว้ให้เย็นแล้ว ให้นำบล็อกชิ้นเนื้อที่แกะไว้นามาวาง โดยคว่ำด้านหน้าพาราฟินไว้บน Cooling plate ให้พาราฟินและชิ้นเนื้อเย็นอยู่ตลอดเวลา เพื่อให้ง่ายต่อการตัดชิ้นเนื้อ
- (2) นำบล็อกชิ้นเนื้อที่เย็นแล้ว Trim เนื้อเยื่อที่ขนาดหนา 10-20 ไมครอน ให้ถึงชิ้นเนื้อตัวอย่าง แล้วตัดตัวอย่างที่ความหนาขนาด 5 ไมครอน
- (3) ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตัดจะถูกนำไปลอยในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ใช้สำหรับลอยชิ้นเนื้อ โดยตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 45 องศาเซลเซียส
- (4) จากนั้นใช้สไลด์ที่ทำความสะอาดแล้ว ซ้อนตัวอย่างขึ้นมา นำสไลด์ที่มีตัวอย่างไปวางบน Slide warmer ทิ้งไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง เพื่อให้เนื้อเยื่อยึดเกาะกับสไลด์เพื่อเตรียมนำไปย้อมสีเนื้อเยื่อในขั้นตอนต่อไป

การย้อมและเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อถาวร (Staining)

ในส่วนของการย้อมสไลด์จะแบ่งเป็นสามส่วนหลัก คือ การล้างพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ การดึ้งน้ำออกจากเนื้อเยื่อและการย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin ก่อนนำไปเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อถาวร มีขั้นตอนดังนี้

(1) Xylene I	3-5 นาที
(2) Xylene II	3-5 นาที
(3) 100% EtOH I	2 นาที
(4) 100% EtOH II	2 นาที
(5) 95% EtOH	1-2 นาที
(6) 70% EtOH	1-2 นาที
(7) Tap water	3-5 นาที
(8) Hematoxylin	1-5 นาที
(9) Tap water	3-5 นาที
(10) 70% EtOH	1-2 นาที
(11) 95% EtOH	1-2 นาที
(12) Eosin	1-2 นาที
(13) 95% EtOH	1-2 นาที
(14) 100% EtOH	1-2 นาที
(15) 100% EtOH	1-2 นาที
(16) 100% EtOH	1-2 นาที
(17) Xylene I	1-2 นาที
(18) Xylene II	1-2 นาที
(19) Xylene III	1-2 นาที
(20) Permount	

3.4.5 การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนของปริมาณฮอร์โมน อัตราการรอดตาย อัตราการเติบโต น้ำหนักเฉลี่ยและความยาวเฉลี่ย โดยนำข้อมูลที่ได้อาวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยแบบ One way analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 95% ($p < 0.05$) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Systat Version 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ข้อมูลคุณลักษณะการเติบโต

$$\text{น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)} = \frac{\text{น้ำหนักปลารวม}}{\text{จำนวนปลาทั้งหมด}} \dots\dots\dots(1)$$

$$\text{ความยาวเฉลี่ย (เซนติเมตร)} = \frac{\text{ความยาวรวม}}{\text{จำนวนปลาทั้งหมด}} \dots\dots\dots(2)$$

$$\text{อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนปลาทั้งหมด} - \text{จำนวนปลาที่ตาย}}{\text{จำนวนปลาทั้งหมด}} \times 100 \dots\dots\dots(3)$$

$$\text{อัตราการเติบโต (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักปลาหลังสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น}} \times 100 \dots\dots\dots(4)$$



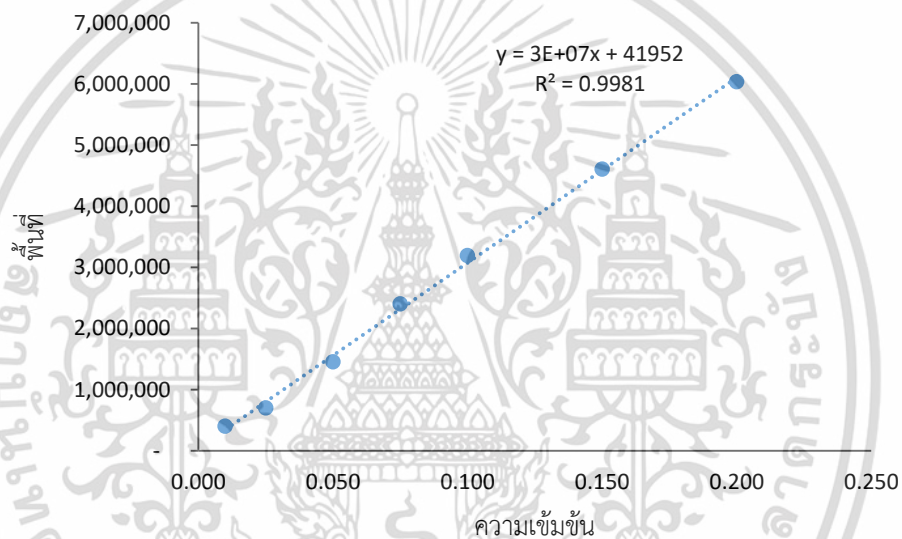
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาปริมาณ 17MT ในไรแดงที่แช่ด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์

ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐาน 17MT ด้วยเครื่อง HPLC-UV สมการที่ได้ คือ $y = 3E+07x + 41952$, $R^2 = 0.9981$ (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน 17MT ช่วงความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

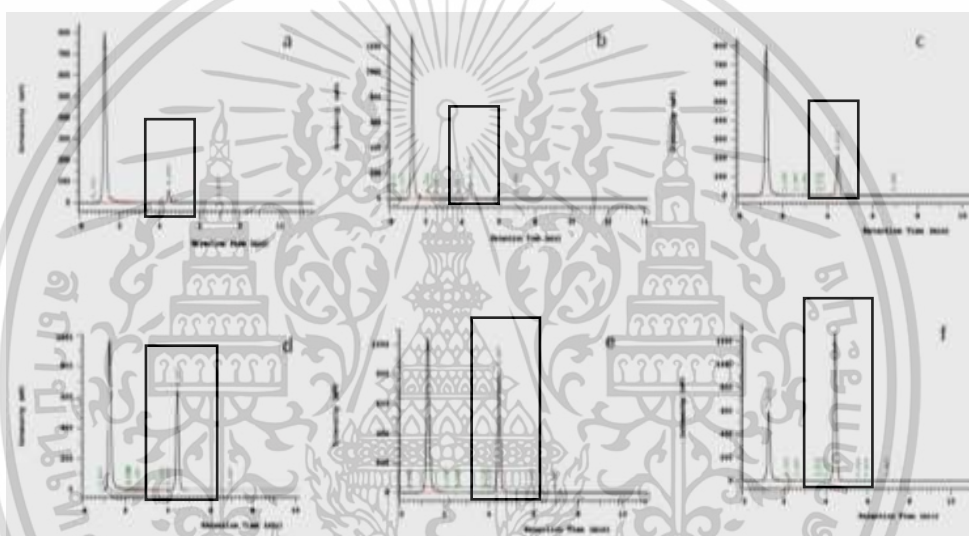
ผลจากการตรวจสอบตัวอย่างสารสกัดไรแดงที่แช่ในฮอร์โมนที่ ระดับความเข้มข้นของ 17MT 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการแช่ 30, 60 และ 420 นาที พบปริมาณฮอร์โมน 17MT จากตัวอย่างไรแดงหลังจากแช่นาน 30 นาที เท่ากับ 0.02 ± 0.02 และ 0.16 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ช่วงที่แช่นาน 60 นาที เท่ากับ 0.05 ± 0.02 และ 0.23 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และในช่วง 420 นาที เท่ากับ 0.12 ± 0.06 และ 0.46 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณ 17MT ของทั้ง 2 กลุ่มในทุกช่วงเวลาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.1) พบการปรากฏของ 17MT จะอยู่ในช่วง 4.44-4.56 นาที (ภาพที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณ 17MT ที่ในไรแดงที่แช่ด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 30, 60 และ 420 นาที

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณ 17MT (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	30 (นาที)	60 (นาที)	420 (นาที)
50	0.02±0.02 ^b	0.05±0.02 ^b	0.12±0.06 ^a
100	0.16±0.02 ^c	0.23±0.02 ^b	0.46±0.10 ^a

*ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในแนวนอน



ภาพที่ 4.2 โครมาโทแกรม 17MT ในไรแดงที่แช่ด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เวลาที่ 30, 60 และ 420 นาที (50 มิลลิกรัมต่อลิตร; (a); 30 นาที, (b); 60 นาที และ (c); 420 นาที และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร; (d); 30 นาที, (e); 60 นาที และ (f); 420 นาที)

ที่มา: Pilapang *et al.* (2022)

การตรวจหา 17MT ในน้ำหลังจากแช่ไรแดงที่ระดับความเข้มข้นของ 17MT เท่ากับ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังการแช่นาน 30 นาที เท่ากับ 0.04±0.00 และ 0.05±0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หลังการแช่นาน 60 นาที เท่ากับ 0.04±0.00 และ 0.04±0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และหลังการแช่นาน 420 นาที เท่ากับ 0.03±0.00 และ 0.04±0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณ 17MT ของทั้ง 2 ความเข้มข้นในทุกช่วงเวลาแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

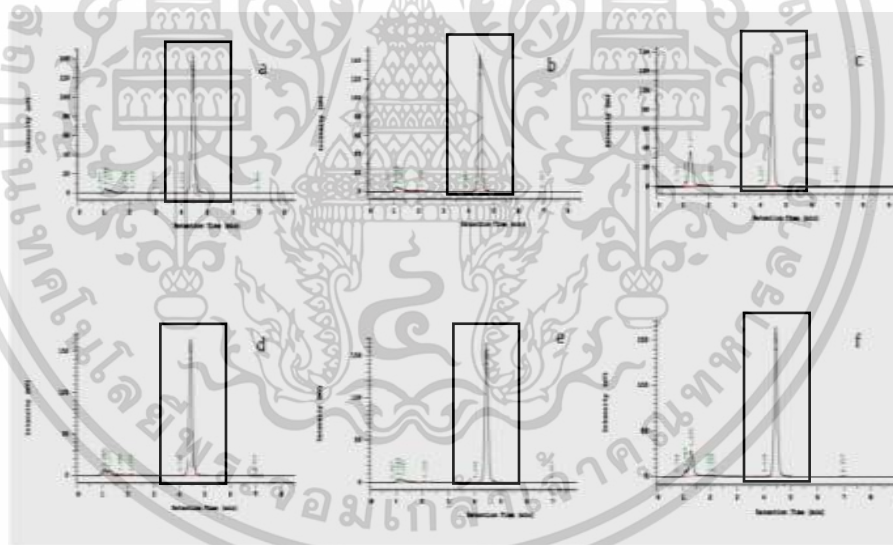
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 4.2) และผลจากการตรวจสอบระยะเวลาการปรากฏ 17MT ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 30, 60 และ 420 นาที มีระยะเวลาเฉลี่ยเท่ากับ 4.44 นาที (ภาพที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณ 17MT จากน้ำหลังการแช่ไรแดงที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 30, 60 และ 420 นาที

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณ 17MT (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	30 (นาที)	60 (นาที)	420 (นาที)
50	0.04±0.00 ^a	0.04±0.00 ^a	0.03±0.00 ^a
100	0.05±0.03 ^a	0.04±0.03 ^a	0.04±0.03 ^a

*a ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในแนวนอน



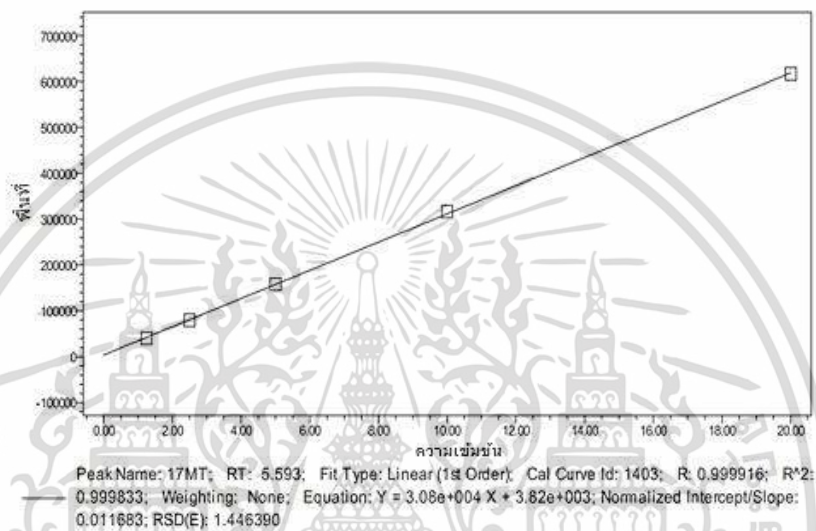
ภาพที่ 4.3 โครมาโทแกรม 17MT ในน้ำหลังการแช่ไรแดงที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และเวลาที่ 30, 60 และ 420 นาที (50 มิลลิกรัมต่อลิตร; (a); 30 นาที, (b); 60 นาที และ (c); 420 นาที และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร; (d); 30 นาที, (e); 60 นาที และ (f); 420 นาที)

ที่มา: Pilapang et al. (2022)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาปริมาณเทสโทสเตอโรนในสมุนไพรมะเขือเทศ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร 17MT จากสารสกัดกระชายดำ กวาวเครือแดง หนามกระสุน ด้วยเครื่อง HPLC-UV สมการที่ได้ $y = 3.8e + 004X + 3.82e + 003$, $R^2 = 0.9998$ ดังภาพประกอบที่ 4.4



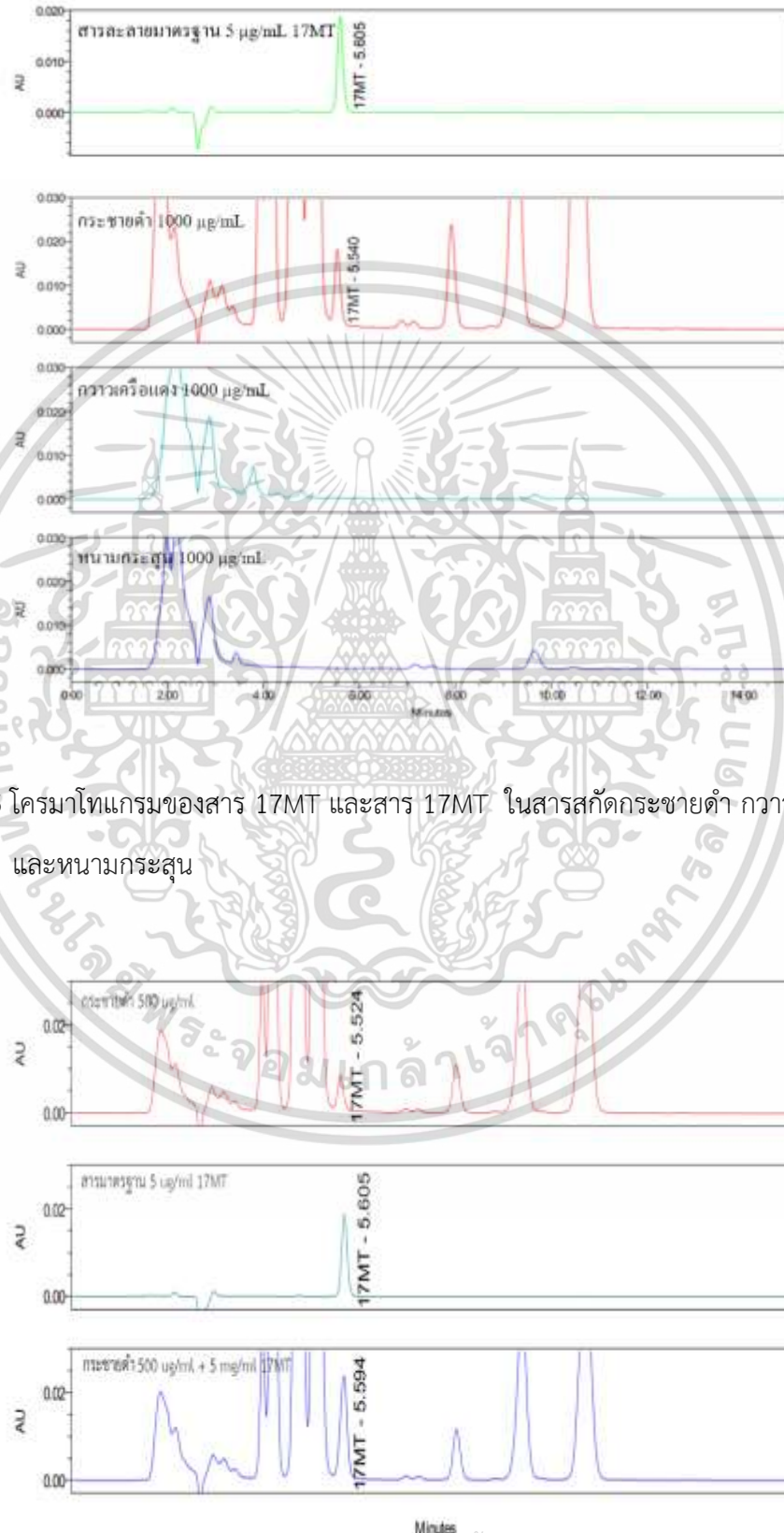
ภาพที่ 4.4 Calibration curve ของสารมาตรฐาน 17MT ช่วงความเข้มข้น 1.25, 2.5, 5, 10, 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

พบโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน 17MT ปรากฏที่เวลา 5.605 นาที และสาร 17MT ในกระชายดำ ปรากฏที่เวลา 5.54 นาที ไม่ปรากฏโครมาโทแกรมของสาร 17MT ในสารสกัดกวาวเครือแดงและหนามกระสุน นั้นหมายความว่าปริมาณสาร 17MT อาจจะมีน้อยมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้ (ภาพที่ 4.5)

เมื่อนำสารสกัดจากกระชายดำมาทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy) พิจารณาจากร้อยละของการกลับคืน (%Recovery) ของสารมาตรฐาน 17MT ที่เติมลงในตัวอย่างที่สกัด พบว่ามีร้อยละของการกลับคืนเท่ากับ 106.7 ซึ่งเกณฑ์ที่มาตรฐานกำหนดโดยเกณฑ์ที่ยอมรับได้นี้ต้องอยู่ระหว่าง 80–110 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.6) ผลของปริมาณสาร 17MT สูงสุดพบในสารสกัดกระชายดำที่ 4.227 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมสารสกัด โดยปริมาณ 17MT ที่ตรวจพบและปริมาณสารสกัดของสมุนไพรมะเขือเทศต่างๆ สรุปไว้ดังตารางที่ 4.3 และตารางที่ 4.4 และจากการทดลองนี้พบปริมาณ 17MT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากที่สุดในการชงชาดำ ดังนั้นจึงใช้กระชายดำในการศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรต่อคุณลักษณะการเติบโตในปลานิล



ภาพที่ 4.5 โครมาโทแกรมของสาร 17MT และสาร 17MT ในสารสกัดกระชายดำ กวาวเครือแดง และหนามกระสุน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.6 ทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy) โดยการ Spike สารมาตรฐาน 17MT ลงในสารสกัดกระชายดำ

ตารางที่ 4.3 ปริมาณสาร 17MT ที่ตรวจพบในสารสกัดกระชายดำ กวาวเครือแดง และหนามกระสุน

ชนิดสมุนไพร	ปริมาณสาร 17MT (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมสารสกัด)
กระชายดำ	4.227
หนามกระสุน	0.152
กวาวเครือแดง	0.179

หมายเหตุ ปริมาณสาร 17MT จากสารสกัดหนามกระสุนและสารสกัดกวาวเครือแดง ได้จากการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟของสารสกัดที่ Spiked ด้วยสารมาตรฐาน 17MT ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารสกัดจากกระชายดำ กวาวเครือแดง และหนามกระสุน

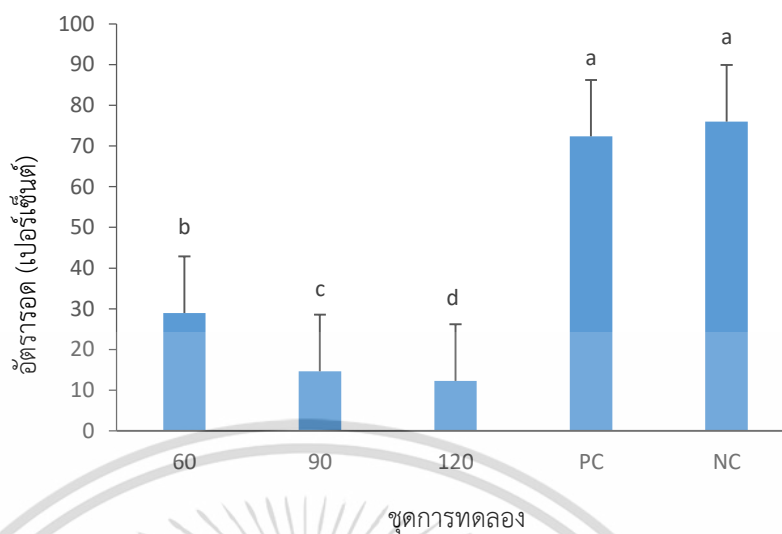
ชนิดสมุนไพร	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)
กระชายดำ	100	5.7
กวาวเครือแดง	100	5
หนามกระสุน	100	4.7

4.3 การศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรต่อคุณลักษณะการเติบโตในปลานิล

4.3.1 การทดลองที่ 1

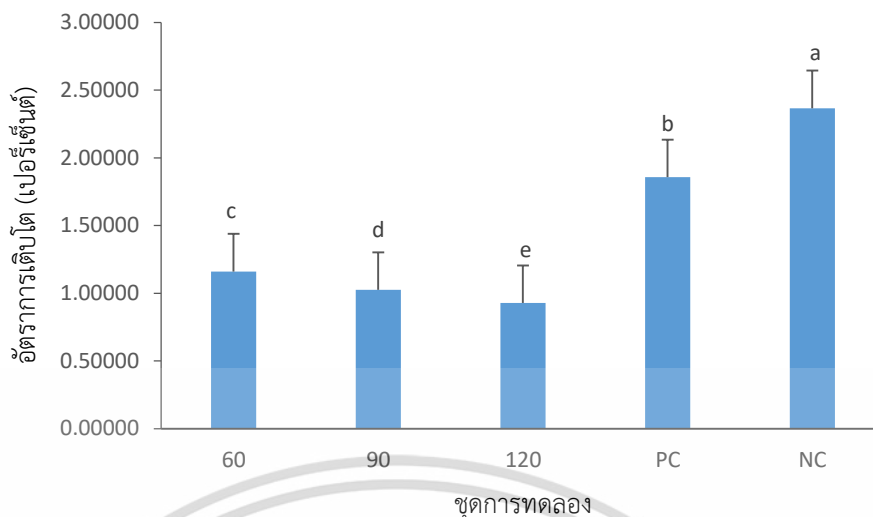
อัตราการรอดหลังสิ้นสุดการทดลองการให้อาหารผสม 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันที่ 60, 90, และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ควบคู่กับกลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17MT หลังจากการทดลอง 21 วัน อัตราการรอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) พบอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่เท่ากับ 29 ± 3.46 , 14.67 ± 2.08 , 12.33 ± 5.03 , 72.33 ± 11.01 , และ 76 ± 22.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และอัตราการรอดสูงสุด คือ กลุ่มทดลองที่ไม่ได้รับฮอร์โมน (ภาพที่ 4.7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



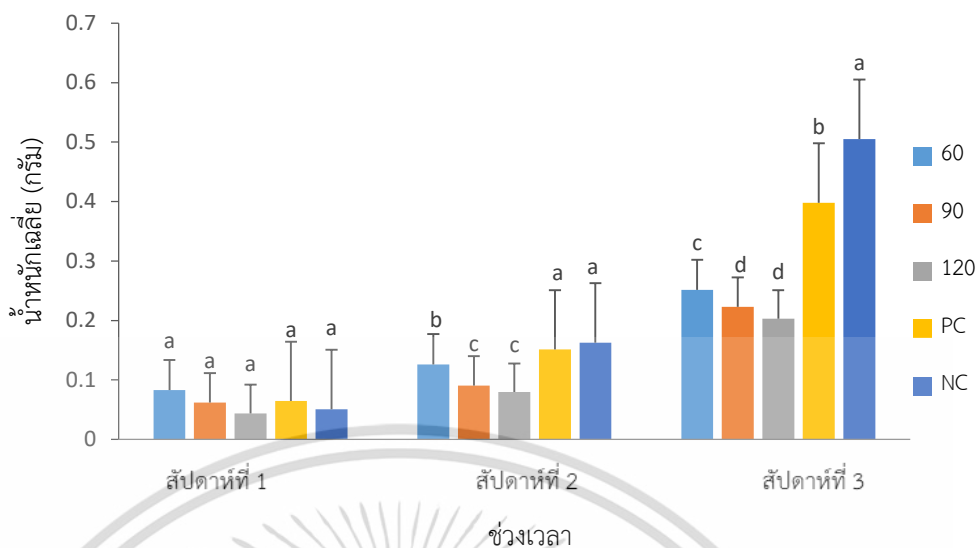
ภาพที่ 4.7 อัตราคาร์โบไฮเดรตของลูกปลานิลหลังสิ้นสุดการทดลองการทดลองที่ 1 (60; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 90; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 120; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, PC; กลุ่มควบคุม 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ NC; กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน)

อัตราการเติบโตหลังสิ้นสุดการทดลองการให้อาหารผสม 17MT จากสารสกัดกระชายดำ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันที่ 60, 90, และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ควบคู่กับกลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17MT หลังการทดลอง 21 วัน อยู่ที่ 1.16 ± 0.29 , 1.02 ± 0.10 , 0.93 ± 0.44 , 1.86 ± 0.33 , และ 2.37 ± 0.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยการเติบโตสูงสุดในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมนที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17MT อยู่ที่เท่ากับ 1.86 และ 2.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งอัตราการเติบโตมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 4.8)



ภาพที่ 4.8 อัตราการเติบโตของลูกปลานิลหลังสิ้นสุดการทดลองที่ 1 (60; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 90; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 120; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, PC; กลุ่มควบคุม 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ NC; กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน)

การทดลองการให้อาหารผสม 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันที่ 60, 90, และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ควบคู่กับกลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17MT หลังการทดลอง 21 วัน มีน้ำหนักเฉลี่ยแต่ละสัปดาห์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) น้ำหนักเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 1 อยู่ที่เท่ากับ 0.08 ± 0.04 , 0.06 ± 0.03 , 0.04 ± 0.01 , 0.06 ± 0.00 และ 0.05 ± 0.01 กรัม ตามลำดับ แต่พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 2 อยู่ที่ 0.12 ± 0.00 , 0.09 ± 0.01 , 0.07 ± 0.00 , 0.15 ± 0.01 และ 0.16 ± 0.01 กรัม ตามลำดับ และมีน้ำหนักเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 3 อยู่ที่ 0.25 ± 0.06 , 0.22 ± 0.02 , 0.20 ± 0.09 , 0.39 ± 0.07 และ 0.50 ± 0.08 กรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 4.9)

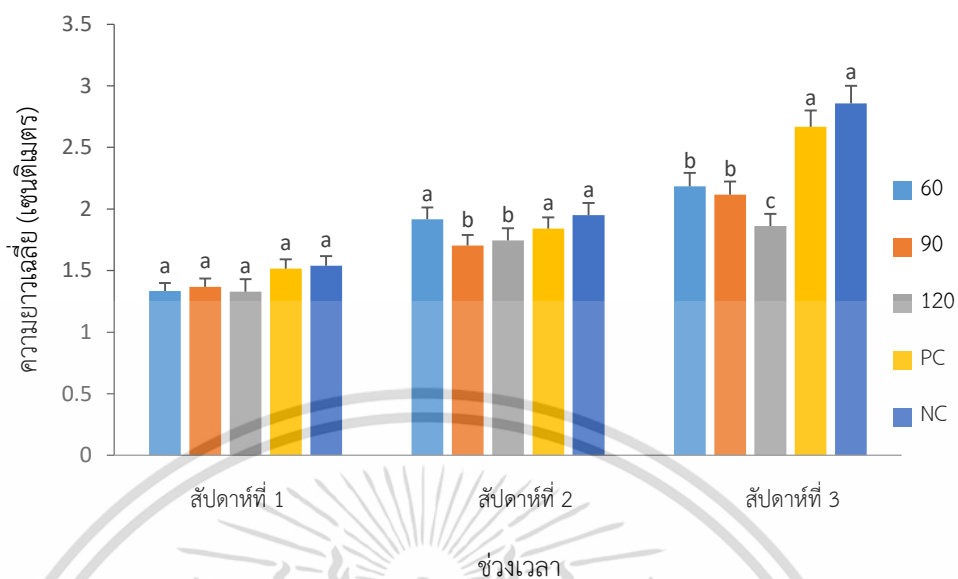


ภาพที่ 4.9 น้ำหนักเฉลี่ยการทดลองที่ 1 (60; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 90; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 120; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, PC; กลุ่มควบคุม 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ NC; กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน)

การทดลองการให้อาหารผสม 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันที่ 60, 90, และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ควบคู่กับกลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17MT หลังจากการทดลอง 21 วัน พบว่าความยาวเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งในสัปดาห์ที่ 1 อยู่ที่เท่ากับ 1.33 ± 0.01 , 1.36 ± 0.06 , 1.33 ± 0.01 , 1.51 ± 0.01 และ 1.54 ± 0.08 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของในทุกกลุ่มการทดลอง ($p < 0.05$) มีความยาวเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 2 อยู่ที่ 1.91 ± 0.02 , 1.70 ± 0.15 , 1.74 ± 0.00 , 1.84 ± 0.11 และ 1.95 ± 0.09 เซนติเมตร ตามลำดับ และในสัปดาห์ที่ 3 อยู่ที่เท่ากับ 2.18 ± 0.10 , 2.11 ± 0.17 , 1.86 ± 0.17 , 2.66 ± 0.08 และ 02.85 ± 0.17 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.10)

โดยค่าคุณภาพน้ำในระบบทดลองแนวตั้ง ที่ติดตั้งเครื่องวัดวัดอัตโนมัติในถังพักน้ำ มีความเป็นกรดต่าง (pH) อยู่ที่ 7.1-8.4 ค่าออกซิเจนละลายน้ำ (DO) 5.5-6.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิ 27-28 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 ความยาวเฉลี่ยการทดลองที่ 1 (60; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 90; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 120; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, PC; กลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ NC; กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน)

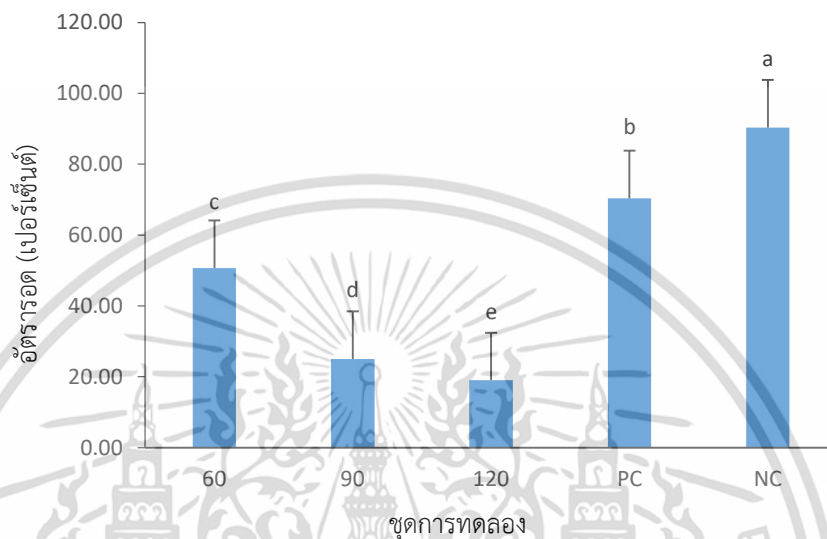
ตารางที่ 4.5 ค่าคุณภาพน้ำในระบบทดลองแนวตั้งการทดลองที่ 1

คุณภาพน้ำ	ค่าเฉลี่ย
ความเป็นกรดต่าง (pH)	7.7-8.4
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO; มิลลิกรัมต่อลิตร)	5.5-6.5
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	27-28

4.3.2 การทดลองที่ 2

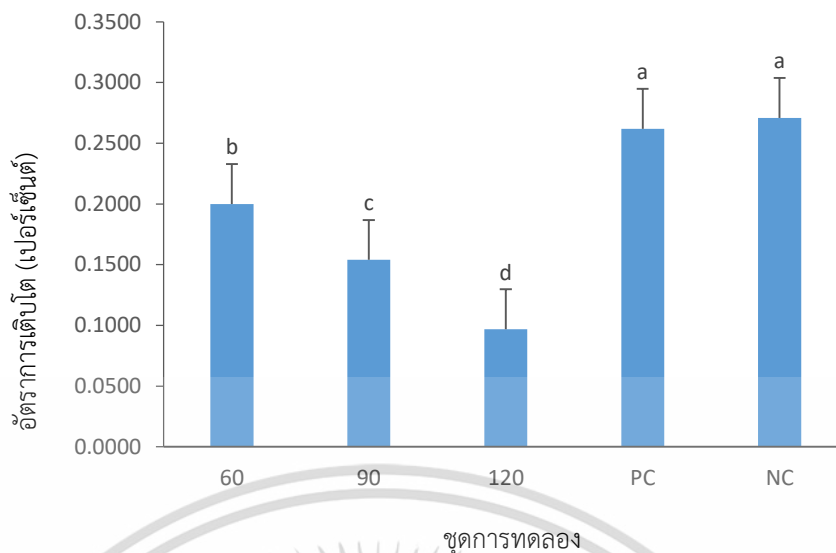
อัตราการรอดหลังสิ้นสุดการทดลองการให้อาหารผสม 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันที่ 60, 90, และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ควบคู่กับกลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17MT หลังจากการทดลอง 21 วัน พบเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการรอดชีวิต เท่ากับ 50.67 ± 4.04 , 25.00 ± 8.72 , 19.00 ± 3.61 , 70.33 ± 22.72 , และ 90.33 ± 2.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อัตราการรอดสูงสุด คือ กลุ่มทดลองที่ไม่ได้รับฮอร์โมน (ภาพที่ 4.11)



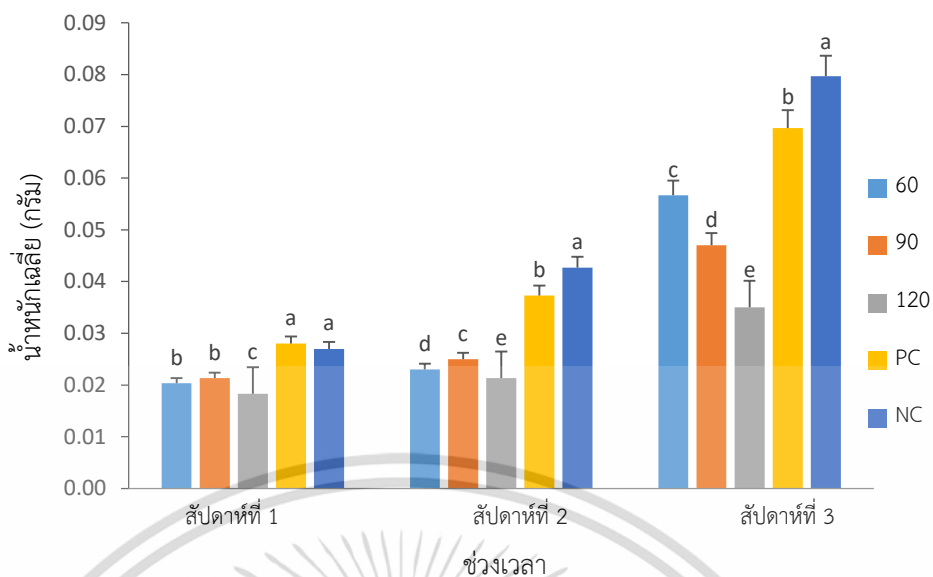
ภาพที่ 4.11 อัตราการรอดของลูกปลานิลหลังสิ้นสุดการทดลองที่ 2 (60; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 90; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 120; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, PC; กลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ NC; กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน)

อัตราการเติบโตหลังสิ้นสุดการทดลองการให้อาหารผสม 17MT จากสารสกัดกระชายดำ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันที่ 60, 90, และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม กลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17MT หลังการทดลอง 21 วัน อัตราการมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เท่ากับ 0.20 ± 0.02 , 0.15 ± 0.04 , 0.09 ± 0.02 , 0.26 ± 0.01 , และ 0.27 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยการเติบโตสูงสุดในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมนที่ระดับ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17MT เท่ากับ 0.26 และ 0.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.12)



ภาพที่ 4.12 อัตราการเติบโตของลูกปลานิลหลังสิ้นสุดการทดลองที่ 2 (60; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 90; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 120; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, PC; กลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ NC; กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน)

การทดลองการให้อาหารผสม 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันที่ 60, 90, และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ควบคู่กับกลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17MT หลังจากการทดลอง 21 วัน พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 1 อยู่ที่เท่ากับ 0.02 ± 0.00 , 0.02 ± 0.00 , 0.01 ± 0.00 , 0.03 ± 0.00 และ 0.03 ± 0.00 กรัม ตามลำดับ มีน้ำหนักเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 2 อยู่ที่ 0.02 ± 0.00 , 0.02 ± 0.00 , 0.02 ± 0.00 , 0.04 ± 0.00 และ 0.04 ± 0.00 กรัม ตามลำดับ และมีน้ำหนักเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 3 อยู่ที่ 0.05 ± 0.00 , 0.04 ± 0.01 , 0.03 ± 0.00 , 0.07 ± 0.00 และ 0.08 ± 0.00 กรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 4.13)

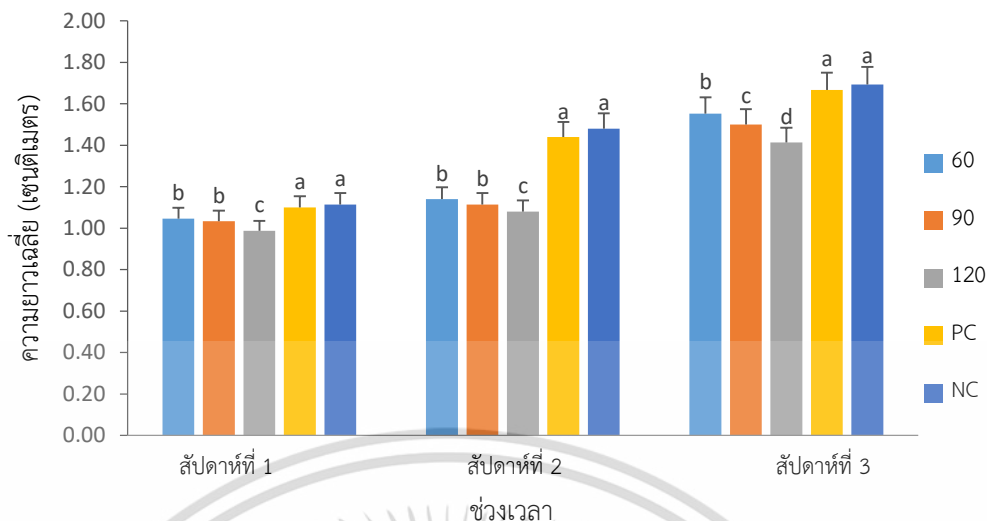


ภาพที่ 4.13 น้ำหนักเฉลี่ยการทดลองที่ 2 (60; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 90; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 120; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, PC; กลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ NC; กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน)

การทดลองการให้อาหารผสม 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันที่ 60, 90, 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ควบคู่กับกลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17MT หลังการทดลอง 21 วัน พบว่าความยาวเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งมีความยาวเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 1 อยู่ที่ 1.04 ± 0.02 , 1.03 ± 0.04 , 0.98 ± 0.02 , 1.10 ± 0.03 และ 1.11 ± 0.03 เซนติเมตร ตามลำดับ มีความยาวเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 2 อยู่ที่ 1.34 ± 0.02 , 1.11 ± 0.01 , 1.08 ± 0.02 , 1.44 ± 0.03 และ 1.48 ± 0.02 เซนติเมตร ตามลำดับ และความยาวเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 3 อยู่ที่ 1.55 ± 0.04 , 1.50 ± 0.04 , 1.41 ± 0.01 , 1.66 ± 0.05 และ 1.69 ± 0.02 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.14)

โดยค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำเฉลี่ยระหว่างทดลองในกล่องทดลอง มีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) อยู่ที่เท่ากับ 8.31 ± 0.04 ค่าออกซิเจนละลายน้ำ (DO) 6.28 ± 0.27 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิ 27.67 ± 0.05 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.14 ความยาวเฉลี่ยการทอดครั้งที่ 2 (60; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 90; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 120; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, PC; กลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ NC; กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน)

ตารางที่ 4.6 ค่าคุณภาพน้ำในการทดลองครั้งที่ 2

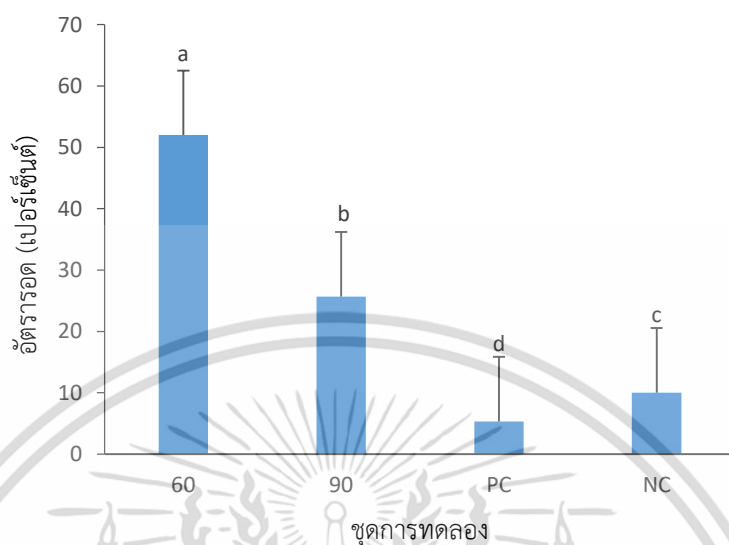
คุณภาพน้ำ	ค่าเฉลี่ย
ความเป็นกรดต่าง (pH)	8.31±0.04
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO; มิลลิกรัมต่อลิตร)	6.28±0.27
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	27.67±0.05

4.3.3 การทอดครั้งที่ 3

อัตราการรอดหลังสิ้นสุดการทดลองการให้อาหารผสม 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันที่ 60, 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ควบคู่กับกลุ่มควบคุม 17MT ที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17MT หลังการทดลอง 21 วัน พบอัตราการรอดชีวิต เท่ากับ 52.00 ± 7.00 , 25.66 ± 2.08 , 5.33 ± 4.04 , และ 10.00 ± 2.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

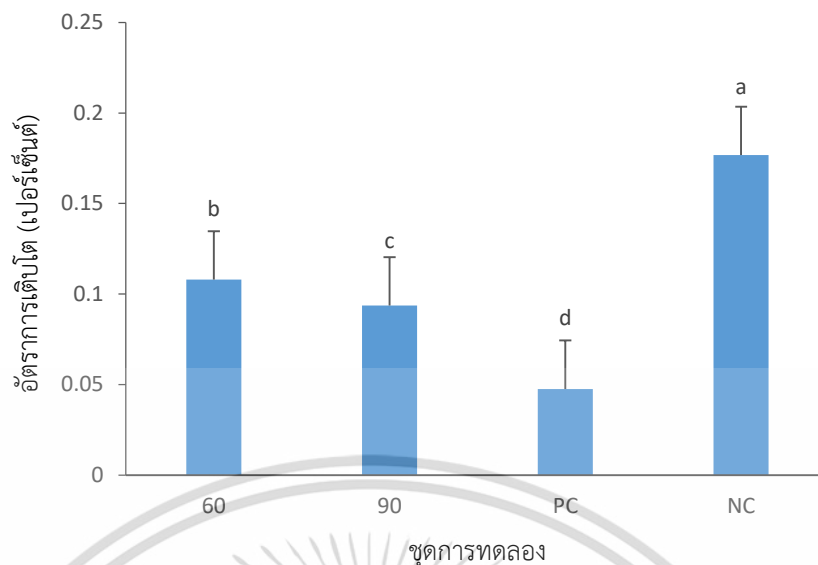
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ภาพที่ 4.15) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อัตรารอดสูงสุด คือ กลุ่มทดลองที่ได้รับฮอร์โมนจากสารสกัดกระชายดำ



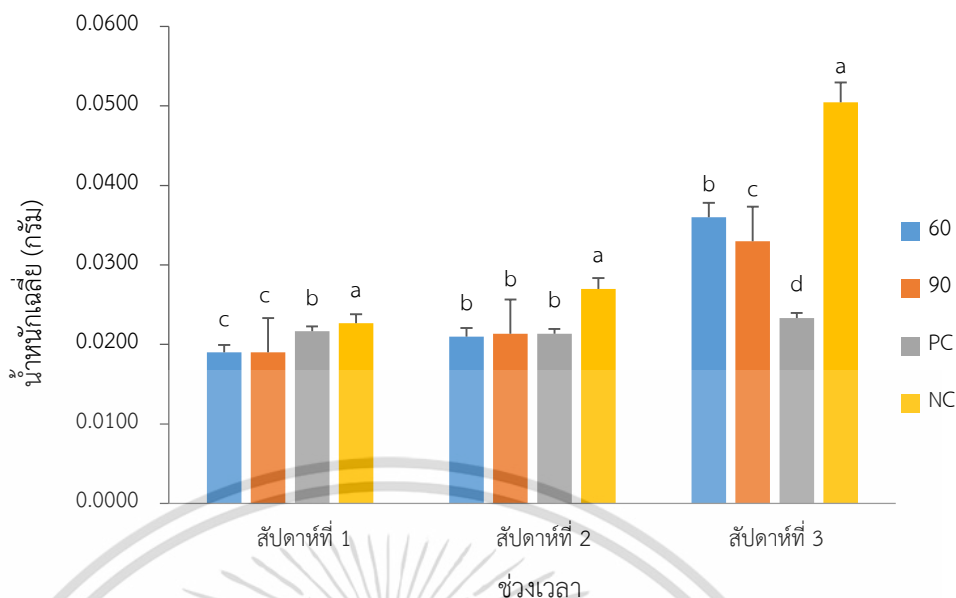
ภาพที่ 4.15 อัตรารอดของลูกปลานิลหลังสิ้นสุดการทดลองที่ 3 (60; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 90; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม; กลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ NC; กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน)

อัตราการเติบโตหลังสิ้นสุดการทดลองการให้อาหารผสม 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันที่ 60, 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ควบคู่กับกลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17MT หลังการทดลอง 21 วัน อัตราการเติบโตมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งพบว่ามีอัตราการเติบโตอยู่ที่เท่ากับ 0.10 ± 0.00 , 0.09 ± 0.01 , 0.04 ± 0.01 , และ 0.17 ± 0.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.16) โดยการเติบโตสูงสุดในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมนที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม คือ 0.17 ± 0.01 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.16 อัตราการเติบโตของลูกปลานิลหลังสิ้นสุดการทดลองที่ 3 (60; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, PC; กลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ NC; กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน)

การทดลองการให้อาหารผสม 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันที่ 60, 90, 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ควบคู่กับกลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17MT หลังจากการทดลอง 21 วัน พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มีน้ำหนักเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 1 อยู่ที่เท่ากับ 0.01 ± 0.00 , 0.01 ± 0.00 , 0.02 ± 0.00 และ 0.02 ± 0.00 กรัม ตามลำดับ มีน้ำหนักเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 2 อยู่ที่เท่ากับ 0.02 ± 0.00 , 0.02 ± 0.00 , 0.02 ± 0.00 และ 0.03 ± 0.00 กรัม ตามลำดับ และมีน้ำหนักเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 3 อยู่ที่ 0.03 ± 0.00 , 0.03 ± 0.00 , 0.20 ± 0.00 และ 0.50 ± 0.00 กรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 4.17)

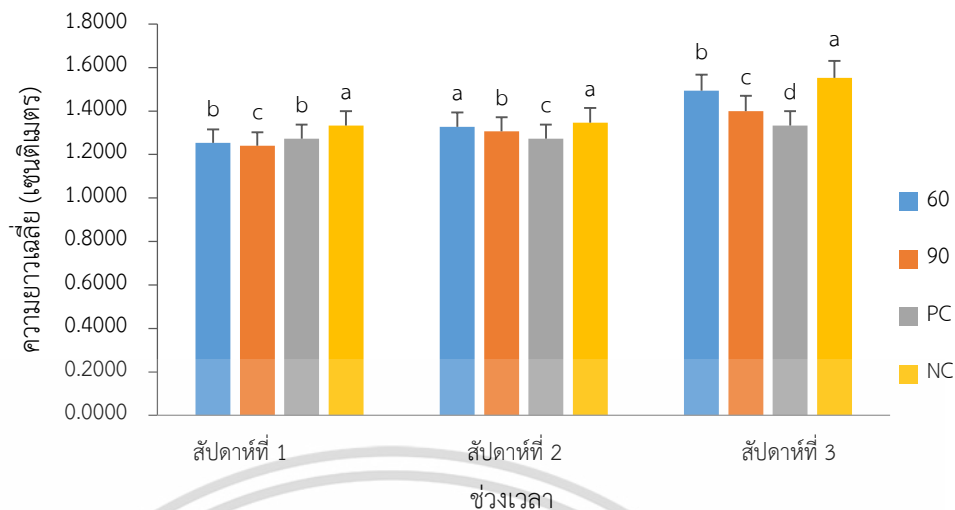


ภาพที่ 4.17 น้ำหนักเฉลี่ยการทดลองที่ 3 (60; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 90; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, PC; กลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและ NC; กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน)

การทดลองการให้อาหารผสม 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันที่ 60, 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม กลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17MT หลังการทดลอง 21 วัน มีความยาวเฉลี่ยแต่ละสัปดาห์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยในสัปดาห์ที่ 1 อยู่ที่ 1.25 ± 0.02 , 1.24 ± 0.00 , 1.27 ± 0.01 และ 1.33 ± 0.02 เซนติเมตร ตามลำดับ ความยาวเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 2 อยู่ที่ 1.32 ± 0.05 , 1.30 ± 0.03 , 1.27 ± 0.04 และ 1.34 ± 0.03 เซนติเมตร ตามลำดับ และสัปดาห์ที่ 3 อยู่ที่ 1.49 ± 0.01 , 1.40 ± 0.02 , 1.33 ± 0.00 และ 1.55 ± 0.03 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.18)

โดยค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำเฉลี่ยระหว่างทดลองในระบบน้ำหมุนเวียนแนวตั้งระบบที่ 1 ถึงพลาสติกมีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) อยู่ที่ 8.14 ± 0.00 ค่าออกซิเจนละลายน้ำ (DO) 4.48 ± 0.39 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิ 29.36 ± 0.20 องศาเซลเซียส และระบบที่ 2 กรวยสแตนเลสมีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) อยู่ที่ 7.78 ± 0.02 ค่าออกซิเจนละลายน้ำ (DO) 4.78 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิ 29.13 ± 0.02 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.18 ความยาวเฉลี่ยการทดลองที่ 3 (60; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, 90; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, PC; กลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ NC; กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน)

ตารางที่ 4.7 ค่าคุณภาพน้ำในระบบทดลองแนวตั้งการทดลองครั้งที่ 3

คุณภาพน้ำ	ค่าเฉลี่ย	
	ถังพลาสติก	กรวยสแตนเลส
ความเป็นกรดต่าง (pH)	8.14±0.00	7.78±0.02
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO; มิลลิกรัมต่อลิตร)	4.48±0.39	4.78±0.12
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	29.36±0.20	29.13±0.02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

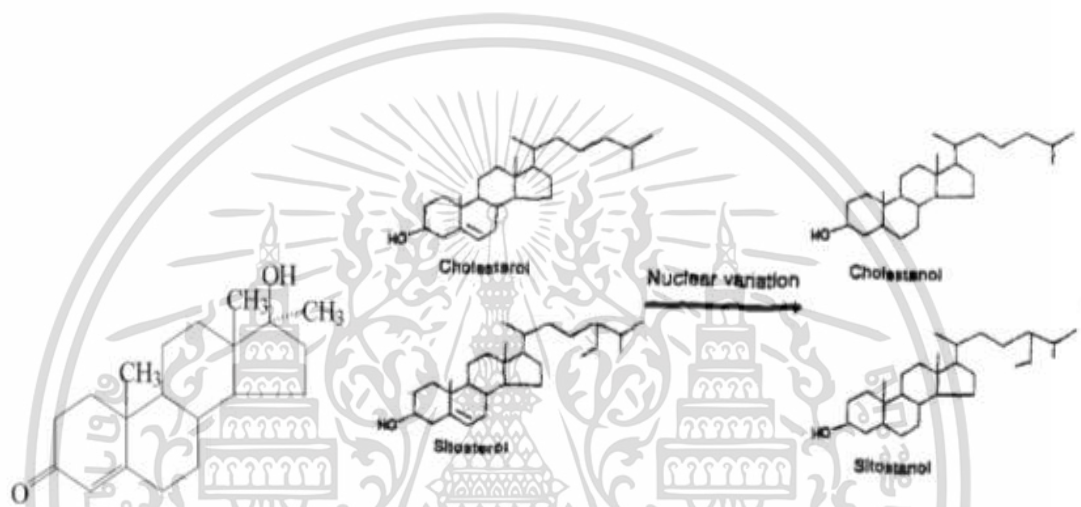
บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจหาปริมาณสาร 17MT ในไรแดงพบพบโครมาโทแกรมของสาร 17MT ในไรแดง ปรากฏในช่วง 4.44-4.56 นาที และในน้ำหลังการแช่อยู่ที่ 4.44 นาที ซึ่งผลจากตารางที่ 4.1 และ 4.2 แสดงความเข้มข้นของ 17MT ที่สะสมในไรแดงแปรผันเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาในการแช่และความเข้มข้นที่ใช้เพิ่มขึ้น (C_{18} reverse phase column) และการวิเคราะห์ปริมาณสาร 17MT ในจากสารสกัด กระจายดำ กวาวเครือแดง หนามกระสุน พบโครมาโทแกรมของสาร 17MT ปรากฏที่เวลา 5.605 นาที สาร 17MT ในกระจายดำ ปรากฏที่เวลา 5.54 นาที ไม่ปรากฏโครมาโทแกรมของสาร 17MT ในสารสกัดกวาวเครือแดงและหนามกระสุน ใช้ Water ReliantTM C_{18} reverse phase column ร่วมกับเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ คือ ACN:TFA (70:30 v/v) ระยะเวลาการปรากฏของโครมาโทแกรมสาร 17MT ของการศึกษานี้ใกล้เคียงกับการศึกษาของการศึกษาของพุทธรัตน์ เบ้าประเสริฐกุล และคณะ (2556) สามารถตรวจสอบฮอร์โมน 17MT โดยใช้ Sunfire C_{18} reverse phase column กับเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น Acetonitrile : Milli-Q water (60:40 v/v) ที่อัตราไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร และปริมาตรที่ใช้ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร พบพีคของตัวอย่างที่เวลา 4.7-4.8 นาที (ภาพที่ 2.8) การศึกษาของ Barbosa *et al.* (2013) ตรวจสอบฮอร์โมน 17MT และ Testosterone โดยใช้ C_{18} reverse phase column กับเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น Acetonitrile : Ultrapure water (60:40 v/v) ที่อัตราไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และปริมาตรที่ใช้ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร พบพีคที่ตรงกับกราฟมาตรฐานที่ระยะเวลาใกล้เคียงกัน คือ 10 และ 12 นาที (ภาพที่ 2.6) การศึกษาของ Marwah *et al.* (2005) ทำการตรวจสอบฮอร์โมน 17MT โดยใช้ Zorbax-SB C_{18} column กับเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น Acetonitrile : Water (20:80 v/v) ที่อัตราไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร และปริมาตรที่ใช้ฉีดเท่ากับ 5 ไมโครลิตร พบพีคตัวอย่างปรากฏที่ตรงกับกราฟมาตรฐานที่ระยะเวลาใกล้เคียงกัน คือ 12 นาที ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชนิดของคอลัมน์ ขนาดของคอลัมน์ เฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ ปริมาตรที่ใช้ในการฉีด อัตราไหล รวมถึงรุ่นหรือแบรนด์ของคอลัมน์ และขนาดอนุภาคคอลัมน์ที่แตกต่างกันส่งผลต่อการปรากฏของสาร 17MT ที่เวลาต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ 17MT เป็นสารมาตรฐานเพื่อการตรวจสอบ 17MT ในพืชได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในพืชมีสารกลุ่มสเตียรอยด์มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสเตียรอยด์ในฮอร์โมนสังเคราะห์ 17MT ซึ่ง Oka *et al.* (1973) อธิบายว่าสเตอรอลเป็นไขมันที่สำคัญสำหรับสิ่งมีชีวิต และหลายชนิดพบได้ในเซลล์ยูคาริโอต สเตอรอลจากพืชบนดินเรียกว่าไฟโตสเตอรอล ในขณะที่สเตอรอลจากสัตว์ เรียกว่า คอเลสเตอรอล ซึ่งสเตอรอลทั้งสองชนิดมีโครงสร้างคล้ายกันมาก และ Ito *et al.* (2017) รายงานว่าไฟโตสเตอรอลมีโครงสร้างที่สัมพันธ์กับคอเลสเตอรอล แต่จะมีความแตกต่างกันที่โครงสร้างสายด้านข้าง (Ling and Jones, 1995)



ภาพที่ 5.1 โครงสร้างทางเคมีของ 17MT และ Phytosterol

ที่มา: Chu *et al.* (2006) and Ling and Jones (1995)

อัตราการหลังสิ้นสุดการทดลอง อัตราสูงสุดคือกลุ่มควบคุม 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมนกลุ่มทดลองที่ไม่ได้รับฮอร์โมน El-Greisy and El-Gamal, (2012) รายงานอัตราการหลังการได้รับฮอร์โมนนาน 15 วัน พบอัตราการในกลุ่มที่ไม่ได้รับฮอร์โมนอยู่ที่ 88 เปอร์เซ็นต์ และพบอัตราการสูงสุดในกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน 17MT ที่ระดับ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอยู่ที่ 93 เปอร์เซ็นต์ ในการศึกษาการทดลองครั้งที่ 1 พบอัตราการอยู่ที่ 72.33 และ 76 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มควบคุม 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมนกลุ่มทดลองที่ไม่ได้รับฮอร์โมนตามลำดับ ในการทดลองครั้งที่ 2 พบอัตราการอยู่ที่ 70.33 และ 90.33 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มควบคุม 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมนกลุ่มทดลองที่ไม่ได้รับฮอร์โมนตามลำดับ และการทดลองครั้งที่ 3 พบอัตราการอยู่ที่ 52 และ 25.66 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มที่ได้รับ

17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระชายดำที่ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่ง Phelps and Popma, (2000) รายงานว่า 17MT เป็นฮอร์โมนกลุ่มสเตียรอยด์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อและการพัฒนาลักษณะทางเพศชาย และใกล้เคียงฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนที่ผลิตตามธรรมชาติ อีกทั้งพบการรายงานว่าการได้รับฮอร์โมน 17MT ไม่ส่งผลกระทบต่อการอยู่รอดของปลานิล (Vera Cruz and Mair, 1994; Chakraborty *et al.*, 2011) ดังนั้นสาเหตุของอัตราการรอดชีวิตต่ำในการทดลองครั้งที่ 3 อาจไม่ใช่ผลกระทบของฮอร์โมนสังเคราะห์

กลุ่มที่ได้รับสารสกัดกระชายดำพบอัตราการรอดต่ำทุกรอบการทดลองทั้ง 3 ครั้ง แม้ว่าจะมีการรายงานว่าการนำกระชายดำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งและความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร ตลอดจนเป็นยาเสริมสมรรถภาพทางเพศ และการติดเชื้อรา (Pengcharoen, 2002) การศึกษาทางเภสัชวิทยาคุณสมบัติต่างๆ ของกระชายดำ และ Methoxyflavone ที่มีประสิทธิภาพหลักๆ ต่อการควบคุมการเผาผลาญของเซลล์ การต้านมะเร็ง การผ่อนคลายหลอดเลือดและการทำงานของหัวใจ การเสริมสมรรถภาพทางเพศ ปกป้องระบบประสาท ป้องกันอาการแพ้ ต้านการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระ ในประเทศไทยเป็นยาที่กำลังและเป็นยาเสริมสมรรถภาพทางเพศ (Chen *et al.*, 2018) สารสกัดกระชายดำและ *Boesenbergia rotunda* (กระชาย) ที่สกัดด้วยเอทานอล ไม่มีผลกระทบต่อ การออกฤทธิ์เสริมสมรรถภาพทางเพศ และการสืบพันธุ์ของหนูตัวผู้ นอกจากนี้ผงกระชายดำที่แขวนลอยอยู่ในน้ำไม่มีผลต่อการทำงานของแอนโดรเจนต่อระบบสืบพันธุ์ของหนูตัวผู้วัยอ่อนที่ถูกทำหมัน (Trisomboon *et al.*, 2007; Sudwan *et al.*, 2006; and Sudwan *et al.*, 2007)

ถึงแม้ว่า ไม่พบการรายงานผลของสารสกัดกระชายดำต่อการรอดชีวิต แต่รายงานอัตราการรอดจากการศึกษาอื่นๆ ในการใช้สมุนไพรแปลงเพศปลานิล Ghosal *et al.* (2015) ศึกษาการแปลงเพศด้วยสารสกัดใบผักปลัง *B. alba* และเมล็ดหนามกระสุน *T. terrestris* จากการใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ พบเปอร์เซ็นต์การรอดตายที่ 94.96 ± 0.6 เปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตที่สูงนี้บ่งชี้ว่ากลุ่มของสารสกัดจากพืชทั้งสองชนิดไม่มีผลเสียต่อสุขภาพของปลา และ Ghosal and Chakraborty, (2020) ทุกกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระสุนที่ระดับความเข้มข้น 0.0, 2.0, 2.5, 3.0 กรัมต่อกิโลกรัม และพบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (100 ± 0.00) เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุม (93.33 ± 1.76) ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดจากพืชอาจไม่ส่งผลเสียต่อสุขภาพของปลา แต่อาจทำให้ปลามีชีวิตรอดได้สูงขึ้น นอกจากนี้พบอัตราการรอดที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ในปลา *C. nigrofasciatum* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมด้วยหนามกระสุนแบบผงที่ 1 และ 2 กรัมต่อกิโลกรัม (Yeganeh *et al.*, 2017) นอกจากนี้ Ghosal

et al. (2021) รายงานว่าลูกปลานิล (น้ำหนักเฉลี่ย 0.025 ± 0.009 กรัม) ที่ได้รับอาหารผสม 17MT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม), สารสกัดใบผักปลัง (1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม), สารสกัดเมล็ดหนามกระสุน (2.0 กรัมต่อกิโลกรัม), สารสกัดเมล็ดหมาม่วย (0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม), สารสกัดรากสามสิบ (0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เป็นเวลานาน 30 วัน พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตในทุกกลุ่มการทดลองที่ 90 เปอร์เซ็นต์ อย่างไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) นอกจากนี้ในการทดลองที่ 3 พบอัตราการรอดสูงในกลุ่มที่ได้รับกระชายดำ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากสมุนไพรสามารถช่วยลดอัตราการตายจากการก่อโรคในปลาได้ (Jian and Wu, 2003) และ Sivaram *et al.* (2004) ศึกษาสารสกัดจากโสมอินเดีย *Withania somnifera* และกะเพรา *Ocim sanctum* ที่เสริมในอาหาร พบสารสกัดโสมอินเดียและกะเพราว่าช่วยเพิ่มการทำงานของเซลล์ฟาโกไซต์และระดับอิมมูโนโกลบูลินในปลากระรัง *Epinephelus tauvina* และเพิ่มความอยู่รอดจากการติดเชื้อ *Vibrio harveyi*

อัตราการเติบโตหลังสิ้นสุดการทดลองการให้อาหารผสม 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ การเติบโตสูงสุดในการทดลองครั้งที่ 1 คือ ในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17MT อยู่ที่ 1.86 และ 2.37 เปอร์เซ็นต์ การเติบโตสูงสุดในการทดลองครั้งที่ 2 คือ ในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมนที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มที่ไม่ได้รับฮอร์โมน 17MT คือ 0.26 และ 0.27 เปอร์เซ็นต์ การเติบโตสูงสุดในการทดลองครั้งที่ 3 คือกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน คือ 0.17 ซึ่งการอัตราการเติบโตของการศึกษานี้สูงกว่าในการศึกษาของ Hassona *et al.* (2020) รายงานว่าประสิทธิภาพการเจริญเติบโตในกลุ่มที่ใช้อาหารผสม 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลุ่มที่ไม่ได้รับ 17MT คือ 0.854 และ 0.796 เปอร์เซ็นต์ และงานวิจัยบางเรื่องรายงานว่า การได้รับ 17MT แสดงให้เห็นการเติบโตของปลาแต่ละตัวที่เพิ่มขึ้น (Mair *et al.*, 1995; Dan and Little, 2000; Little *et al.*, 2003; El-Greisy and El-Gamal, 2012)

อย่างไรก็ตามไม่พบการรายงานผลของสารสกัดกระชายดำต่อการเติบโตจากการศึกษาอื่นๆ ซึ่ง Hassona *et al.* (2020) ศึกษาการเสริมอาหารปลานิลที่ความเข้มข้นของสารสกัดหนามกระสุน *T. terrestris* แตกต่างกันที่ 500 และ 750 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าอาหารช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ส่งเสริมสภาพสุขภาพ คุณภาพน้ำอสุจิ และประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ และบ่งชี้ว่าปลาตัวใหญ่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างให้ยาวขึ้น (Froese, 2006) และอาหารเสริมสารสกัดจากหนามกระสุนที่เลี้ยงปลาให้คุณค่าที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มปลาที่เลี้ยงด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์ ดังนั้นจึงอาจคาดเดาได้ว่าอาหารที่เสริมด้วยพืชช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของปลาได้ดีกว่า

ฮอร์โมนสังเคราะห์ (Hassona *et al.*, 2020) พบการศึกษาของ Yeganeh *et al.* (2017) ซึ่งพบว่าเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

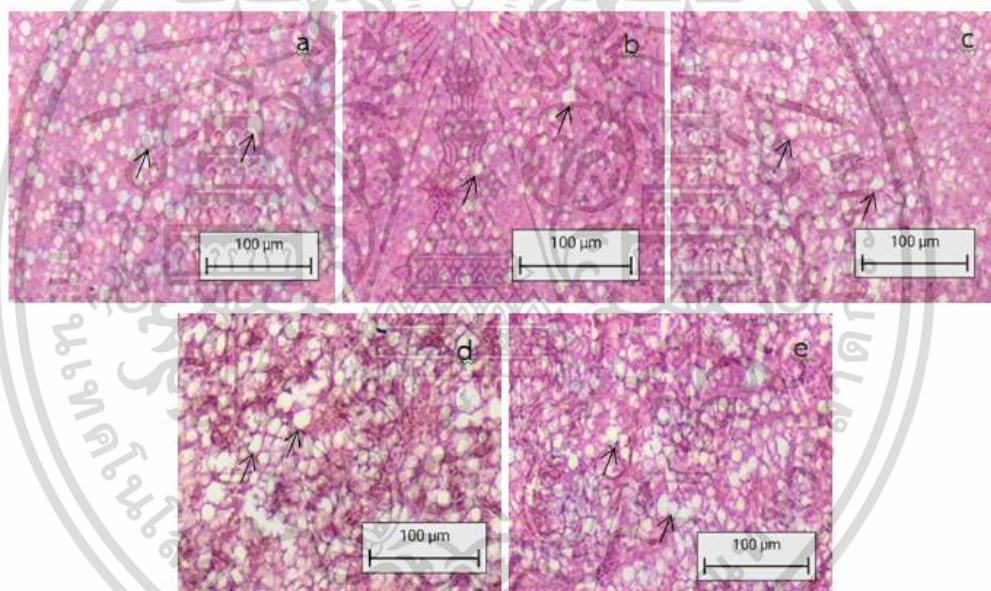
สารสกัดหนามกระสุนที่เสริมเป็นอาหารเสริมสำหรับปลาหมอฆ่าลาย *C. nigrofasciatum* ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการฟักไข่ นอกจากนี้หนามกระสุนยังเพิ่มความอยากอาหาร การใช้อาหาร และการสังเคราะห์โปรตีนเนื่องจากผลของแอนโดรเจน (Donaldson, 1982; Jayaprakas and Sindhu, 1996; Mukhopadhyaya *et al.*, 1986) และ Cek *et al.* (2007) พบว่าปลาตุ๊กแอฟริกัน *C. gariepinus* ที่ได้รับหนามกระสุน มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว ความแตกต่างทางเพศ และการสร้างอสุจิของ และ Mansour *et al.* (2018) ศึกษาการทดลองให้อาหารเป็นเวลา 84 วัน เพื่อตรวจสอบผลของสารสกัดจากโสมในอาหาร (GE) สารสกัดหนามกระสุน (TE) และสารสกัดละอองเกสรอินทผลัม (DPPG) ต่อการเจริญเติบโต ระดับฮอร์โมนเพศผู้ และการใช้สารอาหารของปลานิล ผลการวิจัยพบว่ากลุ่มที่ได้รับการเสริมสารสกัดในอาหารทั้งหมดมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การใช้สารอาหารเพิ่มขึ้นด้วยการเสริมไฟโตเคมีคอลในปริมาณที่สูงขึ้น นอกจากนี้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น และลูกปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมสารสกัดต่างๆ ที่ระดับต่างๆ กัน แสดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในประสิทธิภาพการเติบโต การเร่งการเจริญเติบโตของลูกปลานิลที่ได้รับการเสริมสารสกัดจากการเพิ่มขึ้นของระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมา (Asad *et al.*, 2010)

ผลทางเนื้อเยื่อตับ ในการทดลองครั้งที่ 1 พบ Lipid vacuoles เป็นวงกลมจำนวนมากกระจายทั่วในเนื้อเยื่อตับของทุกกลุ่มการทดลอง (ภาพที่ 5.2) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Taddesse *et al.* (2014) ตรวจสอบการตอบสนองทางโครงสร้างตับทางจุลพยาธิวิทยาของปลานิล *O. niloticus* ต่อการให้อาหารมากเกินไป คือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอาหารปลานิลเชิงพาณิชย์ในอัตราร้อยละ 3 และ 6 ของน้ำหนักตัวปลา ตามลำดับ พบเซลล์ตับที่มีรูปร่างผิดปกติซึ่งมีนิวเคลียสเป็นวงกลมชัดเจนและตั้งอยู่ตรงกลางจากกลุ่มควบคุมทั้งหมด เซลล์ตับที่มีภาวะเจริญเกินขนาดใหญ่ขนาดใหญ่ที่มีนิวเคลียสเคลื่อนตัวไปที่ขอบของเซลล์ ซึ่งสังเกตได้หลังจากการให้อาหารมากเกินไปเป็นเวลา 3 สัปดาห์ นอกจากนี้ในกลุ่มที่ได้รับอาหารมากเกินไป ยังพบ Lipid vacuoles และการฝ่อร่วมกับเซลล์ตับขนาดใหญ่

ผลของความเป็นพิษของเนื้อเยื่อพบความผิดปกติจากเนื้อเยื่อตับบางส่วนในกลุ่มที่ได้รับ 17MT สารสกัดกระชายดำที่ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบบริเวณที่มีการตายของเซลล์ตับ (Necrosis) การบวมน้ำ (Hydropic degeneration) เซลล์ตับที่มีการเจริญขนาดใหญ่ (Hypertrophy) (ภาพที่ 5.3) ผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อตับผิดปกติที่พบในการศึกษานี้อาจเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของสารสกัดกระชายดำที่ผสมในอาหาร ซึ่งการศึกษาของ Naiel *et al.* (2019) รายงานว่าผลของอาหารที่มีการ

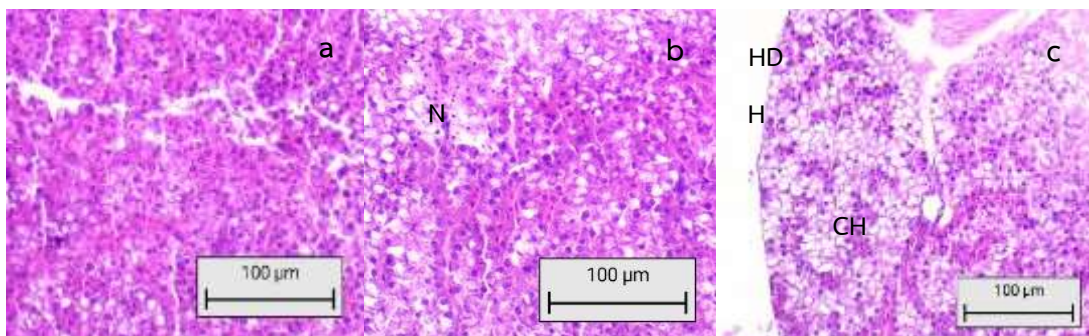
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เสริมโรสแมรี่ (*Rosmarinus officinalis*) ต่อความเป็นพิษของ Aflatoxin B1 (AFB1) เผยให้เห็นสัญญาณทางพยาธิวิทยาหลายประการ เช่น เนื้อร้ายของตับอ่อน Pancreatic acini ที่มี Pyknotic และ Karyorrhectic nuclei และพบว่าในเซลล์ตับมีการเสื่อมสภาพ (Degeneration) และเนื้อตาย (Necrosis) ระยะเริ่มแรกในเซลล์ตับ ส่วนใหญ่พบว่ามีอาการบวมน้ำ (Hydropic degeneration) และการเปลี่ยนแปลงของไขมัน (Fatty change) อีกทั้งพบอาการตกเลือดและเลือดคั่ง (Congestion haemorrhage) รวมถึงพบมีการแทรกของเม็ดเลือดขาว (Lymphocytic infiltration) นอกจากนี้ Chivapat *et al.* (2010) รายงานผลของความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดกระชายดำในหนูทดลอง ซึ่งได้รับสารสกัดจากกระชายดำในระดับ 5, 50 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 6 เดือน ตามลำดับ ซึ่งเทียบเท่ากับ 1, 10 และ 100 เท่าของการใช้ในคน



ภาพที่ 5.2 เนื้อเยื่อตับการทดลองครั้งที่ 1 (a; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, b; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, c; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, d; กลุ่มควบคุม 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ e; กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอริโมน) (ลูกศรชี้ Fat vacuole ที่กำลังขยาย 10x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5.3 เนื้อเยื่อตับกลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (a; เนื้อเยื่อตับปกติ b-c; เนื้อเยื่อตับที่ผิดปกติ, N; Necrosis, H; Hypertrophy, HD; Hydropic degeneration; CH; Congestion haemorrhage ที่กำลังขยาย 10x)

ค่าคุณภาพน้ำ ค่าความเป็นกรดต่าง pH และอุณหภูมิในแต่ละการทดลองที่ 1 และ 2 ไม่แตกต่างกัน พบอุณหภูมิของน้ำสูงสุดในการทดลองครั้งที่ 3 ส่วนค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำไม่แตกต่างกันในการทดลองที่ 1 และ 2 (5.5-6.5 และ 6.28 มิลลิกรัมต่อลิตร) และต่ำสุดในการทดลองครั้งที่ 3 แต่ไม่มีความแตกต่างของทั้งสองระบบการทดลองแนวตั้งถึงพลาสติกและกรวยสแตนเลส (4.48 และ 4.78 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยพบว่าค่า pH อุณหภูมิ และค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำของการศึกษานี้ใกล้เคียงกับในการศึกษาของ Hassona *et al.* (2020) ซึ่งรายงานว่า การเสริมอาหารด้วย 17MT และหนามกระสุนไม่มีผลกระทบต่อพารามิเตอร์คุณภาพน้ำ และค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำบ้างชี้ว่า 17MT และหนามกระสุนที่มีการผสมในอาหารไม่มีผลเสียต่อคุณภาพน้ำ โดยค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำของกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน 17MT 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และหนามกระสุนที่ระดับความเข้มข้น 250, 500, และ 750 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม คือ 5.95 6.03 6.32 6.02 และ 6.17 ตามลำดับ ค่า pH คือ 7.44, 7.49, 7.46, 7.67 และ 7.350 ตามลำดับ และอุณหภูมิ 26.15, 27.10, 26.40, 26.15 และ 26.50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

แต่อย่างไรก็ตามค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำกว่า และ pH ที่สูงกว่าในการทดลองครั้งที่ 3 นอกจากนี้การศึกษานี้ของ นฤมล อัสวเกศมณี (2550) และ ไมตรี ดวงสวัสดิ์ (2526) รายงานว่าค่าคุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลาน้ำจืดค่า pH อยู่ที่ 6.5-9 อุณหภูมิอยู่ที่ 25-32 องศาเซลเซียส และค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำอยู่ที่ 5-8 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือมากกว่า 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่ง Idowu *et al.* 2020 ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเปลือกไม้กระบอกแอฟริกา *Kigelia africana* ในปลานิลพบพารามิเตอร์คุณภาพน้ำที่สังเกตได้ไม่เบี่ยงเบนไปจากมาตรฐาน แต่ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำจะลดลง เมื่อระดับความเข้มข้นของสารสกัด *K. africana* เพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลต่อสมดุลของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

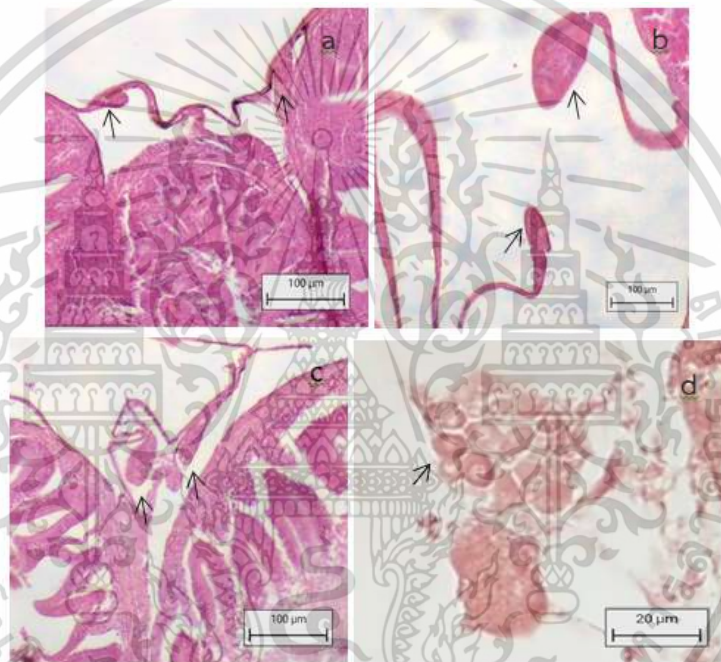
ออกซิเจนในน้ำ และ Abdel-Aziz *et al.* (2023) ทดลองตรวจสอบผลของการเสริมอาหารจากสารสกัดจากว่านหางจระเข้ *Aloe vera* (AVE) และสารสกัดดอกคาโมมายล์ *Matricaria chamomilla* (CFE) พบคุณภาพน้ำไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของอุณหภูมิ (23-24 องศาเซลเซียส ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (ประมาณ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร) pH (7-8) และแอมโมเนีย (0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร) ของกลุ่มที่ได้รับการเสริมด้วยสารสกัดจากว่านหางจระเข้และดอกคาโมมายล์

ในการทดลองที่ 1 และ 3 ทำการทดลองในระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด ที่มีการควบคุมอัตราไหลของน้ำในแต่ละถัง การจัดการของเสีย จำนวนตัวอย่างทดลอง และจำนวนมื้อการให้อาหารเหมือนกัน ค่าคุณภาพน้ำการทดลองที่ 1 เครื่องวัดอัตโนมัติในถังพักน้ำ มีค่า pH อยู่ที่ 7.1-8.4 DO 5.5-6.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิ 27-28 องศาเซลเซียส การทดลองที่ 2 (pH=8.31±0.04 DO= 6.28±0.27 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิ=27.67±0.05 องศาเซลเซียส) ค่า DO การทดลองที่ 1 ดีกว่าในการทดลองที่ 3 แม้ว่าจะมีการจัดที่เหมือนกัน แต่อาจแตกต่างกันที่ผลของอุณหภูมิในระหว่างที่มีการทดลอง ส่งผลต่อการละลายของออกซิเจนในน้ำที่ประมาณ 29 องศาเซลเซียส และศักดิ์ชัย ชูโชติ (2536) รายงานว่าความสามารถของออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ซึ่งอธิบายการมีค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำในการทดลองครั้งที่ 3 นอกจากนี้ปลาไม่สามารถใช้อาหารที่กินได้ เมื่อมีปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำ (Nehemia *et al.*, 2012) และเมื่อความเข้มข้นของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่น้อยกว่า 3.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะส่งผลต่อการลดความสามารถในการเจริญเติบโตและอัตราการเปลี่ยนอาหาร (Long *et al.*, 2009) และ Boyd (2010) รายงานว่าความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายน้ำต่ำมีความสัมพันธ์กับความเครียด ความอยากอาหารที่ไม่ดี และการเจริญเติบโตช้า ความอ่อนแอต่อโรค และการตายของปลาชนิดนี้ นอกจากนี้การทดลองที่ 1 และ 2 พบค่า พารามิเตอร์ต่างๆ ใกล้เคียงกันแม้ว่าจะทดลองระบบที่ต่างกัน และมีการจัดการระหว่างทดลองต่างกัน แต่ลูกปลาทดลองมาจากแหล่งเดียวกัน ซึ่งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อความแตกต่างของคุณลักษณะการเติบโตอย่างอัตรารอด อัตราการเติบโต ความยาวและน้ำหนักเฉลี่ยในการศึกษา

อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบเพศลูกปลาหลังสิ้นสุดการทดลองที่ 21 วัน ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเพศได้ในทุกการทดลอง ในการทดลองครั้งที่ 1 ตรวจพบเพียงอวัยวะที่สันนิษฐานว่าเป็นอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonad) ที่ยังไม่มีการพัฒนา ซึ่งการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ด้วยลักษณะเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด (Primordial germ cells; PGC) เมื่อพัฒนาสมบูรณ์จะสามารถแยกเพศลูกปลาด้วยความแตกต่างระหว่างเพศเมียด้วยเซลล์ไข่และเพศผู้ด้วยอสุจิหรือท่อนำอสุจิ ซึ่งตำแหน่งของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อวัยวะสืบพันธุ์แรกเริ่มของลูกปลานิลที่อายุระหว่าง 15-35 วัน พบที่บริเวณระหว่างลำไส้กับไต (El-Greisy and El-Gamal, 2012; Nakamura, 1984) อย่างไรก็ตามฮอร์โมน 17MT สามารถยับยั้งการสร้างเซลล์ไข่ได้ โดยขึ้นอยู่กับปริมาณของ 17MT ที่ได้รับ แม้ว่าการให้ 17MT จะมีการให้ก่อนการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ไปเป็นรังไข่ แต่ก็ไม่สามารถป้องกันการพบเพศเมียที่สันนิษฐานว่าเกิดจากพันธุกรรมได้อย่างสมบูรณ์ (Wolf *et al.*, 2004) และสารพิษทุกชนิดที่พบส่วนใหญ่เป็นกลุ่มฟีนอลและซาโปนินสเตียรอยด์ ซึ่งอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระบบต่อมไร้ท่อ มีผลต่อความแตกต่างทางเพศของเพศผู้และกระตุ้นการเจริญเติบโตของปลาได้ (Chakraborty *et al.*, 2015) (ภาพที่ 5.2)



ภาพที่ 5.4 เนื้อเยื่อส่วนอวัยวะสืบพันธุ์การทดลองครั้งที่ 1 (a; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, b; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ c; กลุ่มที่ได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ที่กำลังขยาย 10x) และ d; กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน (ที่กำลังขยาย 40x)

ในการศึกษามีการผสมวุ้น 1% เพื่อเป็นตัวช่วยเคลือบและช่วยผสมอาหารทดลองแบบกึ่งอาหารเจล ในการศึกษาของ Holfelder (2024) รายงานการศึกษาอาหารผสมเจลต่ออัตราการรอด การเติบโต และระบบสืบพันธุ์ในปลาหมากลาย *Danio Rerio* พบการรอดชีวิตอยู่ที่มากกว่า 95.8 เปอร์เซ็นต์ และมีส่วนช่วยในสนับสนุนการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ การวัดน้ำหนักและความยาวขั้นสุดทำแยกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในตัวเมียที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมเจลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เพศผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหารเจลจะมีน้ำหนักและความยาวสูงสุด และ Lal et al. (2023) การศึกษาการเติบโต การเปลี่ยนสี และการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์อันเนื่องมาจากสารยับยั้งอะโรมาเตสจากภายนอก (AIs) ในปลาสวยงามโรซีบาร์บ *Pethia conchonius* ด้วย 17MT และ Letrozole (LET) ถูกใช้เป็นตัว AIs ด้วยอาหารแบบเจล เป็นเวลา 3 เดือน (LET: 50, 100, 150 และ MT: 12.5, 25, 37.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) พบว่าการเจริญเติบโตลดลงในกลุ่มที่ได้รับอาหาร AI แต่การลดลงนั้นน้อยมากเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่มอาหาร 17MT 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบสัดส่วนเพศผู้สูงสุด (84.72 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กลุ่มที่ให้อาหารด้วย 17MT มีสีที่สว่างกว่า ($p \leq 0.05$) ส่วนเนื้อเยื่อวิทยาแสดงให้เห็นว่า LET และ 17MT ยับยั้งการพัฒนาของรังไข่ ทำให้เกิดไข่อ่อนและไม่มีผลกระทบต่อพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ อาหารที่ได้รับ 17MT 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จึงสามารถนำมาใช้เพื่อเพิ่มกล้ามเนื้อได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโต สี และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของปลาโรซีบาร์บ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสรุปได้ว่าระยะเวลาในการแช่ไรแดงด้วย 17MT ที่ต่างกันมีผลต่อปริมาณของฮอร์โมนที่ถูกดูดซับและสะสมในตัวไรแดงมากกว่าความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยหลังการตรวจหา 17MT ด้วยเทคนิค HPLC พบโครมาโทแกรมฮอร์โมนสังเคราะห์ปรากฏอยู่ในช่วงเวลาประมาณ 4.44-4.56 นาที การศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน 17MT ในการสกัดสมุนไพรชนิดต่างๆกัน คือ กระชายดำ กวาวเครือแดง และหนามกระสุน ผลพบว่าตรวจพบฮอร์โมน 17MT ในสารสกัดสมุนไพรทุกชนิดที่ทำการศึกษา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ 17MT ในการตรวจสอบปริมาณของ 17MT ในพืชได้ โดยพบปริมาณ 17MT สูงที่สุดในสารสกัดกระชายดำที่ 4.227 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมสารสกัด ดังนั้นจึงเลือกกระชายดำมาทดสอบคุณลักษณะการเติบโตด้วย 17MT จากสารสกัดกระชายดำเปรียบเทียบกับฮอร์โมนสังเคราะห์ 17MT และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมน ซึ่งพบว่าอัตราการรอดและการเติบโตต่ำลงเมื่อได้รับ 17MT จากสารสกัดกระชายดำที่ความเข้มข้นสูงขึ้น โดยอัตราการรอดและการเติบโตสูงสุดในกลุ่มที่ไม่ได้รับฮอร์โมน และจากการตรวจสอบเพศไม่สามารถยืนยันสัดส่วนเพศผู้ได้ แต่อย่างไรก็ตามเราได้ทราบถึงผลคุณลักษณะการเติบโตและอัตราการรอดหลังการได้รับ 17MT สารสกัดกระชายดำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน

6.2 ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะการศึกษาในอนาคตด้านการใช้สารสกัดกระชายดำอาจต้องมีการศึกษาผลกระทบของการให้สารสกัดกระชายดำในปลาเพิ่มเติม อาจปรับปรุงหรือใช้เทคนิคอื่นๆ เข้ามาจัดการหรือแยกสารสำคัญอย่างกลุ่มสเตียรอยด์ในสารสกัดกระชายดำ เพื่อลดอัตราการตายลงหรือความเป็นพิษต่อปลาที่ได้รับสารสกัด เช่น การห่อหุ้มระดับอนุภาค (Nanoencapsule) นอกจากนี้สามารถประยุกต์ใช้ไรแดงสามารถเป็นอาหารที่มีชีวิตแชร์ร่วมกับสารสกัดกระชายดำ และสามารถเป็นแนวทางการเพิ่มอัตราการเติบโตและอัตราการรอดที่ดีแก่ลูกปลานิลโดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกระชายดำ และการตรวจเพศไม่ได้ในการศึกษานี้มาจากลูกปลาในการทดลองมีขนาดเล็ก มีการเติบโตและอัตราการรอดต่ำดังนั้นควรต้องมีการจัดการระบบเลี้ยง เช่น ขนาดบ่อทดลอง ความหนาแน่น การจัดการอาหารเพื่อดึงดูดการกินอาหารของกลุ่มที่ผสมสารสกัดกระชายดำ รวมถึงอาจปรับระยะเวลาการให้อาหารผสมสารสกัดที่นานขึ้นในความเข้มข้นที่ต่ำลงเพื่อลดอัตราการตาย หรือการเลี้ยงลูกปลาหลังการทดลองต่อนานขึ้นจนปลาโตจนได้อายุและขนาดเพียงพอที่สามารถการตรวจสอบเพศได้อย่างน้อยที่อายุ 60 วัน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กมลศิริ พันธนิยะ. 2555. **ชีววิทยาและการเลี้ยงไรแดงในบ่อดิน**. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.nicaonline.com/index.php?option=com_content&view=article&id=541:2012-02-22-02-56-31&catid=42:2012-02-20-03-00-29&Itemid=124. (18 มีนาคม 2567).

กรมประมง. มปป. 2565. **สถิติผลผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจืด ประจำปี 2565** (เอกสารฉบับที่ 9/2566). กองนโยบายและแผนพัฒนาประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กระชายดำ. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <https://www.disthai.com/16484907/กระชายดำ>.

กระชายดำ. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <https://www.minervashops.com>.

กระชายดำ.ฐานข้อมูลเครื่องยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=4>.

กวาวเครือแดง. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://https://www.disthai.com/16484911/กวาวเครือแดง>.

กวาวเครือแดง. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <https://www.skherbstore.com>.

ฐานข้อมูลเครื่องยา. กวาวเครือแดง. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=158>.

ธงชัย เย็นเป้ง, ธราพันธ์ วัฒนสมหัทธม์, จุฑามาศ ชัยนนท์ และสุนทร กัณหาสุระ. 2554. **การผลิตลูกปลานิลแปลงเพศในถังไฟเบอร์กลาสระบบน้ำหมุนเวียนที่ความหนาแน่นแตกต่างกัน**. เอกสารวิชาการฉบับ 21/2554, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 23 หน้า.

นุกูล แสงพันธุ์ม เอื้ออารี สุขสมนิตย์ และพิสมัย เฉลยศักดิ์. 2559ก. **การเพาะเลี้ยงไรแดง**. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

นุกูล แสงพันธุ์ม, เอื้ออารี สุขสมนิตย์ และพิสมัย เฉลยศักดิ์. 2559ข. **การเพาะเลี้ยงไรแดงยุคใหม่: เลี้ยงเพื่อผลิตไข่ไรแดง 4 ชนิด**. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ปทุมธานี, 48 หน้า.

นุชนรี ทองศรีจุฑามาศม ชมพูนิช จูอะติม พงศ์มณีรัตน์ และชนะกานต์ เชษฐสิงห์. 2551. **ผลของการเก็บรักษาไรแดงต่อการเจริญเติบโตของปลา**. สถาบันวิจัยอาหารสัตว์น้ำจืดกรมประมง. 3 หน้า.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นฤมล อัครเกษมณี. 2550. การเลี้ยงปลาน้ำจืด. พิมพ์ครั้งที่ 1. สงขลา: มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. 168 หน้า.

พุทธรัตน์ เบ้าประเสริฐกุล, เบญจพร สัมฤทธิ์เวช, สันติชัย รังสียาภิรมณ์ และเต็มดวง สมศิริ. ม.ป.ป.

2556. การตรวจฮอร์โมน 17 อัลฟาเมทิลเทสโทสเตอโรนในปลานิลแปลงเพศ *The determination of 17 α -Methyltestosterone in sex-reversed tilapia*. กรมประมง. ประดับ มีสวัสดิ์. 2565. การพัฒนาและการตรวจสอบความเข้าใจของวิธีทดสอบในการวิเคราะห์สาร Demethylwedelolactone และสาร Wedelolactone (in *Eclipta prostrata*) ด้วยเทคนิค HPLC-PDA. วารสารวิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ศึกษา, 5(1): 85-96.<http://doi.org/10.14456/jsse.2022.8>.

ปลานิลจิตรลดา สายสัมพันธ์พระราชวงศ์ไทย-ญี่ปุ่น. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: https://www.4.fisheries.go.th/local/index.php/main/view_blog2/1220/64289/2315

ปวีณา กิจสวัสดิ์. 2530. การศึกษาทางเนื้อเยื่อของปลาตุ๊กตาดาน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เมธาวิ รอดตมกคลี, และ วัฒนะ ลีลาภักทร. 2560. ผลของรูปแบบอาหารต่อการเจริญเติบโตและการแปลงเพศของปลานิล (*Oreochromis niloticus*). วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา, 22(1): 14-23.

เมธาวิ รอดตมกคลี, วรารท์ เทพาหุดี และนุกุล แสงพันธุ์. 2560. การศึกษาชีวประวัติของไรน้ำสามชนิด (Cladocera : Moinidae) ในประเทศไทยในห้องปฏิบัติการ. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา, 25(1): 129-140.

ไมตรี ดวงสวัสดิ์. 2526. คุณสมบัติของน้ำกับการเลี้ยงปลา. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ. 1-23 หน้า.

เรณู ว่องส่องสาร. 2549. คู่มือการผลิตปลานิลแปลงเพศ. อุดรธานี ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด อุดรธานี. 36 หน้า.

วิรัตดา สีตะสิทธิ์. 2544. วิเคราะห์และประมวลผลการศึกษาวิจัยเรื่องไรแดงในประเทศ.

สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด. 64 หน้า.

ศักดิ์ชัย ชูโชติ. 2536. การเลี้ยงปลาน้ำจืด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร. ลาดกระบัง. 106-116.

สันทนา ดวงสวัสดิ์. 2529. ชีวประวัติและการเพาะเลี้ยงไรแดง. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 3, สถาบันวิจัยประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กรมประมง. 7.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สุชาติ จุลอดุง และ กฤษณพันธ์ โกเมนไปรินทร์. 2550. ศึกษาการไฮฮอโรโมน 17β -estradiol ใน การแปลงเพศปลาหมอไทยเป็นเพศเมีย Study of 17β -estradiol Hormone on Feminization of Climbing Perch, *Anabas testudineus* (Bloch, 1792). เอกสาร วิชาการฉบับ 7/2550, สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. นามกระสุน. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <https://www.ippc.acfs.go.th/pest/G001/T010/W EE D086>.
- นามกระสุน. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <https://www.disthai.com/17144693/นามกระสุน>.
- อานุกาพ วรณคณาพล. 2563. การเก็บน้ำเชื้อปลานิล (*Oreochromis niloticus*) แช่แข็ง: เทคนิค และการจัดการ. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 25(2): 735-753.
- Abarikwu S. O., Onuah C. L., and Singh S. K. 2020. Plants in the management of male. *Andrologia*.00: e13509. <https://doi.org/10.1111/and.13509>.
- Adimoelja, A., and Adaikan, P.G., 1997. Protodioscin from herbal plant *Tribulus terrestris* L. improves the male sexual functions, probably via DHEA. *International Journal of Impotence Research*, 9: 1–15.
- Affuf, A., Karpenko, J. N., Gulyaev, D. K., Molokhova, E. I., Blinova, O. L., Gileva, A. A., and Belonogova, V. D. 2019. Phytochemical study of *Tribulus terrestris* L. *Pharmacy and Pharmacology*, 7(6): 346-355.
- Angienda, P. O., Aketch, B. O., and Waindi, E. N. 2010. Development of all-male fingerlings by heat treatment and the genetic mechanism of heat induced sex determination in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *International Journal of Biological and Life Sciences*. 6(1): 38-42.
- Asad, F., Ahmed, I., Saleem, M., and Iqbal, T. 2010. Hormonal masculinization and growth performance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by androgen administration at different dietary protein levels. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12: 939–943.
- Abdel-Aziz, M. F., El Basuini, M. F., Teiba, I. I., and Metwally, M. M. 2023. Growth Performance, Feed Utilization, Hematological Parameters, and Histological Features of Nile Tilapia (and Histological Features of Nile Tilapia (*Oreochromis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- niloticus*) Fed Diets with Supplementary Herbal Extracts Under Prolonged Water Exchange. **Annals of Animal Science**, 23(4): 1147–1157.
- Barbosa, I. R., Lopes, S., Oliveira, R., Domingues, I., Soares, A. M., and Nogueira, A. J. 2013. Determination of 17 α -methyl testosterone in freshwater samples of tilapia farming by high performance liquid chromatography. **American Journal of Analytical Chemistry**, 4(04): 207.
- Barel, C. D. N., van Oijen, M. J. P., Witte, F. and Witte-Maas, E. L. M. 1977. An introduction to the taxonomy and morphology of the Haplochromine Cichlidae from Lake Victoria. **Netherlands Journal of Zoology**, 27: 333–389.
- Billard, R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction Nutrition Development**, 26(4): 877-920.
- Beardmorea, J. A., Maira, G. C. and Lewis, R. I. 2001. Monosex male production in fin fish asexemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. **Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture**, 283-301.
- Boyd, C. E., and Hanson, T. 2010. Dissolved-oxygen concentrations in pond aquaculture. **Ratio**, 2: 42.
- Bucci, L. R. 2000. Selected herbals and human exercise performance. **American Journal of Clinical Nutrition**, 72(2): 624–636.
- Cek, S., Turan, F., and Atik, E. 2007. The effects of Gokshura, *Tribulus terrestris* on sex reversal of guppy, *Poecilia reticulata*. **Pakistan journal of biological sciences**, 10(5): 718-725.
- Celik, I., Guner, Y., and Celik, P. 2011. Effect of orally-administered 17 α -Methyl testosterone at different doses on the sex reversal of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus. 1758). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, 10(7): 853-857.
- Chakraborty, S. B., Mazumdar, D., Chatterji, U., and Banerjee, S. 2011. Growth of mixed sex and monosex Nile tilapia in different culture systems. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science**, 11: 131-138.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Chakraborty, S. B., Molnár, T., Ardó, L., Jeney, G., and Hancz, C. 2015. Oral administration of *Basella alba* leaf methanol extract and genistein enhances the growth and non-specific immune responses of *Oreochromis niloticus*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 15(1): 167-173.
- Chaturapanich, G., Chaiyakul, S., Verawatnapakul, V., and Pholpramool, C. 2008. Effects of *Kaempferia parviflora* extracts on reproductive parameters and spermatic blood flow in male rats. **Reproduction**, 136(4): 515.
- Cherdshewasart, W., Cheewasopit, W., and Picha, P. 2004. The differential anti-proliferation effect of white (*Pueraria mirifica*), red (*Butea superba*), and black (*Mucuna collettii*) Kwao Krua plants on the growth of MCF-7 cells. **Journal of ethnopharmacology**, 93(2-3): 255-260.
- Chen, D., Li, H., Li, W., Feng, S., and Deng, D. 2018. *Kaempferia parviflora* and Its Methoxyflavones: Chemistry and Biological Activities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 1-15. DOI: doi.org /10. 1155 /2018 / 4057456.
- Chivapat, S., Chavalittumrong, P., Attawish, A., and Rungsipipat, A. 2010. Chronic toxicity study of *Kaempferia parviflora* Wall ex. extract. **Thai Journal of Veterinary Medicine**, 40: 377-383.
- Chu, P. S., Lopez, M., Serfling, S., Gieseke, C., and Reimschuessel, R. 2006. Determination of 17 α -Methyltestosterone in Muscle Tissues of Tilapia, Rainbow Trout, and Salmon Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, 54(9): 3193-3198.
- Coors, U. 1991. Utilization of the tocopherol pattern recognition of fat and oil adulteration. **Fat Science Technology**, 93: 519-526.
- Dan, N. C., and Little, D. C. 2000. The culture performance of monosex and mixed sex new-season and overwintered fry in three strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in northern Vietnam. **Aquaculture**, 10(2): 32-34.

- Das, P., Mandal, S. C., Bhagabati, S. K., Akhtar, M. S., and Singh, S. K. 2012. Important live food organisms and their role in aquaculture. **Frontiers in aquaculture**, 5(4): 69-86.
- Dergal, N. B., Scippo, M-L., Degand, G., Gennotte, V., Mélard, C., and Sidi-Mohammed Abi-Ayad, El-A. 2016. Monitoring of 17 α -methyltestosterone residues in tilapia's (*Oreochromis niloticus*) flesh and experimental water after its sex reversal. **International Journal of Biosciences**, 9 (6):101-113.
- Dinchev, D., Janda, B., Evstatieva, L., Oleszek, W., Aslani, M. R., and Kostova, I. 2008. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. **Phytochemistry**, 69(1): 176-186.
- Donaldson, E. M., and Hunter, G. A. 1982. Sex control in fish with particular reference to salmonids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **Aquatic Sciences**, 39: 99–110.
- Ebert, D. 2022. Daphnia as a versatile model system in ecology and evolution. **Evolutionary Developmental Biology**, 13(1): 16.
- El-Greisy, Z. A. and El-Gamal, A. E. 2012. Monosex production of tilapia, *Oreochromis niloticus* using different doses of 17 α -methyltestosterone with respect to the degree of sex stability after one year of treatment. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, 38(1): 59–66.
- Edmondson, W. T. 1966. **Freshwater Biology**. 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York, London, 12248.
- FAO. 2023. **World Food and Agriculture–Statistical Yearbook 2023**. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc8166en>.
- Fitzpatrick, M. S., Contreras-Sánchez, W. M., and Schreck, C. B. 2000. Fate of methyltestosterone in the pond environment: detection of MT in soil after treatment with MT food. **Seventeenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP**, Oregon State University, Corvallis, Oregon, 109-112.

- Froese, R. 2006. Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. **Journal of applied ichthyology**, 22(4): 241-253.
- Ghosal, I., and Chakraborty, S. B. 2014. Effects of the aqueous leaf extract of *Basella alba* on sex reversal of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, 9(2): 162-164.
- Ghosal, I., D. Mukherjee, C. Hancz, and Chakraborty, S. B. 2015. Efficacy of *Basella alba* and *Tribulus terrestris* extracts for production of monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, 5(08): 152–158.
- Ghosal, I., D. Mukherjee, C. Hancz, and Chakraborty, S. B. 2016. Production of monosex Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* by dietary and immersion treatment with *Basella alba* leaves and *Tribulus terrestris* seeds. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, 4(1): 358–363.
- Ghosal, I., and Chakraborty, S. B. 2020. Production of monosex all-male Nile tilapia using ethanol extract of *Tribulus terrestris* seeds. In **Proceedings of the Zoological Society** (Vol. 73, No. 2, pp. 188-191). New Delhi: Springer India.
- Ghosal, I., Mukherjee, D., and Chakraborty, S. B. 2021. The effects of four plant extracts on growth, sex reversal, immunological and haemato-biochemical parameters in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Aquaculture Research**, 52(2): 559-576.
- Green, B. W. and D. R. Teichert-Coddington. 2000. Human Food Safety and Environmental Assessment of the Use of 17 α -Methyl testosterone to Produce Male Tilapia in the United States. **Journal World Aquaculture Society**, 31(3): 337-357.
- Hassona, N. N., Zayed, M. M., Eltras, W. F., and Mohamed, R. A. 2020. Dietary supplementation of *Tribulus terrestris* extract improves growth and reproductive performances of the male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Research**, 51(10): 4245-4254.

- Holfelder, T. L. 2024. **Evaluation Of Feed Intake, Growth, And Reproduction In The Zebrafish, *Danio Rerio*, Fed A Gel-Based Diet**. All ETDs from University of Alabama at Birmingham. 3908. <https://digitalcommons.library.uab.edu/etd-collection/3908>.
- Holden, K. K. and Bruton, M. N. 1992. A life-history approach to the early ontogeny of the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* (Pisces, Cichlidae). **South African Journal of Zoology**, 27: 173– 191.
- Idowu, A. A., Popoola, O. C., Alani, J. O., Ipadeola, A., and Nwekoyo, V. E. 2020. Toxicity effect of *Kigelia africana* aqueous extract on the haematology and histopathology of juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Agro-Science**, 19(1): 37-42.
- Ito, N., Hakamata, H., and Kusu, F. 2010. Simultaneous determination of β -sitosterol, campesterol, stigmasterol, and brassicasterol in serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Analytical methods**, 2(2): 174-179.
- Ito, M., Ishimaru, M., Shibata, T., Hatate, H., and Tanaka, R. 2017. High-performance liquid chromatography with fluorescence detection for simultaneous analysis of phytosterols (stigmasterol, β -sitosterol, campesterol, ergosterol, and fucosterol) and cholesterol in plant foods. **Food Analytical Methods**, 10: 2692-2699.
- Ivleva, I. V. 1973. **Mass cultivation of invertebrates. Biology and methods**. Israel Program for Scientific Translations. Jerusalem, 82-120.
- Jarimopas, P., Tavaratmaneekul, P., and Inkuan, A. 1994. **Gonadal Development of Thai Red Tilapia**. Proceedings of the 32nd Kasetsart University Annual Conference: **Animal Science, Veterinary Science and Fisheries**, Bangkok, 488–505. (In Thai).
- Jayaprakas, V., and Sindhu, B. S. 1996. Effect of hormones on growth and food utilization of the Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. **Fishery. Technology**, 33(1): 21-27.

- Jensi, A., Marx, K. K., Rajkumar, M., Shakila, R. J., and Chidambaram, P. 2016. Effect of 17 α -methyl testosterone on sex reversal and growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.,1758). **Ecology Environment and Conservation**, 22: 1493-1498.
- Jian, J., and Wu, Z., 2003. Effect of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of larvae of yellow croaker *Pseudosciaena crocea* (Richardson). **Aquaculture**, 218: 1–9.
- Kavitha, P., and Subramanian, P. 2011. Influence of *Tribulus terrestris* on testicular enzyme in freshwater ornamental fish *Poecilia latipinna*. **Fish physiology and biochemistry**, 37(4): 801-807.
- Kembenya, E., and Nyakwama O. R. 2021. Growth performance of male monosex and mixed sex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) reared in cages, Lake Victoria, Kenya. **International Aquatic Research**, 13(3): 227-232. Doi: 10.22034/Iar.2021.1931627.1164.
- Kiriyakit, A. 2014. Efficacy of red kwao krua (*Butea superba* Roxb.) crude extract for all- male production of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Agricultural Technology**, 10(2): 391-398.
- Kostova, I., Dinchev, D., Rentsch, G.H., Dimitrov, V., and Ivanova, A. 2002. Two new sulfated furostanol saponins from *Tribulus terrestris*. **Zeitschrift Fur Naturforschung**, 57: 33–38.
- Lal, J., Biswas, P., Singh, S. K., Debbarma, R., Deb, S., Yadav, N. K., and Patel, A. B. 2023. Effects of dietary aromatase inhibitors on masculinization of rosy barb (*Pethia conchonius*): Evidence from growth, coloration and gonado-physiological changes. **Plos one**, 18(11): e0287934.
- Ling, W. H., and Jones, P. J. H. 1995. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. **Life sciences**, 57(3): 195-206.
- Little, D. C., Bhujel, R. C., and Pham, T. A. 2003. Advanced nursing of mixed-sex and mono-sex tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry, and its impact on subsequent growth in fertilized ponds. **Aquaculture**, 221: 265–276.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Long, D. P., Losordo, T. M., and Rakocy, J. E., 2009. **Tank culture of tilapia. Southern Regional aquaculture center (SARC) Publication No. 282.** Education and Extension Service Grant. SRAC No. 2007–38500–18470.
- Mair, G.C., Abucay, J.S., Beardmore, J.A., and Skibinski, D.O.F. 1995. Growth performance trials of genetically male tilapia (G17a-MT) derived from YY-males in *Oreochromis niloticus* L.: On station compositions with mixed sex and sex reversed male populations. **Aquaculture**, 137: 313–322.
- Marjani, M., Jamili, S., Mostafavi, P. G., Ramin, M., and Mashinchian, A. 2009. Influence of 17-alpha methyl testosterone on masculinization and growth in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Journal of fisheries and aquatic science**, 4(1): 71-74.
- Manklinniam, P., Chittapun, S., and Maiphae, S. 2018. Growth and nutritional value of *Moina macrocopa* (Straus, 1820) fed with *Saccharomyces cerevisiae* and *Phaffia rhodozyma*. **Crustaceana**, 91(8): 897-912.
- Mansour, A. T., Omar, E. A., Srour, T. M., and Yousef, M. I. 2018. Effect of three natural phytochemicals supplementation on growth performance, testosterone level and feed utilization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture nutrition**, 24(1): 408-415.
- Manosroi, A., Saraphanchotiwitthaya, A., and Manosroi, J. 2006. Effects of *Pouteria cambodiana* extracts on in vitro immunomodulatory activity of mouse immune system. **Fitoterapia**, 77(3): 189-193.
- Marwah, A., Marwah, P., and Lardy, H. 2005. Development and validation of a high performance liquid chromatography assay for 17 α -methyl testosterone in fish feed. **Journal of Chromatography**, 824(1-2): 107-115.
- Mateen, A., and Ahmed, I. 2015. Androgen sex reversal, subsequent growth and meat quality of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, 52(1): 199-202.
- Megbowon, I., and Mojekwu, T. O. 2013. Tilapia sex reversal using methyltestosterone (MT) and its effect on fish, man and environment. **Biotechnology**, 13: 213–216.

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Mengumphan, K., Samitasiri, Y., and Carandang R. 2006. The Potential of Red Kwao Kreua (*Butea superba*) in inducing sex reversal on three Strains (Red, Ghana, Chitralada) of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) and the effect of 17 α -methyltestosterone. **Asian Fisheries Science**, 19: 271-279.
- Mukherjee, D., Ghosal, I., and Chakraborty, S.B. 2015. Application of *Asparagus racemosus* roots for production of monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Advanced Research**, 3(9): 828-833.
- Mukherjee, D., Ghosal, I., Hancz, C., and Chakraborty, S. B. 2018. Dietary administration of plant extracts for production of monosex tilapia: Searching a suitable alternative to synthetic steroids in tilapia culture. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 18(2): 267-275.
- Mukhopadhyay, P., Venkatesh, B., and Das, P. 1986. Growth and some biochemical changes in *Clarias batrachus* due to methyl testosterone. **Indian Journal of Fisheries**, 33(3): 262-269.
- Mumford, S. L. 2004. **Chapter 13 Histology for finfish.** in NWFHS Laboratory Procedures Manual, 2nd, Olympia Fish Health Center, Olympia, Washington.
- Naiel, M. A., Ismael, N. E., and Shehata, S. A. 2019. Ameliorative effect of diets supplemented with rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on aflatoxin B1 toxicity in terms of the performance, liver histopathology, immunity and antioxidant activity of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, 511: 734264.
- Nakamura, M., and Iwahashi, M. 1982. Studies on the practical masculinization in *Tilapia nilotica* by the oral administration of androgen [hormone, diets]. **Bulletin-Japanese Society of Scientific Fisheries**, 48: 763-769.
- Nakamura, M., 1984. Effects of estradiol-17 β on gonadal sex differentiation in two species of salmonids, the masu salmon, *Oncorhynchus masou*, and the chum salmon *O. keta*. **Aquaculture**, 43: 83-90.
- Nakamura, M. and Nagahama, Y. 1985. Steroid producing cells during ovarian differentiation of the Tilapia, *Sarotherodon niloticus*. **Development, Growth & Differentiation**, 27: 701-708.

- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X., and Nagahama, Y. 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. **Journal of Experimental Zoology**, 281: 362-372.
- Nakamura, M. 2013. Morphological and physiological studies on gonadal sex differentiation in teleost fish. **Aqua-bioscience Monographs**, 6(1): 1-47.
- Namchaiw P, Jaisin Y, Niwaspragrit C, Malaniyom K, Auvuchanon A, Ratanachamnong P. 2021. The leaves extract of *Coccinia grandis* (L.) Voigt accelerated in vitro wound healing by reducing oxidative stress injury. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. <https://doi.org/10.1155/2021/3963510>.
- Nehemia, A., Maganira, J. D., and Rumisha, C. 2012. Length-weight relationship and condition factor of tilapia species growth in marine and fresh water ponds. **Agriculture and Biology Journal of North America**, 3(3):117-124.
- New, M. B. 1998. **Global aquaculture**: Current trends and challenges for the 21st century. In: *Anans do Aquacultura Brasil 98*, Vol. I. Nov.2-6, Recife.
- Nimsoongnern, S., Pinthong, D., Plasen, S., Wilairat, P., Kusamran, T., and Anukarahanonta, T. 2008. **The effect of *butea superba* roxb., a Thai traditional medicine, on endogenous steroid levels in males**. Retrieved from: Tongkatali.org Bibliography.
- Nunes, V. O., Vanzellotti, N. D. C., Fraga, J. L., Pessoa, F. L. P., Ferreira, T. F., and Amaral, P. F. F. 2022. Biotransformation of phytosterols into androstenedione: A technological prospecting study. **Molecules**, 27(10): 3164.
- Oka, Y, Kiriyaama S, and Yoshida, A. 1973 Sterol composition of fruits, fungi, marine algae and tea, coffee and cocoa. **Eiyo To Shokuryo**, 26: 317-327.
- Oka, T., Nishimura, Y., Zang, L., Hirano, M., Shimada, Y., Wang, Z., Umemoto, N., Kuroyanagi, J., Nishimura, N., and Tanaka, T. 2010. Diet-induced obesity in zebrafish 3 shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. **BMC Physiol**, 410(21): 1-13.
- Pacheco, P. N., O., B., Santos, A., Feitosa, S., J. R., and Mota, S. 2021. Alterations in the development and gonadal structure of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- exposed to natural and synthetic estrogens. **Water, Air, and Soil Pollution**, 232: 1-13.
- Park, I. S., Kim, J. H., Cho, S. H., and Kim, D. S. 2004. Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco* (Richardson). **Aquaculture**, 232(1-4): 183-193.
- Peykaran, M. N., Vahabzadeh, H., Seidgar, M., Hafezieh, M., and Pourali, H. R. 2014. Proximate composition and fatty acids profiles of Artemiacysts, and nauplii from different geographical regions of Iran. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, 13(3): 761–775.
- Pengcharoen, O., 2002. Technology Chao Barn. **Matichon Press**, Bangkok, pp. 42–43.
- Picheansoonthon, C., and Koonterm, S. 2008. Notes on the genus *Kaempferia* L. (Zingiberaceae) in Thailand. **Journal of Thai Traditional and Alternative Medicine**, 6(1): 73-93.
- Phelps, R.P., and Popma, T.J., 2000. Sex reversal of tilapia. In: CostaPierce, B.A., Rakocy, J.E. (Eds.). In: *Tilapia Aquaculture in the Americas*, vol. 2. **The World Aquaculture Society**, Baton Rouge, LA, United States, pp. 34–59.
- Pilapang, K., Dandrit, D. and Yomla, R. 2022. Study on different concentrations and timings of 17 α -methyltestosterone to accumulate in water flea (*Moina* spp.) from lab-scale. **International Journal of Agricultural Technology**, 18: 311-318.
- Risto U, Hajrulai-Musliu Z., Stojanovska-Dimzoska B., Dimitrieska-Stojkovic E., Todorovic, A., and Stojkovski V. 2013. Validation of screening method for determination of methyl testosterone in fish. **Macedonian Veterinary Review**, 36(1): 19-23.
- Roengsumran, S., Petsom, A., Ngamrojanavanich, N., Rugsilp, T., Sittiwichienwong, P., Khorphueng, P., and Chaichantipyuth, C. 2000. **Flavonoid and flavonoid glycoside from *Butea superba* Roxb. and their cAMP phosphodiesterase inhibitory activity**. *Journal of scientific research*, Chulalongkorn University, 25(1): 169-176.
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Rottmann, R. W., Graves, J. S., Watson, C., and Yanong, R. P. E. 2017. **Culture techniques of *Moina*: The ideal *Daphnia* for feeding freshwater fish fry.** Florida: Fisheries and Aquatic Sciences Department, UF/IFAS Extension, University of Florida.
- Sudwan, P., Saenphet, K., Saenphet, S., and Suwansirikul, S. 2006 Effect of *Kaempferia parviflora* Wall. ex, Baker on sexual activity of male rats and its toxicity. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, 37: 210–215.
- Sudwan, P., Saenphet, K., Aritajat, S., and Sitasuwan, N. 2007. Effects of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. on sexual behavior of male rats. **Asian Journal of Andrology**, 9: 849–855.
- Sivaram, V., Babu, M. M., Immanuel, G., Murugadass, S., Citarasu, T., Marian, M. P., 2004. Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. **Aquaculture**, 237: 9-20.
- Taddesse, F., Huh, M. D., Bai, S. C., and Vijverberg, J. 2014. Histological changes of liver in overfed young Nile tilapia. **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, 9(2): 63-74.
- Tamaru, C. S., Murashige, R., and Lee, C. S., 1994. The paradox of using background phytoplankton during the larval culture of striped mullet, *Mugil cephalus* L. **Aquaculture**, 119: 167-174.
- Temkitthawon, P., Hinds, T. R., and Beavo, J. A. 2011. *Kaempferia parviflora*, a plant used in traditional medicine to enhance sexual performance contains large amounts of low affinity PDE5 inhibitors. **Journal of Ethnopharmacology**, 137: 1437-1441.
- Tewtrakul, S., and Subhadhirasakul, S. 2008. Effects of compounds from *Kaempferia parviflora* on nitric oxide, prostaglandin E2 and tumor necrosis factor-alpha productions in RAW264. 7 macrophage cells. **Journal of ethnopharmacology**, 120(1): 81-84.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Tran-Duy, A., Schrama, J. W., Van Dam, A. A., and Verreth, J. A. 2008. Effects of oxygen concentration and body weight on maximum feed intake, growth and hematological parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, 275(1-4): 152-162.
- Trisomboon, H., Watanabe, G., Wetchasit, P., and Taya, K. 2007. Effect of dairy treatment with Thai herb, *Kaempferia parviflora*, in Hershberger assay using castrated immature rats. **The Journal of Reproduction and Development**, 53: 351–356.
- Tomova, M., Gyulemetova, R., Zarkova, S., Peeva, S., Pangarova, T., Simova, M. 1981. Steroidal saponins from *Tribulus terrestris* with a stimulating action on sexual functions. In: Atanasowa B, editor. Int. Conf. Chem. Biotechnology Journal. **Bulgarian Academical Society**, 298-302.
- Vera Cruz, E. M., and Mair, G. C. 1994. Conditions for effective androgen sex reversal in *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, 122: 237– 248.
- Vinarukwong, N., Lukkana, M., Ruangwises, S., and Wongtavatchai, J. 2018. Residual levels of 17 α -methyl dihydrotestosterone in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry following feeding supplementation. **Cogent Food and Agriculture**, 4(1): 1526436.
- Wolf, C. J., Gerald, A.L., Earl, L., and Gray, J. R., 2004. Interactive effects of vinclozolin and testosterone propionate on sexual differentiation of the rats. **Toxicological Sciences**, 78: 135–143.
- Yamamoto, T., 1969. Sex differentiation: Reproduction and growth bioluminescence, pigments, and poisons. **Fish physiology**, 3: 117-175.
- Yenjai, C., Prasanphen, K., Daodee, S., Wongpanich, and V., Kittikoop, P. 2004. Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. **Fitoterapia**, 75: 85-92.
- Yeganeh, S., Sotoudeh, A., and Movaffagh, A. N. 2017. Effects of *Tribulus terrestris* extract on growth and reproductive performance of male convict cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 17(5): 1003–1007. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v17_5_15

Zhao, Z., Zhao, Q., Wang, H., Wei, L., Wang, S., Li, S., and Wang, Z. 2023. Integrated transcriptomic and metabolomic analyses identify key factors in the vitellogenesis of juvenile Sichuan bream (*Sinibrama taeniatus*). **Frontiers in Marine Science**, 10: 1243767.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารเผยแพร่ผลงานวิจัยระดับนานาชาติ

เรื่อง Study on different concentrations and timings of 17 α -methyltestosterone to accumulate in water flea (*Moina* spp.) from lab-scale

International Journal of Agricultural Technology 2022 Vol. 18(1):311-318

Available online <http://www.ijat-aatsea.com>

ISSN 2630-0192 (Online)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study on different concentrations and timings of 17 α -methyltestosterone to accumulate in water flea (*Moina* spp.) from lab-scale

Pilapang, K.¹, Dandrit, D.² and Yomla, R.^{1*}

¹Department of Animal Production and Fishery, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Bangkok, THAILAND; ²Amber Farm Co., Ltd., Bangkok, THAILAND.

Pilapang, K., Dandrit, D. and Yomla, R. (2022). Study on different concentrations and timings of 17 α -methyltestosterone to accumulate in water flea (*Moina* spp.) in lab-scale. International Journal of Agricultural Technology 18(1):311-318.

Abstract The different concentrations and immersion times of 17 α -methyltestosterone (17MT) on the accumulation in water flea were investigated. Results were found that amount of 17MT of both groups in each period displayed significantly different ($P < 0.05$) when compared to the control. The highest accumulation of 17MT was found at the concentration of 100 $\mu\text{g/L}$ for 420 minutes equal to $0.46 \pm 0.10 \text{ mg/L}$. In contrast, it was found that the amount of 17MT in both concentrations of water at three times was not statistically significant ($P > 0.05$) in each treatment. Therefore, results indicated that the accumulation of 17MT in water fleas can be applied for using accumulated water flea to produce male tilapia.

Keywords: 17 α -methyltestosterone, Water flea, Concentration, Immersion time

Introduction

Synthetic hormones 17 α -methyltestosterone (17MT) are generally used to mix in larval feed for producing all-male tilapia. The concentration at 60 mg per one kilogram of feed has been reported to feed tilapia larvae for 21 days (Beardmore *et al.*, 2001). However, the 17MT has been reported to detect in the sediment after using to mix in fish feed (Fitzpatrick and Contreras-Sánchez, 2000; Green and Teichert-Coddington, 2000; Mlalila *et al.*, 2015). Zooplanktons such as rotifers, copepods, or cladocerans (water fleas) as live food for fish larvae, are containing protein, carbohydrates, vitamins, minerals, and amino acids, including fatty acids, which support a high rate of survival, increase the growth of small aquatic animals (New, 1998). An environmentally friendly way may be to use zooplanktons enrich with the 17MT to gain sex reversal. Therefore, the objective of the preliminary study was to study on accumulation of 17MT in water flea immersing at different concentrations and duration times. Future benefits of

* Corresponding Author: Yomla, R.; Email: rungtawan.yo@kmitl.ac.th

being used water flea as a natural feed may support sex reversal and fast-growing of the nursing stage of tilapia.

Materials and methods

Stock hormone preparation

The concentration of 17MT hormone solution was modified from the method of Jensi *et al.* (2016) by using 200 mg of 17MT powder mixed with 20 ml ethanol. And then, this solution was kept at 4°C (Barbosa *et al.*, 2013).

Sample preparation

Water flea sample in this experiment was randomly collected from snakehead fishpond near King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok. These were quickly disinfected with 10% formalin and then washed twice with tap water. These were stocked in clean water a day.

A total of 0.26 g of stock water flea was immersed into 17MT concentrations at 50 and 100 mg/L. Each concentration was designed to use water flea immersing 30, 60, and 420 minutes, respectively. The 17-MT extraction from water flea was used High Performance Liquid Chromatography (HPLC; HITACHI, Chromaste) at the Industrial University Collaborative Research Center, Faculty of Agricultural Technology for analysis.

17-MT evaluation using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique

All immersed water fleas of each experiment were separately collected by washing in 5 ml of distilled water three times. Then, these water fleas were put into 1.5 ml test tubes and euthanized by freezing for 30 minutes. These samples were crushed and added with 0.6 ml of 95% ethanol. These samples were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4°C, and the supernatant was used to pass in a 0.45-micrometer syringe filter. Later, approximately 1 ml of the extracted MT and immersed water was transferred into the vial and kept at 10°C before detection. We also preserved immersed water to evaluate the residue 17MT.

To quantify all extracted 17 MT of each group, the mobile phase was prepared by mixing acetonitrile (HPLC grade) and ultrapure water (HPLC grade) at a ratio of 60:40 v/v and preparing 70% methanol for column washing. And it filtered with a mobile phase filter before using for analysis. The standard solution was diluted to a concentration at 0.01-0.25 mg/mL.

with 50% ethanol and filtered by a syringe filter into a 1 ml of vial bottom. This method is modified from Barbosa *et al.* (2013)

The HPLC condition was based on a method adapted from Barbosa *et al.* (2013) and Luvizotto-Santos *et al.* (2009) with UV detection at a wavelength of 245 nm. The used column was the Inspire™ C18 normal phase column (150x4.6 mm) in combination with the Phenomenex Security Guard column and the mobile phase is Acetonitrile: Ultrapure water (60:40 v/v) injection volume 10 µl at a flow rate of 1 ml/min at 25°C.

Data analysis

Hormone dosage was calculated from the relationship curve between the standard 17MT concentration level and the area under the peak using the Microsoft Excel program. Then analyze the difference in the amount of accumulation of 17MT in water flea and periods by using SYSTAT® 13.

Results

The standard solution of the peak (retention time) of 17MT was found in the range of 4.44 to 4.56 minutes. We found all mean peak times of different concentrations (50 and 100 mg/L) and different periods (30, 60, and 420 minutes) displaying in the range of the peak of the standard (Figure 1 and Figure 2). The standard curve was linear in the investigated range. The equation of the standard curve was obtained by regression analysis was: $y = 3E+07x + 41952$ ($R^2 = 0.9981$).

The results were shown statistically different significant ($P < 0.05$) of the 17MT accumulation of both groups at different times, (Figure 3). The amount of 17MT in extracted water flea at a concentration of 50 mg/L within 30, 60, and 420 minutes was found 0.02 ± 0.02 , 0.05 ± 0.02 , and 0.12 ± 0.06 mg/10µl, respectively. At 100 mg/L was found 0.16 ± 0.02 , 0.23 ± 0.06 , and 0.46 ± 0.10 mg/10µl, respectively. In addition, it determined to random water sample after finishing to immerse water flea which 17MT, which shown not different significance ($P > 0.05$) (Figure 4). The amount of 17MT at a concentration of 50 mg/L was displayed 0.04 ± 0.00 , 0.04 ± 0.00 , and 0.03 ± 0.00 mg/10µl within 30, 60, and 420 minutes, respectively. At 100 mg/L was found 0.05 ± 0.00 , 0.04 ± 0.00 , and 0.04 ± 0.00 mg/10µl within 30, 60, and 420 minutes, respectively. The peaking time at concentrations of 50 and 100 mg/L at 30, 60 and 420 minutes had the meantime of 4.44 minutes, all the same (Figure 5).

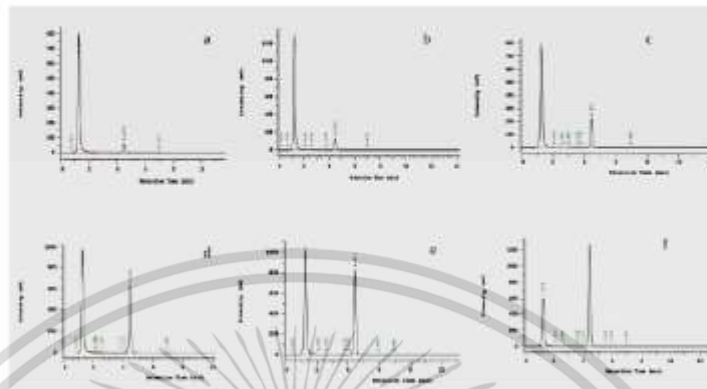


Figure 1. 17MT accumulation in water fleas at concentrations of 50 and 100 mg/L and times at 30, 60 and 420 mins. (50 mg/L; 30 (a) 60 (b) and 420 (c) and 100 mg/L; 30 (d) 60 (e), and 420 (f))

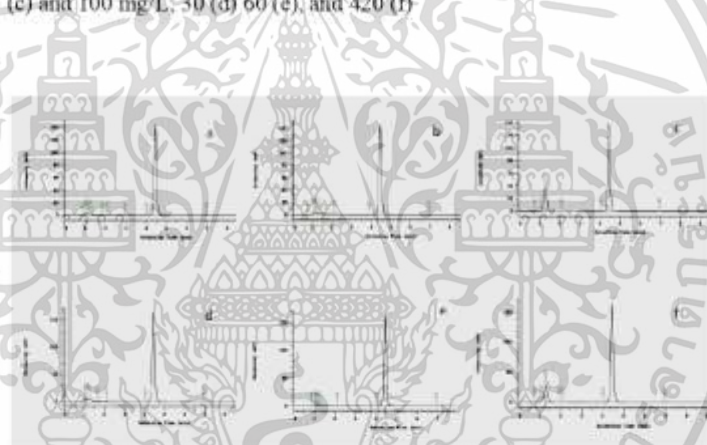


Figure 2. 17MT from immersed water at concentrations of 50 and 100 mg/L and times at 30, 60 and 420 mins. (50 mg/L; 30 (a) 60 (b) and 420 (c) and 100 mg/L; 30 (d) 60 (e), and 420 (f))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

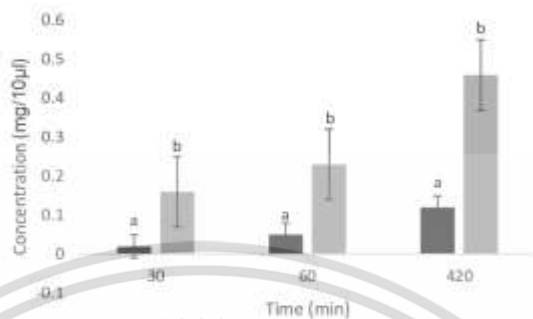


Figure 3. 17MT accumulation from water fleas extract at concentrations of 50 and 100 mg/L and immersion times at 30, 60, and 420 mins

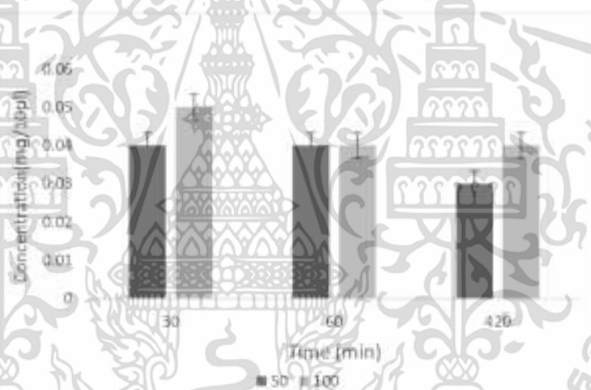


Figure 4. 17MT from immersed water at concentrations of 50 and 100 mg/L and times at 30, 60, and 420 mins

Discussion

The retention time of the 17MT in extracted water fleas to compare with the standard curve, which supported that the peak causing of the 17MT accumulation. It used a high concentration of 17MT for a long time to immerse water fleas, these were shown to have the highest accumulation in

extracted water flea. On the other hand, the lower concentration for a few times of immersion was detected the lower 17MT in extracted water flea. However, water fleas were immersed for a long time having low alive water flea. Moreover, all groups of immersed water after removing water flea were still to detect the residue 17MT after 420 mins. At the same of Kolodziej *et al.* (2004) is reported that the residue steroid hormones in dairy wastewater.

It should be noted that the 17MT at 50 mg/L be suitable used to immerse zooplanktons to reverse male production. Although, several articles have been reported that a high percentage of male tilapia requiring the 17MT in the range of 40-65 mg/kg (Marjani *et al.*, 2009; Celik *et al.*, 2011; Dergal *et al.* (2016) and Jensi *et al.*, 2016). Because of the 17MT at 50 mg/L was remained no difference from 100 mg/L at the end of immerse period (420 mins). In addition, the standard graph between the concentration and the area under the peak with a high positive correlation ($R^2 = 0.9981$). High concentration was displayed an increasing peak and decreased concentration displayed a decreased peak. Green and Teichert-Coddington (2000) reported that the 17MT was decreased at <100 pg/g at 8-40 days post-transsexual with 17MT and withdrawal periods were up to 120 days after sex reversal. However, the residue 17MT at the marketing size (4 to 5 months) was not harmful to consumers (White *et al.*, 2006). We found the difference of residue 17MT in immersed water within 420 mins, which caused the effect of plankton, microbes, or photo-reaction. In addition, the 17MT was still detected in immersed water after 3 weeks. The reduction of hormones in an environment may react by photosynthesis or microbial degradation (White *et al.*, 2006).

In conclusion, extracted water flea was found the highest 17MT accumulation at a concentration of 100 mg/L and immersion time at 420 mins. Future and research perspectives will focus on the potential of immersed water flea in the 17MT to reverse male production.

Acknowledgments

The author would like to thank Miss Nahatai Vajirothai, the Industrial University Collaborative Research Center, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, who support working with the HPLC.

References

- Beardmore, A., Mair, G. C. and Lewis, R. I. (2001). Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: Applications, problems, and prospects. *Aquaculture*, 197:283-301.

- Barbosa, I. R., Lopes, S., Oliveira, R., Domingues, I., Soares, A. M. and Nogueira, A. J. (2013). Determination of 17 α -methyl testosterone in freshwater samples of tilapia farming by high performance liquid chromatography. *American Journal of Analytical Chemistry*, 4:207.
- Celik, I., Guner, Y. and Celik, P. (2011). Effect of orally-administered 17 α -Methyl testosterone at different doses on the sex reversal of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10:853-857.
- Dergal, N. B., Scippo, M-L., Degand, G., Genotte, V., Mèlard, C., Sidi-Mohammed, El-A. (2016). Monitoring of 17 α -methyltestosterone residues in tilapia's (*Oreochromis niloticus*) flesh and experimental water after its sex reversal. *International Journal of Biosciences*, 9 (6):101-113.
- Fitzpatrick, M. S. and Contreras-Sánchez, W. C. (2000). Fate of methyltestosterone in the pond environment; Detection of MT in soil after treatment with MT food. In: K. McElwee, D. Burke, M. Niles, X. Cummings, and H. Egnia (Editors), *Seventeenth Annual Technical Report, Pond Dynamics/Aquaculture CRSP*, Oregon State University, Corvallis, Oregon:109-112.
- Green, B. W. and Teichert-Coddington, D. R. (2000). Human Food Safety and Environmental Assessment of the use of 17 α -methyl testosterone to produce male tilapia in the United States. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31:337-357.
- Jensi, A., Marx, K. K., Rajkumar, M., Shakila, R. J. and Chidambaram, P. (2016). Effect of 17 α -methyl testosterone on sex reversal and growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L., 1758). *Ecology, Environment and Conservation*, 22:1493-1498.
- Kolodziej, E. P., Harter, T. and Sedlak, D. L. (2004). Dairy wastewater, aquaculture, and spawning fish as sources of steroid hormones in the aquatic environment. *environmental science and technology*, 38:6377-6384.
- Luvizotto-Santos, R., Cordeiro, P. J. M. and Vieira, E. M. (2009). Analysis of diflubenzuron in tilapia filet by HPLC-DAD. *Journal of chromatographic science*, 47:785-788.
- Marjani, M., Jamili, S., Mostafavi, P.G., Ramini, M. and Mashinchian, A. (2009). Influence of 17-Alpha Methyl Testosterone on Masculinization and Growth in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 4(1):71-74.
- Mlalila, N., Mahika, C., Kalombo, L., Swai, H. and Hilonga, A. (2015). Human food safety and environmental hazards associated with the use of methyl testosterone and other steroids in production of all-male tilapia. *Environmental Science and Pollution Research*, 22:4922-4931.
- New, M. B. (1998). Global aquaculture: Current trends and challenges for the 21st century. In: *Anais do Aquicultura Brasil 98*, Vol. I Nov.2-6, Recife.
- White, J. R., Belmont, M. A. and Metcalfe, C. D. (2006). Pharmaceutical compounds in wastewater: wetland treatment as a potential solution. *The scientific world journal*, 6:1731-1736.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SYSTAT® 13 copyright © 2009 by SYSTAT Software, Inc., Washington street,
Chicago.

(Received: 8 November 2021, accepted: 30 December 2021)



318

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารเผยแพร่งานวิจัยระดับนานาชาติ

เรื่อง The effect of Moina sp. immersion with 17alpha-methyl testosterone (17MT) on growth performances and sex reversal of Nile tilapia

International Journal of Agricultural Technology 2023 Vol. 19(4):1765-1776

Available online <http://www.ijat-aatsea.com>

ISSN 2630-0192 (Online)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The effect of *Moina* sp. immersion with 17alpha-methyl testosterone (17MT) on growth performances and sex reversal of Nile tilapia

Pilapang, K., Srijad, S. and Yomla, R.*

Department of Animal Production and Fishery, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMUTT), Bangkok, THAILAND.

Pilapang, K., Srijad, S. and Yomla, R. (2023). The effect of *Moina* sp. immersion with 17alpha-methyl testosterone (17MT) on sex reversal of Nile tilapia. International Journal of Agricultural Technology 19(4):1765-1776.

Abstract The results found that *Moina* sp. immersion with 17alpha-methyl testosterone (17MT) has a non-effect on the growth performances and non-effect on the sex reversal of Nile tilapia. The higher length, weight and specific growth rate were found in the PC (PC: 60 mg/l 17MT/kg mixing commercial feed) and the NC (only commercial feed without 17MT) than in other groups (50 and 100 mg/l 17MT/l immersing *Moina* sp.). The length and the weight of the PC and NC groups showed no significant difference. But these groups were different from the groups of 50 and 100 mg/l. The average length of the PC, NC, 50- and 100 mg/l were displayed at 2.67 ± 0.08 , 2.86 ± 0.17 , 1.45 ± 0.07 and 1.46 ± 0.02 cm, respectively. The average weight of the PC, NC, 50- and 100 mg/l was displayed as 0.40 ± 0.07 , 0.51 ± 0.08 , 0.08 ± 0.10 and 0.07 ± 0.01 g, respectively. The highest specific growth rate was found in the NC group ($2.37 \pm 0.00\%$). The survival rate of the NC group was not significantly different from other groups. 17MT does not affect growth performances in the larval stage. However, dried *Moina* sp. immersion in 17MT could be caused an effect on growth performances and sex reversal.

Keywords: 17 α -methyltestosterone, *Moina* sp., Nile tilapia

Introduction

Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), is the most economic species of freshwater aquaculture in Thailand. Tilapias can be grown and reproduced in a wide range of environmental conditions and tolerate stress induced by handling (Tsodik and Bart, 2007). To achieve more productivity in tilapia growing, farmers produced all-male production (Mair and Little, 1991). Because females are a greater reallocation of metabolic energy toward reproduction. Despite males using metabolic energy to channel toward growth. Thus, this is their benefit from anabolism-enhancing androgens (Tran-Duy *et al.*, 2008; Angienda *et al.*, 2010). Then, synthetic hormones 17 α -methyltestosterone (17MT) are

* Corresponding Author: Yomla R.; Email: rungtawan.yo@kmutl.ac.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

generally used to mix in feed for producing all-male tilapia, which began to feed in tilapia fries (El-Greisy and El-Gamal, 2012). The 17MT concentration has been reported using 30–60 mg/kg feeding larval post-hatching until the 25–60th days (Macintosh and Little, 1995). Beardmore *et al.* (2001) reported using 17MT at the concentration of 60 mg/kg feeding tilapia larvae for 21 days, which produce all sex-male. Histological observations, the first sign of gonadal development is the formation of the genital ridge and the appearance of primordial germ cells (PGC). They were located between the gut and kidney (El-Greisy and El-Gamal, 2012), which are similar observations of two species of salmonids (Nakamura, 1984). In both the control and treated groups, the initial ovaries were easily distinguishable due to the presence of well-developed perinucleolus oocytes. However, there was no clear differentiation observed in the testes, which appeared similar to undifferentiated gonads (El-Greisy and El-Gamal, 2012). A study by Sacobie and Benfey (2005) reported that *T. mossambica*, when subjected to a methyltestosterone dose of 50 mg/g of diet, certain germ cells in the gonads of potentially female individuals underwent oogenesis despite the influence of androgens, but eventually degenerated (Nakamura *et al.*, 1974).

Zooplankton plays a crucial role as a food source for young and some adult freshwater fish. Throughout the year, the dominant groups of zooplankton in freshwater ecosystems include rotifers, cladocerans, and copepods. These organisms provide essential nutrients such as protein, carbohydrates, vitamins, minerals, amino acids, and fatty acids. By consuming zooplankton, larval aquatic animals experience improved survival rates and increased growth (Kenneth, 1990; Hutchinson, 1967). One specific freshwater cladoceran, the water flea *Moina macrocopa*, shows great potential as a live food source for both finfish and crustacean larvae (Alam *et al.*, 1993; Kang *et al.*, 2006). According to Rottmann *et al.* (2003), *Moina* typically contains around 50% protein in terms of dry weight, with adult females containing 20–27% fat per dry weight and juveniles containing 4–6% fat. Cladocerans, particularly *Moina* species, are highly nutritious, easily consumed, and digested by fish larvae. They meet the dietary requirements of larvae and contribute to water quality improvement by reducing the need for artificial feeding (He *et al.*, 2001). Nevertheless, not all types of zooplankton are appropriate for rearing fry. However, it has been reported that live rotifers, *Moina*, and *Daphnia* species are beneficial freshwater zooplankton that can significantly improve the protein and overall nutritional composition of farmed fish. A study conducted by Islam *et al.* (2017) demonstrated that the growth performance, as measured by feed conversion ratio, specific growth rate, and protein content, of tilapia fry (*O. niloticus*) was notably enhanced when cultured with *M. macrocopa*.

1766

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Moreover, Jul-a-dung and Komanpririn (2007) studied 17β -estradiol hormone on the feminization of climbing perch (*Anabas testudineus*) by using water fleas and rotifer in the first 2 weeks after hatching for juvenile feed. *M. macrocopa*, a species of water flea, has emerged as a new and innovative method for delivering medication to freshwater aquatic animals. When medicated water fleas are orally administered to fish, the concentration of the drug in the fish's body tissues increases with each subsequent dose, reaching its peak after three feedings. This primary food source shows great potential as a drug delivery system for aquatic animals. Additionally, this approach is environmentally friendly, as it utilizes zooplankton to enrich with 17MT, facilitating sex reversal (Wiwattanapatapee *et al.*, 2002). In a prior investigation (Pilapang *et al.*, 2020), the focus was on assessing the levels and timeframes required for 17 α -methyltestosterone (17MT) to accumulate within water fleas. The aim was to examine the effects on growth performance and sex reversal by immersing *Moina* in various concentrations of 17MT. The results were compared to a positive control group treated with 60 mg of 17MT per kilogram, while the negative control group solely received a commercial feed.

Materials and methods

Fish preparation

In this trial, totaled 1,200 Nile tilapia larvae at the age of 3 days after hatching were taken from Aquaculture and Aquatic Resources Management, Asian Institute of Technology (AIT) to Bansuan Rungtawan, Nong Chok district, Bangkok within 2 hours. These larval fishes having an average weight of 0.0268g were randomized to rear in plastic containers (10 L) managed in a closed circulation system (CCS) by using 100 larval fishes per plastic container (Figure 1).

Experimental design for sex reversal

A completely randomized design with three replicates was used to evaluate the effect of *Moina* sp. immersion with 17 α -methyl testosterone (17MT) on the sex reversal of Nile tilapia. This trial consisted of 4 treatments having (1) *Moina* sp. immersed in 17MT at concentrations of 50 mg/l; (2) *Moina* sp. immersed in 17MT at concentrations of 100 mg/l; (3) the positive group using 60 mg/17MT/kg mixing commercial feed-PC and (4) the negative group without 17MT-NC.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

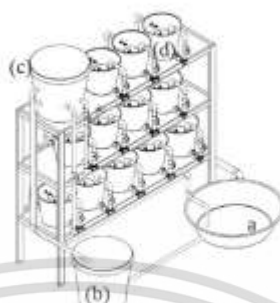


Figure 1. Schematic of closed circulation system; (a) water treatment, (b) water tank with water pump, (c) the water tank relies on the potential difference to distribute water to the nursery containers, and (d) plastic containers

Feed preparation

In stock hormone preparation, the concentration of 17MT hormone solution was modified from the method of Jenst *et al.* (2016) by using 200 mg of 17MT powder mixed with 20 ml of absolute ethanol and this solution was kept at 4°C (Barbosa *et al.*, 2013).

Moina in this experiment was bought from Chatuchak Min Buri market, Bangkok. These were quickly disinfected with potassium permanganate (KMnO₄) and then washed twice with tap water. The totaled 60 g of *Moina* was immersed into 17MT concentrations at 50 and 100 mg/l, with a 300 ml solution volume for 60 minutes. Then immersed *Moina* was filtered, contained in the glass bottle, and kept away from light at 4°C.

The positive control was prepared with 25% of 95% alcohol per kilogram feed at a concentration of 60 mg/kg. The solution was sprayed on powdered commercial feed (Prograde A 101 (Protein ≥40%, Fat≥5%, Fiber≥2%, Moisture≥12%)), and dry at room temperature. The negative group was only powdered commercial feed. These groups were kept in a dark container at 4°C.

Fish rearing management

Tilapia Fries were fed with different diets (50, 100, PC, and NC groups) for 21 days by using Ad-lib four times per day. The CCS used an aquarium submerge pump (4000 L/h), which adjusted a speed of 30L/h to flow into each plastic container without aeration. The excreta and food leftovers at the bottom

1768

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

of the plastic containers were siphoned off to remove every 3 days. Each experimental replicate was assessed daily for fish dried. At the end of the trial, the total weight of each replicate was recorded after 24 h starvation, and ten fishes of each replicate were randomly sampled to evaluate sex reversal.

Histological investigation

Tilapia samples were fixed in Davidson's fixative for 24 hr. and were decalcified in a decalcification solution containing $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (12.67 g), HCl (8.5 ml), formic acid (5 ml), and distilled water (87 ml) for at least 4-8 hr. Then, samples were dissected in the gonadal tissue part (rear part of the body) and these sections were placed in a cassette within/ without sponges depending on sample sizes, which sample cassettes were placed into the tissue processor (Leica, TR 1020). The procedure involved immersing the samples in different percentages of graded alcohol (50, 70, 80, and 95%) and two containers each of absolute alcohol, xylene, and melted paraffin. This immersion program lasted for 1 hour in each container. Subsequently, the samples were embedded in paraffin blocks, trimmed, and sliced into 5-6 μm sections of transverse cross sections of the tilapia gonad using a semi-automatic microtome (Microm, Germany). To stain the sections, the samples were treated with hematoxylin and eosin (H&E) following the method described by Mumford (2004).

Statistical analysis

All parameters as average length and weight and survival rate and specific growth rate (SGR) were analyzed. The SGR at the end of the trial was calculated as described by Sveier *et al.* (2000) as follows:

$$\text{SGR (\%)} = \frac{\ln \text{Final body weight} - \ln \text{Initial body weight}}{\text{Experiment period}} \times 100$$

These parameters were analyzed to be significant at the level of significance $p < 0.05$ by using One-way ANOVA with SYSTAT 13 version program.

Results

The results after 21 days at the end of the trial found a higher length, weight, and growth performance in the control group (PC and NC) than *Moina* feed group, which significant difference between the group that fed with *Moina* immersed with 17MT and all control groups (PC and NC). The length of 50 and 100 mg/l groups as 1.45 ± 0.07 and 1.46 ± 0.02 cm has no significant difference. The length of PC and NC groups as 2.67 ± 0.08 and 2.86 ± 0.17 cm has no significant difference (Figure 2). The weight of 50 and 100 mg/l as 0.08 ± 0.10

1769

and 0.07 ± 0.01 g has no significant difference. The weight of the PC and NC has no significant difference of 0.40 ± 0.07 and 0.51 ± 0.08 g (Figure 3). The specific growth rate of 50 and 100 mg/l has no significant difference of 0.34 ± 0.00 and $0.32 \pm 0.00\%$. The growth performance of PC and NC has a significant difference of 1.86 ± 0.00 and $2.37 \pm 0.00\%$ (Figure 4).

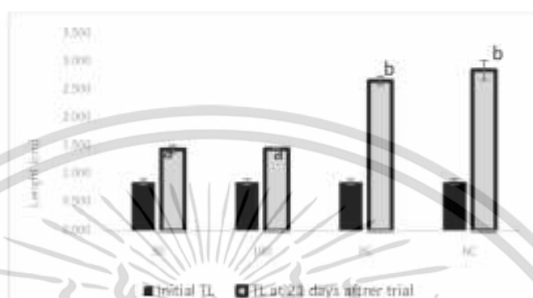


Figure 2. Average length at an initial length and the end of the trial (50= *Moina* sp. immersed in 17MT at concentrations of 50 mg/l; 100= *Moina* sp. immersed in 17MT at concentrations of 100 mg/l; PC= the positive group using 60 mg 17MT/kg mixing commercial feed; and NC= the negative group without 17MT). Different letters are significantly different ($P < 0.05$)

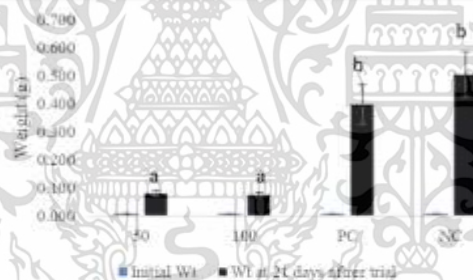


Figure 3. Average weight at an initial weight and the end of the trial (50= *Moina* sp. immersed in 17MT at concentrations of 50 mg/l; 100= *Moina* sp. immersed in 17MT at concentrations of 100 mg/l; PC= the positive group using 60 mg 17MT/kg mixing commercial feed; and NC= the negative group without 17MT). Different letters are significantly different ($P < 0.05$)

1770

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

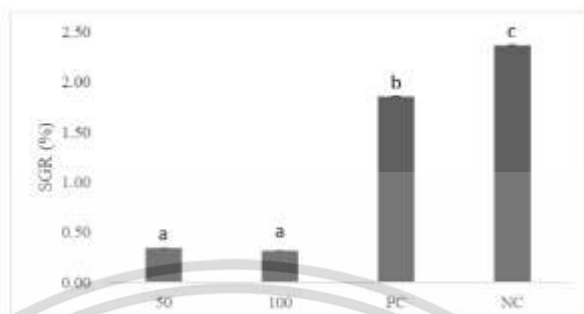


Figure 4. SGR (%) after the end of the trial (50= *Moina* sp. immersed in 17MT at concentrations of 50 mg/l; 100= *Moina* sp. immersed in 17MT at concentrations of 100 mg/l; PC= the positive group using 60 mg/17MT/kg mixing commercial feed; and NC= the negative group without 17MT). Different letters are significantly different ($P < 0.05$)

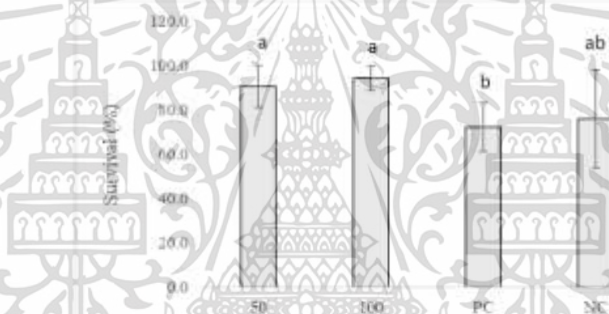


Figure 5. The survival rate after the end of the trial (50= *Moina* sp. immersed in 17MT at concentrations of 50 mg/l; 100= *Moina* sp. immersed in 17MT at concentrations of 100 mg/l; PC= the positive group using 60 mg/17MT/kg mixing commercial feed; and NC= the negative group without 17MT). Different letters are significantly different ($P < 0.05$)

At the end of the trial, the survival percentage of tilapia after 21 days of 50, 100, PC, and NC groups were found 98 ± 9.50 , 98.3 ± 5.50 , 72.3 ± 11.00 , and 76 ± 22.10 , respectively. Two groups of immersed *Moina* with 17MT fed feed

displayed higher survival rates than PC and NC groups, which were not a significant difference in survival (Figure 5). The water quality in the system has shown a pH of 7.1-8.4, dissolved oxygen 5.5-6.5 mg/l and temperature were 27-28°C. Histological investigation to examine the sex reversal of all groups showed failure under the condition of this study.

Discussion

The present study was to study the possibility of sex reversal with immersed *Moina* with 17MT. The result of the study showed better growth performance in the positive control and negative control group than in feeding with immersed *Moina*. And immersed *Moina* with 17MT feeding has a higher survival rate than both the control groups. The lowest survival our studies have 72.3% in PC (the positive group using 60 mg 17MT/kg mixing commercial feed). However, El-Greisy and El-Gamal (2012) reported that After 15 days post-hatching, the tilapia fry that received a diet containing 60 mg of 17MT per kilogram demonstrated the highest survival rate, reaching 93%. However, several studies have indicated that 17MT treatment does not have a positive effect on the survival of tilapia (Vera Cruz and Mair, 1994; Chakraborty *et al.*, 2011). Thus, the cause of the low survival rate maybe not be the effect of 17MT. The growth performance SGR in the positive group using 60 mg 17MT/kg mixing commercial feed (PC) and the negative group without 17MT (NC) was 1.86 and 2.37. But Hassona *et al.* (2020) reported that the growth performance SGR in the positive group using 60 mg 17MT/kg mixing commercial feed (PC) and the negative group without 17MT (NC) was 0.854 and 0.796. According to El-Greisy and El-Gamal (2012), the tilapia fry treated with a diet containing 60 mg of 17MT per kilogram exhibited the highest average weight (1.97 g) after 15 days of hatching, while the control group without 17MT had the lowest average weight (0.5 g). The weight of the positive control (PC) and negative control (NC) groups at 21 days old were measured at 0.34 g and 0.51 g, respectively. It is worth noting that some studies have reported that 17MT treatment leads to increased individual growth in tilapia (Little *et al.*, 2003; El-Greisy and El-Gamal, 2012). Moreover, Islam *et al.* (2017) reported the growth performance value of feed conversion ratio, the specific growth rate, and the protein content of Tilapia fry, *O. niloticus* was better valued with *M. macrocopa* cultured. But our study was weak in the growth performance value in the *Moina* group. These may be affected by *Moina* being immersed in 17MT, which displayed deterioration to a solution without the shape of *Moina*.

1772

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

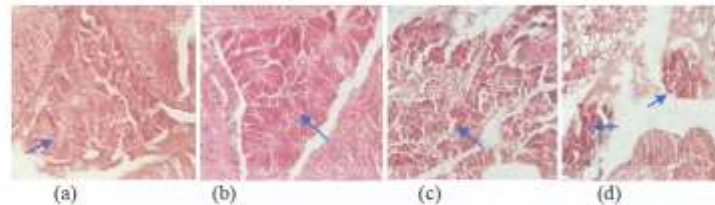


Figure 6. Histological investigation; *Moina* sp. immersed in 17MT at concentrations of 50 (a); *Moina* sp. immersed in 17MT at concentrations of 100 mg/l (b); the positive group using 60 mg 17MT/kg mixing commercial feed and (c); and the negative group without 17MT (d); the arrow showed the hepatopancreas that misunderstanding to the gonad

In the present study, histological observations revealed that the initial indication of gonadal development was the formation of a genital ridge and the presence of primordial germ cells (PGCs), which served as evidence of the male proportion. However, our study could not determine the sex proportion accurately due to a misinterpretation. El-Greisy and El-Gamal (2012) reported that PGCs were located between the gut and kidney, a finding consistent with observations made by Nakamura (1984) in two salmonid species. Nonetheless, the administration of methyltestosterone had a suppressive effect on oogenesis. The extent of this inhibitory effect on oocyte development depended on the dosage of methyltestosterone. Despite initiating the administration of 17MT before ovarian differentiation, it was unable to completely prevent presumed genetically female individuals from producing at least a few young oocytes during the early stages of maturation. The ovary was mostly occupied by somatic elements (Wolf *et al.*, 2004). Excessive hormone doses led to sterility or paradoxical feminization due to the aromatization of androgens into estrogens, while sub-optimal treatments resulted in intersex individuals (Popma and Green, 1990).

In conclusion, *Moina* immersion with 17MT can not be proven to induce male production. The group studies at the concentration of 50 and 100 mg/l have a high survival rate. Factors influenced the sex proportion in favor of males due to the administration of 17MT. The groups treated with 17MT exhibited a higher percentage of males. Further research on growth performance and position of sample to cross-section must be considered to use as a sex reversal feed and how to use live *Moina* after hormone immersion to rear tilapia larvae.

Acknowledgments

The author would like to thank KMITL Research and Innovation Services (KRIS), King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) for supporting this research and thank you to Baisuan Rungtawan for providing support to the research facility during the Covid situation. Special thanks to Assist. Dr. Praveena Taveekitjapan suggests histology studies.

References

- Alami, M. J., Ang, K. J. and Cheah, S. H. (1993). Use of *Moina micrura* (Kurz) as an Artemia substitute in the production of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) post-larvae. *Aquaculture*, 109:337-349.
- Angienda, P. O., Aketch, B. O. and Waindi, E. N. (2010). Development of all-male fingerlings by heat treatment and the genetic mechanism of heat induced sex determination in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *International Journal of Biological and Life Sciences*, 6:38-43.
- Beardmore, A., Mair, G. C. and Lewis, R. I. (2001). Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: Applications, problems, and prospects. *Aquaculture*, 197:283-301.
- Barbosa, L.R., Lopes, S., Oliveira, R., Domingues, L., Soares, A. M. and Nogueira, A. J. (2013). Determination of 17 α -methyl testosterone in freshwater samples of tilapia farming by high performance liquid chromatography. *American Journal of Analytical Chemistry*, 4:207.
- Chakraborty, S. B., Mazumdar, D., Chatterji, U. and Banerjee, S. (2011). Growth of mixed sex and monosex Nile tilapia in different culture systems. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 11:131-138.
- El-Greisy, Z. A. and El-Gamal, A. E. (2012). Monosex production of tilapia, *Oreochromis niloticus* using different doses of 17 α -methyltestosterone with respect to the degree of sex stability after one year of treatment. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 38:59-66.
- Hassona, N. N., Zayed, M. M., Elmas, W. F. and Mohamed, R. A. (2020). Dietary supplementation of *Tribulus terrestris* extract improves growth and reproductive performances of the male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, 51:4245-4254.
- He, Z. H., Qin, J. G., Wang, Y., Jiann, H. and Wu, Z. (2001). Biology of *Moina mongolica* (Moinidae, Cladocera) and perspective as live food for marine fish larvae: review. *Hydrobiologia*, 457:25-37.
- Hutchinson, G. E. (1967). A Treatise on Limnology. In: *Introduction to Lake Biology and the Limnoplankton*, John Wiley & Sons, New York, Vol. 2.
- Islam, M. R., Hassan, M. R., Begum, M., Purnou, N. J., Begum, M. K., Sultana, N. and Rahman, M. S. (2017). Effects of feeding zooplankton, *Moina macrocarpa* (Straus, 1820) on the growth of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 52:81-88.
- Kang, C. K., Park, H. Y., Kim, M. C. and Lee, W. J. (2006). Use of marine yeasts as an available diet for mass cultures of *Moina macrocarpa*. *Aquaculture Research*, 37:1227-1237.
- Kenneth, M. M. (1990). Ecology and role of zooplankton in the fishery of Lake Naivasha. *Hydrobiologia*, 208:131-140.

1774

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Jensi, A., Marx, K. K., Rajkumar, M., Shakila, R. J. and Chidambaram, P. (2016). Effect of 17 α -methyl testosterone on sex reversal and growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L., 1758). *Ecology, Environment and Conservation*, 22:1493-1498.
- Jul-a-dung and Komanpririn (2007). Study of 17 β -estradiol Hormone on Feminization of Climbing Perch, *Anabas testudineus* (Bloch, 1792). Chumphon Fisheries Test and Research Center, Aquatic Animal Genetics Research and Development Institute, Department of Fisheries, Thailand (In Thai).
- Little, D. C., Bhujel, R. C. and Plasm, T. A. (2003). Advanced nursing of mixed-sex and mono-sex tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry, and its impact on subsequent growth in fertilized ponds. *Aquaculture*, 221:265-276.
- Macintosh, D. J. and Little, D. C. (1995). Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: Bromage, N. R., Roberts, R. J. (Eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Scientific Ltd., USA. pp.313-322.
- Mumford, S. L. (2004). Chapter 13 Histology for finfish. In *NWFHS Laboratory Procedures Manual*, 2nd, Olympia Fish Health Center, Olympia, Washington.
- Mair, G. C. and Little, D. C. (1991). Population control in farmed tilapias. *NAGA – The ICLARM Quarterly*, 14:8-13.
- Nakamura, M. (1984). Effects of estradiol-17 β on gonadal sex differentiation in two species of salmonids, the masu salmon *Oncorhynchus masou*, and the chum salmon *O. keta*. *Aquaculture*, 43:83-90.
- Nakamura, M., Takahashi, H. and Hiroi, O. (1974). Sex differentiation of the gonad in the masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Scientific Reports of the Hokkaido Salmon Hatchery*, 28:1-8.
- Pilapang, K., Dondrit, D. and Yomla, R. (2022). Study on different concentrations and timings of 17 α -methyltestosterone to accumulate in water flea (*Moina* spp.) from lab-scale. *International Journal of Agricultural Technology*, 18:311-318.
- Pogna, T. J. and Green, B. W. (1990). Sex reversal of tilapia in earthen ponds. *Research and Development Series*. International Center for Aquaculture, Alabama Agriculture Experiment Station, Auburn University, Auburn, AL.
- Rottmann, R. W., Graves, S. J., Watson, C. and Yanong, R. P. E. (2003). Culture techniques of *Moina*: The ideal Daphnia for feeding freshwater fish fry. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, pp.1-9.
- Sacobie, C. F. D. and Bertley, T. J. (2005). Sex differentiation and early gonadal development in brook trout. *North American Journal of Aquaculture*, 67:181-186.
- Sveier, H., Raac, A. and Lied, E. (2000). Growth and protein turn-over in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), the effect of dietary protein level and protein particle size. *Aquaculture*, 185:101-120.
- Tran-Duy, A., Schrama, J. W., van Dam, A. A. and Verreth, J. A. J. (2008). Effects of oxygen concentration and body weight on maximum feed intake, growth and hematological parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 275:152-162.
- Tsadik, G. G. and Bart, A. N. (2007). Effect of feeding stocking density and water-flow rate on fecundity, spawning frequency and egg quality of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 272:380-388.
- Vera Cruz, E. M. and Mair, G. C. (1994). Conditions for effective androgen sex reversal in *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 122:237-248.
- Wiwattanapastapee, R., Padoongsombut, N., Choochom, T., Tang, S. and Chaimongkol, A. (2002). Water flea *Moina macrocopa* as a novel biocarrier of norfloxacin in aquaculture. *Journal of controlled release*, 83:21-28.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wolf, C. J., Gerald, A. L., Earl, L. and Gray, J. R. (2004). Interactive effects of vinclozolin & testosterone propionate on sexual differentiation of the rats. *Toxicological Sciences*, 78:135-143.

(Received: 27 August 2022, accepted: 10 July 2023)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 ระบบหมุนเวียนน้ำแนวตั้งการทดลองครั้งที่ 1



ภาพที่ 3.2 กลองทดลองการทดลองครั้งที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.3 ระบบหมุนเวียนน้ำแนวตั้งการทดลองครั้งที่ 3 (ระบบที่ 1; ถังพลาสติก ระบบที่ 2; กรวยสแตนเลส)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	กัญชริกา พิลาแพง
วัน เดือน ปีเกิด	23 กรกฎาคม 2539
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต วิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้