การใช้ประโยชน์จากสารสกัดใบชะคราม (*Suaeda maritima*) ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) และปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)

UTILIZATION OF SUPPLEMENT ANNUAL SEABLITE (*Suaeda maritima*) DIETS IN PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) AND ASIAN SEABASS (*Lates calcarifer*)

อภิชาติ ภาวนา

APICHART PAWANA

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

KMITL-2016-AG-M-081-232

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การใช้ประโยชน์จากสารสกัดใบชะคราม (*Suaeda maritima*) ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) และปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)

UTILIZATION OF SUPPLEMENT ANNUAL SEABLITE (*Suaeda maritima*) DIETS IN PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) AND ASIAN SEABASS (*Lates calcarifer*)

T148301

อภิชาติ ภาวนา

APICHART PAWANA

เลขหมู่ 148301
เลขทะเบียน
วัน.เดือน.ปี 24 ต.ค. 2560

b 12869363
I

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2559

KMITL–2016–AG–M–081–232

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

UTILIZATION OF SUPPLEMENT ANNUAL SEABLITE (*Suaeda maritima*) DIETS IN PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) AND ASIAN SEABASS (*Lates calcarifer*)

APICHART PAWANA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN FISHERIES SCIENCE
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2016

KMITL–2016–AG–M–081–232

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2016

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การใช้ประโยชน์จากสารสกัดใบชะคราม (*Suaeda maritima*) ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) และปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)

Utilization of supplement annual seablite (*Suaeda maritime*) diets in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Asian seabass (*Lates calcarifer*)

นักศึกษา นายอภิชาติ ภาวนา

รหัสประจำตัว 54640952

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การประมง

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.สมชาย หวังวิบูลย์กิจ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดร.นงนุช	เลาหะวิสุทธิ์	
ดร.พิกุล	จิรวาณิชไพศาล	
ผศ.ดร.อนัญญา	เจริญพรนิพัทธ	
รศ.ดร.สมชาย	หวังวิบูลย์กิจ	
ผศ.ดร.อัจฉรี	เรืองเดช	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 23 ธันวาคม 2559

สถานที่สอบ ห้องประชุม A 208 (ชั้น 2 ตึกเจ้าคุณทหาร)

คณบดีรับรองแล้ว

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณฑล แก่นมณี)

คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร

วันที่ 26 **เดือน** ธันวาคม **พ.ศ.** 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้ประโยชน์จากสารสกัดใบชะคราม (*Suaeda maritima*) ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) และปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)
นักศึกษา	นายอภิชาติ ภาวนา
รหัสประจำตัว	54640952
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การประมง
พ.ศ.	2559
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.สมชาย หวังวิบูลย์กิจ

บทคัดย่อ

ชะคราม (*Suaeda maritima*) เป็นพืชที่พบในพื้นที่ป่าชายเลนบริเวณที่มีน้ำเค็มท่วมถึงและเป็นทุ่งโล่งมีแดดจัด เช่น บริเวณพื้นที่บ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมและปลากะพงขาวในเขตน้ำเค็มและน้ำกร่อย บางครั้งชะครามถูกปล่อยทิ้งไว้โดยเปล่าประโยชน์ทั้งที่มีงานวิจัยพบว่า ใบชะครามอุดมไปด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์ มีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่ก่อโรคในคนและสัตว์น้ำ ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อสารสกัด สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ค่าการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ผลของสารสกัดใบชะครามที่ผสมในอาหารต่อการเติบโตและต้านทานเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยใช้สารสกัดจากใบชะครามที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 5.0 และ 7.5% เลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 15 วัน หลังจากนั้นนำลูกกุ้งมาทดสอบการต้านทานเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยการแช่ในน้ำที่มีเชื้อที่ความเข้มข้น 10^8 CFU/mL เป็นเวลา 4 วัน และการเลี้ยงปลากะพงขาวที่มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 1.84 ± 0.08 กรัม โดยให้อาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 % เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดใบชะครามจากน้ำกลั่นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด 8.41±0.02 µg GAE/g และมีค่า DPPH 75.23±5.38% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) สารสกัดใบชะครามจากปิโตรเลียมอีเทอร์มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงสุด 47.98±0.12 µg QE/g จากผลการศึกษาจึงเลือกใช้สารสกัดใบชะครามจากเอทานอลผสมในอาหารต่อการเติบโตและต้านทานเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม ลูกกุ้งที่กินอาหารผสมสารสกัดจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบชะคราม 5.0 % มีการเติบโตและอัตรารอดหลังจากการแช่เชื้อ *V. parahaemolyticus* ดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ผลการศึกษาในปลากะพง พบว่า ปลากะพงขาวที่กินอาหารเสริมสารสกัดจากใบชะคราม 1.0 % น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย 31.98±1.07 ก./ตัว และน้ำหนักเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 31.09±1.06 ก./ตัว มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) อัตรารอดของปลากะพงขาวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ส่วนโลหิตวิทยาที่การเลี้ยง 4 สัปดาห์ ปลากะพงขาวที่กินอาหารเสริมสารสกัดจากใบชะคราม 2.0 % มีค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเฉลี่ยต่ำสุด เท่ากับ 22.25±3.23% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวทุกชุดทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และชนิดของเม็ดเลือดขาวไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ยกเว้นเม็ดเลือดขาวชนิด eosinophils และ neutrophils และที่การเลี้ยง 8 สัปดาห์ ค่าโลหิตวิทยาระหว่างทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Utilization of supplement annual seablite (*Suaeda maritima*) diets in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Asian seabass (*Lates calcarifer*)
Student	Mr. Apichart Pawana
Student ID.	54640952
Degree	Master of Science
Program	Fisheries Science
Year	2016
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Somchai Wangwibulkit

ABSTRACT

Seablite (*Suaeda maritima*) is an estuary plant commonly found in an open sunny area within reach of seawater such as a marine or brackish aquaculture area where Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Asian seabass (*Lates calcarifer*) are usually cultured. In Thailand during some seasons, seablite is left unused even though its leaves are full of beneficial nutrients for humans. Researches have also found that there are a lot of phenolic compounds and flavonoids in the leaves which are antioxidants that can also inhibit some types of human and aquatic animal pathogenic bacteria. This study aimed to find good solvents for extracting the antioxidant compounds from seablite leaves, and to determine how the extracted compounds supplemented in diet affected the growth and resistance to *V. parahaemolyticus* of Pacific white shrimp. A shrimp diet was mixed with seablite extract at levels of 0, 2.5, 5.0 and 7.5% and the shrimps were cultured for 15 days with these feeds then challenge-tested for resistance against 10^8 CFU/mL of *V. parahaemolyticus*. Final study investigate growth and hematology effects of varying diets containing of the leaves extracted of seablite at 0, 0.5, 1.0 and 2.0% in Asian seabass. (1.84 ± 0.08 g average weight) for 8 weeks. The results show that the contents of the extract by the tested solvents, the highest amount of total phenolic compounds and DPPH were obtained in distilled water extract at 8.41±0.02 μg GAE/g and 75.23±5.38%, respectively followed by ethanol extract and petroleum ether extract, statistically significantly different at a confidence level $P<0.05$. The highest amount of total flavonoid at 47.98±0.12 μg QE/g was obtained

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

in petroleum ether extract, followed by ethanol and distilled water (42.89±0.11, 5.60±0.04 μg QE/g, respectively) significantly different at P<0.05. The survival rates of shrimp fed with extracts from the leaves of seablite at different concentrations were not statistically different at P>0.05. However, the shrimps fed with 5.0 % exhibited the best growth rate and survival rate after 4 days challenge with *V. parahaemolyticus* infection (P<0.05). This study shows that supplementing Pacific white shrimp diet with seablite extract at 5.0% promoted its growth and resistance to infection from *V. parahaemolyticus*. The fish fed with the different concentrations of leaves extracted had statistically difference (P<0.05) on final weight and weight gain. The maximum final weight and weight gain were found in fish fed by 1.0% supplementation of seablite extract (31.98±1.07 and 31.09±1.06 g/ind., respectively). No statistically differences (P>0.05) on survival rate of the fish. After four weeks of trial feed, the fish that fed seablite extract 2.0 % showed hematocrit 22.25 ± 3.23%, which is less than the other treatments by statistically difference (P<0.05). No statistically differences (P>0.05) in number of red blood cells and white blood cells and also no differences (P>0.05) were found on type of white blood cell except eosinophils and neutrophils. At the end of the experiment, after eight weeks there were no statistically differences on hematology (P>0.05) among treatments.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจาก รศ.ดร.สมชาย หวังวิบูลย์กิจ เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่คอยชี้แนะ แนะนำและให้คำปรึกษาที่ดี ให้แนวทางแก้ไขปัญหาเมื่อเกิดข้อผิดพลาดในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และอบรมสั่งสอนแก่ข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และ ผศ.ดร.อัจฉรี เรืองเดช กรรมการสอบหัวข้อและโครงร่างวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อนัญญา เจริญพรนิพัทธ และ ดร.พิกุล จิรวาริชไพศาล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย สำหรับใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณพ่อและคุณแม่ ที่คอยเป็นกำลังใจ อบรมสั่งสอนแก่ข้าพเจ้า และขอขอบคุณครอบครัวที่ให้กำลังใจมาตลอด

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ ที่ให้การช่วยเหลือ คำแนะนำและเป็นกำลังใจ และขอบคุณน้องๆ หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมงทุกคนที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในขณะทำการทดลอง

อภิชาติ ภาวนา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ	VI
สารบัญตาราง	IX
สารบัญภาพ	XI
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ชะคราม	3
2.2 กุ้งขาวแวนนาไม	4
2.3 ปลากะพงขาว	5
2.4 การสกัด Total phenolic compounds ในพืชตระกูล *Suaeda*	6
2.5 การต้านอนุมูลอิสระในพืชตระกูล *Suaeda*	8
2.5.1 ฤทธิ์การเข้าจับอนุมูลอิสระที่เสถียร (DPPH scavenging assay)	8
2.5.2 ค่า Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)	9
2.5.3 การรีดิวซ์หรือให้อิเล็กตรอน (Reducing power)	9
2.6 ค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชป่าชายเลนชนิดอื่นๆ	10
2.7 การประยุกต์ใช้สารสกัดจาก *Suaeda maritima* กับสัตว์	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	22
3.1 แบคทีเรีย สัตว์ และพืชทดลอง	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 22

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง 23

3.3.1 การเตรียมชะคราม 23

3.3.2 การสกัดสารจากชะคราม 24

3.3.3 การวิเคราะห์สารสกัดจากชะคราม 24

3.3.4 การการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* 24

3.3.5 การศึกษาผลของอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามต่อกุ้งขาวแวนนาไม 25

3.3.6 การศึกษาผลของอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามต่อการเติบโต และค่าโลหิตวิทยาของปลากะพงขาว 26

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล 27

3.5 สถานที่ทำการวิจัย 27

3.6 ระยะเวลาในการทำวิจัย 27

บทที่ 4 ผลการทดลอง 28

4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสกัด (yield) Total phenolic compounds (TPC) Total flavonoid content (TFC) และค่าการต้านอนุมูลอิสระในใบชะครามที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน 3 ชนิด 28

4.2 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากสารสกัดใบชะคราม 29

4.3 ผลของสารสกัดจากใบชะครามที่เสริมในอาหารต่อการเติบโตและความต้านทานต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในกุ้งขาวแวนนาไม 30

4.4 ผลของสารสกัดจากใบชะครามที่เสริมในอาหารต่อการเติบโต และค่าโลหิตวิทยาของปลากะพงขาว 30

4.4.1 ผลของอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามต่อการเติบโต 30

4.4.2 ผลของอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามต่อค่าโลหิตวิทยา 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง	34
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	38
บรรณานุกรม	39
ภาคผนวก	43
ประวัติผู้เขียน	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ปริมาณสารประกอบ Polyphenol ทั้งหมด (แสดงเป็น mg GAE/ g DW) ของ *S. fruticosa, S. pruinosa, S. mollis* และ *S. maritima*	7
2.2	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดโดยน้ำกลั่นและเอทานอลของ *S. maritima*	7
2.3	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลของ *S. maritima* แบบแห้งและแบบสด.....	7
2.4	การต้านอนุมูลอิสระใช้อะซิโตนเป็นสารสกัด ใช้ตัวอย่างในความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 1 และ 100 µg/ml ซึ่งประเมินแบบ DPPH และแสดงเป็นค่า IC_{50}.....	8
2.5	การค่า ORAC ของ *Suaeda* 4 ชนิดคือ *S. fruticosa, S. pruinosa, S. mollis* และ *S. maritima* แสดงเป็นค่าเทียบเท่า Trolox ต่อกรัม.....	9
2.6	การต้านอนุมูลอิสระโดยการรีดิวซ์หรือให้อิเล็กตรอนที่แสดงเป็นค่า EC_{50} โดยสาร acetone ซึ่งสกัดจากยอดของต้น *Suaeda* ทั้ง 4 สายพันธุ์.....	10
2.7	ค่าการยับยั้งไวรัสในวิธีการต่างๆ.....	11
2.8	ค่า IC_{50}ของสารสกัดใบ *A. marina* และวิตามินซี จากการวัดฤทธิ์วิธีการต่างๆ	11
2.9	ค่า IC_{50} ของสารสกัดใบ *A. marina* และวิตามินซี จากการวัดฤทธิ์วิธีการต่างๆ	14
2.10	ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดบิวทานอลของพืชสปีชีส์ต่างๆ ต่อเชื้อก่อโรคในกุ้ง *V. parahaemolyticus*.....	15
2.11	การรอดชีวิต น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเติบโตจำเพาะ (%) ของตัวอ่อนกุ้งแชบ๊วยที่ถูกเลี้ยงด้วยไรทะเลที่เสริมสารสกัดสมุนไพรและสาหร่ายทะเล เมื่อนำไปเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อและไม่มีเชื้อ *V. parahaemolyticus*.....	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
2.12	การรอดชีวิต น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเติบโตจำเพาะ (%) ของตัวอ่อนกุ้งแชบ๊วยที่ถูกเลี้ยงด้วยไรทะเลที่เสริมสารสกัดสมุนไพรและสาหร่ายทะเล เมื่อนำไปเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อและไม่มีเชื้อ *V. parahaemolyticus*	17
2.13	อัตราการเติบโตจำเพาะของตัวอ่อนกุ้งกุลาดำ (PL 1-25) ในน้ำที่มีเชื้อ *S. Aureus* ก่อนและหลังการให้อาร์ทีเมียที่เสริมสารสกัดสมุนไพร	18
2.14	อัตราการเติบโตจำเพาะของตัวอ่อนกุ้งกุลาดำ (PL 1-25) ในน้ำที่มีเชื้อ *S. typhi* ก่อนและหลังการให้อาร์ทีเมียที่เสริมสารสกัดสมุนไพร	19
2.15	อัตราการเติบโตจำเพาะของตัวอ่อนกุ้งกุลาดำ (PL 1-25) ในน้ำที่มีเชื้อ *Vibrio* sp. ก่อนและหลังการให้อาร์ทีเมียที่เสริมสารสกัดสมุนไพร	20
2.16	ปริมาณแบคทีเรีย (cfu/g) ของตัวอ่อนกุ้งกุลาดำ (PL 1-25 ที่ติดเชื้อชนิดต่างๆ).....	21
4.1	ปริมาณสารสกัดใบชะครามที่ได้จากตัวทำละลาย 3 ชนิด	28
4.2	TPC และ TFC ของสารสกัดใบชะครามจากตัวทำละลาย 3 ชนิด	29
4.3	ค่าการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ของสารสกัดใบชะครามจากตัวทำละลาย 3 ชนิด	29
4.4	การเติบโตของกุ้งขาวที่กินอาหารเสริมสารสกัดใบชะครามที่ความเข้มข้นต่างกัน	31
4.5	การเติบโตของปลากะพงขาวที่กินอาหารเสริมสารสกัดใบชะครามที่ความเข้มข้นต่างกัน	31
4.6	ปริมาณเม็ดเลือดแดง จำนวนเม็ดเลือดแดง และจำนวนเม็ดเลือดขาว ของปลากะพงขาวที่กินอาหารเสริมสารสกัดใบชะครามที่ความเข้มข้นต่างกัน	32
4.7	ชนิดของเม็ดเลือดขาว ลิมโฟไซท์ อิโอซิโนฟิล โมโนไซท์ เบโซฟิล ทรอมโบไซท์ และนิวโทรฟิลของปลากะพงขาวที่กินอาหารเสริมสารสกัดใบชะครามที่ความเข้มข้นต่างกัน	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ใบชะครามสีเขียวสด	4
2.2	ใบชะครามสีแดงอมม่วง	4
2.3	กุ้งขาวแวนนาไม	5
2.4	ปลากะพงขาว	6
2.5	ปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลาแฮลิบัตญี่ปุ่น (*P. olivaceus*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจาก *S. maritima* ในความเข้มข้นต่างกัน	13
4.1	ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ของสารสกัดใบชะคราม	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ชะคราม (*Suaeda maritima*) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Chenopodiaceae เป็นพรรณไม้พุ่มเตี้ยสูงประมาณ 1 เมตร พบได้ทั่วไปในพื้นที่ป่าชายเลนบริเวณที่มีน้ำเค็มท่วมถึงและเป็นทุ่งโล่งมีแดดจัด ลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ลำต้นเดี่ยว มีลักษณะใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับเบียดแน่นยาวประมาณ 1-6 เซนติเมตร ใบจะมีสีเขียวสดในฤดูฝน และเปลี่ยนเป็นสีแดงอมม่วงในฤดูร้อน (ดวงฤดี หวั่นหนู และคณะ. 2553) ในใบชะครามที่มีสีเขียวจะมีสารคลอโรฟิลล์และเบต้าแคโรทีนเป็นรงควัตถุ ส่วนในใบชะครามที่มีสีแดงจะมีสารเบต้าแคโรทีนเป็นรงควัตถุ (นันทวัน บุญยะประภัศร และคณะ. 2545) ในชะครามอุดมไปด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย และมีสรรพคุณเป็นพืชสมุนไพร มีสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (วริศรา ชื่นอารมณ์ และคณะ. 2553; Patra *et al.* 2011; Oueslati *et al.* 2012) สารสกัดชะครามที่ความเข้มข้น 0.1 g/ml มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Bacillus cereus, Leuconostoc mesenteroid, Lactobacillus plantarum* และ *Staphylococcus aureus* (ดวงฤดี หวั่นหนู และคณะ. 2553) Harikrishnan *et al.* (2012) ทดลองผสมชะครามในอาหารเพื่อศึกษาผลกระทบต่อค่าโลหิตวิทยา ภูมิต้านทาน และการป้องกันปรสิตชนิด *Miamiensis avidus* ในปลาแฮลิบัตญี่ปุ่น (Olive flounder) นอกจากนี้มีการศึกษาการใช้สารสกัดจากชะครามต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และการปกป้องเซลล์ตับจากสารพิษในหนูทดลอง (Ravikumar *et al.* 2011)

กุ้งขาวแวนนาไม *(Litopenaeus vannamei)* เป็นกุ้งทะเลที่เกษตรกรในประเทศไทยนิยมเพาะเลี้ยง เนื่องจากเป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว และได้ปริมาณผลผลิตสูง แต่ในปี พ.ศ. 2555 ประเทศไทยพบการระบาดของโรคตายด่วน (Early mortality syndrome, EMS) ที่สร้างความเสียหายต่อผลผลิตกุ้งขาวแวนนาไมเป็นจำนวนมาก (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2557ก) ต่อมาในปี พ.ศ. 2556 มีการค้นพบว่าแบคทีเรียที่ก่อโรคนี้คือ *Vibrio parahaemolyticus* (FAO. 2013) การรักษาโดยการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะซึ่งนอกจากจะทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแล้ว ยังอาจทำให้เกิดสารตกค้างในเนื้อกุ้งซึ่งเป็นผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภคและถูกนำมาเป็นเงื่อนไขในการกีดกันทางการค้าของประเทศผู้ซื้อ (ขวัญเรือน สุวรรณรัตน์. 2556) ปัจจุบันจึงมีความพยายามนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยา มาใช้เพื่อเสริมภูมิต้านทานเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทดแทนการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ (สายชล เพลินจิตต์ และคณะ. 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลากะพงขาว *(Lates calcarifer)* เป็นปลาน้ำกร่อยชนิดหนึ่งที่เกษตรกรนิยมเพาะเลี้ยงเนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2557ข) สามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งในแหล่งน้ำกร่อย น้ำจืด และน้ำเค็ม สามารถใช้ได้ทั้งอาหารสดและอาหารสำเร็จรูป อีกทั้งปัจจุบันสามารถหาลูกพันธุ์ได้ง่ายทั้งจากศูนย์เพาะพันธุ์ที่เป็นหน่วยงานของรัฐและเอกชน การเลี้ยงปลากะพงขาวมี 2 รูปแบบ คือ การเลี้ยงในกระชังและการเลี้ยงในบ่อดิน โดยในปี 2557 ประเทศไทยมีผลผลิตปลากะพงขาวที่ได้จากการเลี้ยงรวม 16,501 ตัน แบ่งเป็นผลผลิตจากการเลี้ยงแบบกระชัง 11,105 ตัน คิดเป็น 67.3% และผลผลิตจากการเลี้ยงแบบบ่อดินรวม 5,396 ตัน คิดเป็น 32.7% (กรมประมง. 2559) การเลี้ยงปลากะพงขาวแบบหนาแน่น ส่งผลทำให้ปลาอ่อนแอและติดเชื้อก่อโรคได้ง่าย ปัจจุบันจึงมีการศึกษาการนำพืชสมุนไพรมาใช้เพื่อสร้างภูมิต้านทานและรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียทดแทนสารเคมีและยาปฏิชีวนะ (จุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์ และ สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์. 2553)

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ จึงได้ดำเนินการศึกษากระบวนการสกัดสารจากต้นชะครามและนำสารสกัดที่ได้มาผสมลงในอาหารสำหรับกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งใช้เป็นตัวแทนของสัตว์เศรษฐกิจกลุ่มที่ไม่มีกระดูกสันหลัง และปลากะพงขาวใช้เป็นตัวแทนของสัตว์เศรษฐกิจกลุ่มที่มีกระดูกสันหลัง เพื่อประเมินผลกระทบของสารสกัดจากชะครามต่ออัตราการเติบโต อัตรารอด และระบบภูมิต้านทานเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งในกุ้งขาวแวนนาไมและปลากะพงขาว เพื่อเป็นแนวทางการใช้ประโยชน์ในอนาคต

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารสกัด (yield) Total phenolic compounds (TPC) Total flavonoid content (TFC) และค่าการต้านอนุมูลอิสระในใบชะครามที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน

1.2.2 เพื่อประเมินฤทธิ์ของสารสกัดจากใบชะครามในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของการเสริมสารสกัดจากใบชะครามในอาหารกุ้ง ต่ออัตราการเติบโตและความต้านทานเชื้อ *V. parahaemolyticus* ของกุ้งขาวแวนนาไม

1.2.4 เพื่อศึกษาผลของการเสริมสารสกัดจากใบชะครามในอาหารปลา ต่ออัตราการเติบโตและค่าโลหิตวิทยาของปลากะพงขาว

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ส่งเสริมให้เกษตรกรนำชะครามมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม และปลากะพงขาวเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชะคราม

ชะคราม (*Suaeda maritima*) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Chenopodiaceae เป็นไม้ล้มลุก ลำต้นกลี้ยง แตกแขนงที่โคนต้น สูง 30-100 ซม. ใบเดี่ยว เรียงสลับ อวบน้ำ รูปแถบหรือรูปขอบขนาน แผ่นใบยาว 0.5-4.0 ซม. กว้าง 0.5-1.5 มม. ปลายใบแหลม เมื่อแก่ใบจะมีสีแดงหรือบริเวณที่แล้งจัดจะมีใบสีม่วง ช่อดอก แบบช่อแยกแขนง ออกที่ปลายยอด ยาว 4-15 ซม. ดอกสมบูรณ์เพศออกเป็นกระจุก กระจุกละ 2-3 ดอก ใบประดับ ยาว 2-5 มม. กลีบดอกมี 5 กลีบ รูปหอก วงกลีบมี 2-3 ใบ รูปขอบขนานสีเขียวอ่อน ผลกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5-2.5 มม. เมล็ดกลม สีน้ำตาล ยาว 0.5-0.8 มม. กระจายพันธุ์กว้างตั้งแต่ยุโรปถึงเอเชีย ในประเทศไทยพบที่จังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ชลบุรี และสุราษฎร์ธานี พบตามพื้นที่เปิดโล่ง ดินร่วน เค็ม หลังแนวป่าโกงกาง มักพบอยู่รวมกันเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ (Larsen. 2000) ในฤดูฝนใบชะครามจะมีสีเขียวสด (ภาพที่ 2.1) และเปลี่ยนเป็นสีแดงอมม่วง (ภาพที่ 2.2) ในช่วงฤดูร้อน (ดวงฤดี หวั้นหนู และคณะ. 2553) ใบชะครามสีเขียวมีสารคลอโรฟิลล์และเบต้าแคโรทีนเป็นรงควัตถุ ส่วนในใบที่มีสีแดงจะมีสารเบต้าแคโรทีนเป็นรงควัตถุ (นันทวัน บุญยะประภัศร และคณะ. 2545) ในชะครามอุดมไปด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย และมีสรรพคุณเป็นพืชสมุนไพร มีสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (วริศรา ชื่นอารมณ์ และคณะ. 2553; Patra *et al.* 2011; Oueslati *et al.* 2012) สารสกัดชะครามที่ความเข้มข้น 0.1 g/ml มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Bacillus cereus, Leuconostoc mesenteroid, Lactobacillus plantarum* และ *Staphylococcus aureus* (ดวงฤดี หวั้นหนู และคณะ. 2553) Harikrishnan *et al.* (2012) ทดลองผสมชะครามในอาหารเพื่อศึกษาผลกระทบต่อค่าโลหิตวิทยา ภูมิต้านทาน และการป้องกันปรสิตชนิด *Miamiensis avidus* ในปลาแฮลิบัตญี่ปุ่น (Olive flounder) นอกจากนี้มีการศึกษาการใช้สารสกัดจากชะครามต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และการปกป้องเซลล์ตับจากสารพิษในหนูทดลอง (Ravikumar *et al.* 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.1 ใบชะครามสีเขียวสด

ที่มา : http://daily.khaosod.co.th

ภาพที่ 2.2 ใบชะครามสีแดงอมม่วง

ที่มา : http://bangkrod.blogspot.com

2.2 กุ้งขาวแวนนาไม

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Litopenaeus vannamei* ชื่อสามัญ Pacific white shrimp หรือที่เรียกกันทั่วไปว่า White leg shrimp เป็นกุ้งพื้นเมืองในทวีปอเมริกาใต้ พบอยู่ทั่วไปในบริเวณชายฝั่งของมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันออก จากตอนเหนือของประเทศเม็กซิโกจนถึงตอนเหนือของประเทศเปรู ประเทศไทยนิยมเรียกว่ากุ้งขาวแวนนาไมหรือ “กุ้งขาว” เป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เนื่องจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พ่อแม่พันธุ์ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์มาเป็นเวลานาน และสำหรับประเทศไทยได้มีการนำเข้ากุ้งขาวมาทดลองเลี้ยงในปี พ.ศ. 2541 และในปี พ.ศ. 2545 กรมประมงได้อนุญาตให้นำเข้าพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ (Specific Pathogen Free, SPF) ลักษณะของกุ้งขาวแวนนาไม คือ บริเวณกรี (หนาม) ด้านบนจะหยักและถี่ ปลายกรีจะตรงโดยมีฟันกรีด้านล่าง 2 อันและด้านบน 8 อัน กรีจะยาวกว่าลูกตาไม่มาก และจะสังเกตเห็นลำไส้ของกุ้งชนิดนี้ได้เด่นชัดกว่ากุ้งชนิดอื่นๆ ตัวโตเต็มวัยที่สมบูรณ์เต็มที่ของกุ้งชนิดนี้จะมีความยาวทั้งหมด (total length) 230 มิลลิเมตร (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547)

ภาพที่ 2.3 กุ้งขาวแวนนาไม
ที่มา : http://www.fish-food.co.jp

2.3 ปลากะพงขาว

ปลากะพงขาว เป็นปลาน้ำกร่อยขนาดใหญ่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Lates calcarifer* ชื่อสามัญเรียกว่า giant perch หรือ seabass สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม ปลาชนิดนี้เป็นปลาเขตร้อน แพร่กระจายอยู่ตามแหล่งน้ำที่ติดต่อกับชายฝั่งทะเลของประเทศต่างๆ ในแถบตะวันออกเฉียงใต้และตะวันออกไกล ตั้งแต่บริเวณตอนใต้ของประเทศจีน จนถึงอ่าวเปอร์เซีย และยังพบในน่านน้ำของประเทศปากีสถาน อินเดีย ศรีลังกา มาเลเซีย พม่า ไทย กัมพูชา เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ออสเตรเลีย ฯลฯ สำหรับประเทศไทยพบปลากะพงขาวอยู่ในบริเวณอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามันจะอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่ไม่ห่างจากชายฝั่งมากนัก โดยอาศัยอยู่ตามปากแม่น้ำลำคลอง และปากทะเลสาบ ปัญหาความเสื่อมโทรมของแหล่งน้ำธรรมชาติทำให้ปริมาณปลากะพงขาวในธรรมชาติลดลง จึงมีการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวเป็นอาชีพเกิดขึ้น ปัจจุบันมีการเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวทั้งจากภาครัฐโดยกรมประมงและภาคเอกชน (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2557ข) ลักษณะทั่วไป มีรูปร่างลำตัวหนาและด้านข้างแบน หัวโต จะงอยปากค่อนข้างยาวและแหลม นัยน์ตาโต ปากกว้างยืดหดได้ มุมปากอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลยไปทางหลังนัยน์ตา ฟันเป็นฟันเขี้ยวอยู่บนขากรรไกรบนและล่าง ขอบกระดูกแก้มเป็นหนามแหลม ขอบกระดูกกระพุ้งเหงือกแข็งและคม คอดหางมีขนาดใหญ่และแข็งแรง เกล็ดใหญ่มีขอบหยักเป็นหนามเมื่อลูบจะสากมือ ครีบหลังอันแรกมีก้านครีบเป็นหนามแข็ง ปลายแหลม อันที่สองเป็นครีบอ่อน มีขนาดใกล้เคียงกัน ครีบใหญ่ปลายกลมมน พื้นลำตัวสีขาวเงินปนน้ำตาล แนวสันท้องสีขาวเงิน มีขนาดความยาวประมาณ 20-40 เซนติเมตร พบใหญ่สุดถึง 2 เมตร หนักได้ถึง 60 กิโลกรัม โดยปลาที่พบในทะเลจะมีขนาดใหญ่กว่าปลาที่พบในน้ำจืด (สุรศักดิ์ วงศ์กิตติเวชสกุล. 2540)

ภาพที่ 2.4 ปลากะพงขาว
ที่มา : http://pasusat.com

2.4 การสกัด Total phenolic compounds ในพืชตระกูล *Suaeda*

Oueslati *et al.* (2012) ทดลองวิเคราะห์ค่า Total phenolic compounds ใน *Suaeda* 4 ชนิด คือ *Suaeda fruticosa, Suaeda pruinosa, Suaeda mollis* และ *Suaeda maritima* พบว่า ปริมาณ TPC ของ *S. fruticosa* และ *S. pruinosa* ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าปริมาณ TPC เท่ากับ 31.76 และ 32.72 mg GAE/g DW ตามลำดับ รองลงมาคือ *S. mollis* และ *S. maritima* แสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยมี TPC เท่ากับ 24.51 และ 3.50 mg GAE/g DW ตามลำดับ (ตารางที่ 2.1)

Pornpitakdamrong and Sudjaroen (2014) ทดลองใช้น้ำกลั่นและเอทานอลในการสกัด *S. maritima* พบว่า *S. maritima* ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นได้ปริมาณสารสกัดมากกว่าการสกัดด้วยเอทานอล โดยได้ปริมาณ 19.65 และ 9.34% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับค่า TPC ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นได้ปริมาณมากกว่าสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งมีค่าเท่ากับ 14.47 และ 6.93 mg GAE/g DW ตามลำดับ (ตารางที่ 2.2)

Sudjaroen (2015) ทดลองวิเคราะห์ค่า Total phenolic content ใน *S. maritima* แบบอบแห้งและแบบสด โดยสกัดด้วยน้ำและเอทานอล พบว่า การสกัดด้วยน้ำ ชะครามอบแห้งได้ TPC มากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชะครามสด โดยมีค่า 13.46 ± 2.35 และ 0.47 ± 2.85 mg GAE /g DW ตามลำดับ ส่วนการสกัดด้วยเอทานอล จะมีค่าตรงกันข้ามก็คือ ชะครามอบแห้งได้ TPC น้อยกว่าชะครามสด โดยมีค่า 6.65 ± 3.24 และ 6.93 ± 2.27 mg GAE /g DW ตามลำดับ (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารประกอบโพลิฟีนอลทั้งหมด (mg GAE/g DW) ของ *S. fruticosa, S. pruinosa, S. mollis* และ *S. maritima*

สารสกัด	โพลิฟีนอล (mg of GAE/g MS)
S. fruticosa	31.76[a]
S. pruinosa	32.72[a]
S. maritima	3.50[c]
S. mollis	24.51[b]

ค่าเฉลี่ย (3 ซ้ำ) อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ที่มา : Oueslati *et al.* (2012)

ตารางที่ 2.2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดโดยน้ำกลั่นและเอทานอลของ *S. maritima*

สารสกัด	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด GAE/g DW
น้ำกลั่น	14.47 ± 2.85
เอทานอล	6.93 ± 2.27

ที่มา : ดัดแปลงจาก Pornpitakdamrong and Sudjaroen (2014)

ตารางที่ 2.3 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลของ *S. maritima* อบแห้งและแบบสด

สารสกัด	ตัวทำละลาย	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/ g of DW)
ชะครามอบแห้ง	น้ำ	13.46 ± 2.35
	เอทานอล	6.65 ± 3.24
ชะครามสด	น้ำ	0.47 ± 2.85
	เอทานอล	6.93 ± 2.27

ที่มา : ดัดแปลงจาก Sudjaroen (2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การต้านอนุมูลอิสระในพืชตระกูล *Suaeda*

2.5.1 ฤทธิ์การเข้าจับอนุมูลอิสระที่เสถียร (DPPH scavenging assay)

Oueslati *et al.* (2012) ทดลองนำ *Suaeda* 4 ชนิด คือ *S. fruticosa, S. pruinosa, S. mollis* และ *S. maritima* ใช้อะซิโตนเป็นสารสกัด ใช้ตัวอย่างในความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 1 และ100 µg/ml และวัดการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ซึ่งจะมี BHT เป็นสารมาตรฐานในการควบคุม ค่าที่ออกมาแสดงเป็นค่า IC_{50} (µg/ml) พบว่า *S. mollis* แสดงการต้านการเข้าจับกับ DPPH ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.5 µg/ml โดยมีค่าน้อยกว่าสารต้านอนุมูลอิสระบริสุทธิ์ BHT ที่แสดงเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 11.5 µg/ml โดย *S. mollis* มีค่า DPPH เป็น 10, 15 และ 20 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ *S. pruinosa*, *S. fruticosa* และ *S. maritima* ตามลำดับ (ตารางที่ 2.4)

Patra *et al.* (2011) ทดลองวิเคราะห์ค่า DPPH ใน *S. maritima* โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ใช้คลื่นแสงที่ 517 nm และคำนวณหาค่า DPPH โดยสารที่ใช้สกัด *Suaeda maritima* ที่นำมาทดสอบมี 5 ชนิดคือ acetone, ethanol, methanol, น้ำกลั่น และ BHT โดยสกัดจาก 2 ส่วนคือใบและลำต้นแล้วนำมาเปรียบเทียบกัน ผลที่ได้คือค่า DPPH ของสกัดจากลำต้นด้วย ethanol มีค่าสูงสุดเท่ากับ 92.435 ± 0.091% และสารสกัดจากใบด้วย acetone มีค่าเท่ากับ 80.84 ± 0.155%

ตารางที่ 2.4 การต้านอนุมูลอิสระใช้อะซิโตนเป็นสารสกัด ใช้ตัวอย่างในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 1 และ 100 µg/ml ซึ่งประเมินแบบ DPPH และแสดงเป็นค่า IC_{50}

Extracts	1 ug/ ml DPPH	100 ug/ ml DPPH	IC_{50} ug/ ml DPPH
S. fruticosa	20.4	85.6	37^{b}
S. pruinosa	22.2	87.4	26^{c}
S. maritima	21.4	79.6	49^{a}
S. mollis	41.5	79.2	2.5^{e}
BHT	-	-	11.5^{d}

ค่าเฉลี่ย (3 ซ้ำ) อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ที่มา : Oueslati *et al.* (2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 ค่า Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

Oueslati *et al.* (2012) ทำการวิเคราะห์ค่า ORAC ของ *Suaeda* 4 ชนิด คือ *S. fruticosa, S. pruinosa, S. mollis* และ *S. maritima* ในหลอดแก้ว (*in vitro*) และใช้ Trolox เป็นสารควบคุม ทดลองที่อุณหภูมิ 37.5°C และ pH 7.4 ผลวิเคราะห์พบว่า ค่า ORAC ของ *S. pruinosa, S. fruticosa* และ *S. mollis* มีค่าเท่ากับ 1.37 ±0.06, 1.34± 0.04 และ 1.09 ± 0.04 µmol TE/mg ตามลำดับ แต่ *S. maritima* มีค่าน้อยที่สุดเท่ากับ 0.34 ± 0.01 µmol TE/mg (ตารางที่ 2.5)

ตารางที่ 2.5 การค่า ORAC ของ *Suaeda* 4 ชนิดคือ *S. fruticosa, S. pruinosa, S. mollis* และ *S. maritima* แสดงเป็นค่าเทียบเท่า Trolox ต่อกรัม

Extracts	ORAC values (µ mol/ mg)
S. fruticosa	1.34 ± 0.04^{b}
S. pruinosa	1.37 ± 0.06^{b}
S. maritima	1.34 ± 0.01^{c}
S. mollis	1.09 ± 0.04^{b}
Caffeic acid	18.62 ± 3.08^{a}
Quercetin	20.2 ± 0.68^{a}
Trolox	4.12 ± 0.17^{ab}

ค่าเฉลี่ย (3 ซ้ำ) อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ที่มา : ดัดแปลงจาก Oueslati *et al.* (2012)

2.5.3 การรีดิวซ์หรือให้อิเล็กตรอน (Reducing power)

Oueslati *et al.* (2012) ทดลองวิเคราะห์ใน *Suaeda* 4 ชนิดคือ *S. fruticosa, S. pruinosa, S. mollis* และ *S. maritima* โดยการรีดิวซ์ Fe^{3+} พบว่า ผลที่ได้มีค่าแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช โดยเริ่มตั้งแต่ 130 µg/ml ของ *S. mollis* ไปจนถึง 660 µg/ml ของ *S. maritima* อย่างไรก็ตาม สารควบคุมคือกรด ascorbic นั้นแสดงค่า EC_{50} = 37.33 µg/ml ซึ่งดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพืชทั้ง 4 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 การต้านอนุมูลอิสระโดยการรีดิวซ์หรือให้อิเล็กตรอนที่แสดงเป็นค่า EC_{50} โดยสาร acetone ซึ่งสกัดจากยอดของต้น *Suaeda* ทั้ง 4 สายพันธุ์

Extracts	EC_{50} (µg/ ml)
S. fruticosa	365[b]
S. pruinosa	164[c]
S. maritima	660[a]
S. mollis	130[d]
Ascorbic acid	37.33
BHT	-
BHA	-

ค่าเฉลี่ย (3 ซ้ำ) อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ที่มา : ดัดแปลงจาก Oueslati *et al.* (2012)

Patra *et al.* (2011) ทดลองใน *S. maritima* โดยการสกัด 2 ส่วนคือ ใบและลำต้นนำมาเปรียบเทียบกัน และใช้ acetone, ethanol, methanol น้ำกลั่น และ BHT ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นตัวทำละลาย วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยที่ 700 นาโนเมตร ผลที่ได้คือความสามารถในการรีดิวซ์หรือให้อิเล็กตรอนนั้นเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลาย ซึ่งทั้งใบและลำต้นได้ผลไม่แตกต่างกัน

2.6 การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชป่าชายเลนชนิดอื่นๆ

Banerjee *et al.* (2008) ทดลองสกัดสารจากพืชในป่าชายเลน 6 ชนิด จากส่วนของพืชที่แตกต่างกัน 4 ส่วน คือ ใบ ลำต้น เปลือกไม้ และราก รวม 23 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณของฟีนอลิกเทียบเท่ากับกรดแกลลิค (GAE) และค่าการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดยการวิเคราะห์ค่า LC_{50} ในการกำจัดอนุมูลอิสระ 50% ของสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) โดยพบสารสกัด 11 ตัวอย่าง มีค่าปริมาณ ฟีนอลิกสูง (GAE>25 mg/g) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี (IC_{50}<2.9 mg/ml) โดยสารสกัดจาก *Ceriops decandra* มีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด เท่ากับ 94.4 mg/g และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH แสดงเป็น IC_{50} เท่ากับ 0.65 mg/ml แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เห็นได้ว่าพืชจากป่าชายเลนเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Becula *et al.* (2012) ทดลองประเมินฤทธิ์ต้านไวรัส ต้านอนุมูลอิสระ และพิษวิทยาของพืชจำพวกโกงกางจากชายฝั่งตะวันออกเฉียงใต้ของอินเดีย จากพืชที่เลือกมา 4 ชนิด พบว่า สารสกัดใบของ *Avicennia marina* มีค่า IC_{50} ต่ำสุดในการยับยั้ง reverse transcriptase การจับกับ HBsAg การยับยั้ง DNA polymerase ของไวรัสตับอักเสบบี โดยเท่ากับ 489.39, 403.91 และ 372.09 µg/ml ตามลำดับ ค่า IC_{50} ของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจวัดจากการขจัด SOD, LPO, NO และ DPPH คือ 3.93 ± 19.91, 34.93 ± 640.06, 0.93 ± 12.80 และ 142.06 ± 17.93 µg/ml ตามลำดับ การวิเคราะห์พฤกษเคมีของสารสกัดใบ *A. marina* พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีน้ำตาลรีดิวซ์ โพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน ค่า LD_{50} คือ 2,500 mg/ kilogram of body weight และการวิเคราะห์ความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันไม่แสดงให้เห็นถึงความเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ในซีรัมและทางโลหิตวิทยา อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 2.7 และ 2.8)

ตารางที่ 2.7 ค่าการยับยั้งไวรัสในวิธีการต่างๆ

พืช	IC_{50} (µg/ ml)		
	การยับยั้ง reverse transcriptase	การจับกับ HBsAG	การยับยั้ง DNA polymerase
A. marina	403.91	489.39	372.09
โกงกางใบใหญ่	<1000	702.91	<1000
โกงกางใบเล็ก	-	-	<1000
แสมดำ	-	<1000	619.64

ที่มา : Becula *et al.* (2012)

ตารางที่ 2.8 ค่า IC_{50} ของสารสกัดใบ *A. marina* และวิตามินซี จากการวัดฤทธิ์วิธีการต่างๆ (µg/ml)

พารามิเตอร์	สารสกัดใบ *A.marina*	วิตามินซี (ตัวควบคุมบวก)
การขจัด DPPH	142.06 ± 17.93	2.87 ± 1.26
การขจัด nitric oxide	19.91 ± 3.93	4.98 ± 1.28
การขจัด lipid peroxide	640.06 ± 34.93	31.79 ± 1.21
การขจัดอนุมูล superoxide	12.08 ± 0.93	24.31 ± 0.71

ค่าที่แสดงในรูป ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลองสามซ้ำ

ที่มา : ดัดแปลงจาก Becula *et al.* (2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

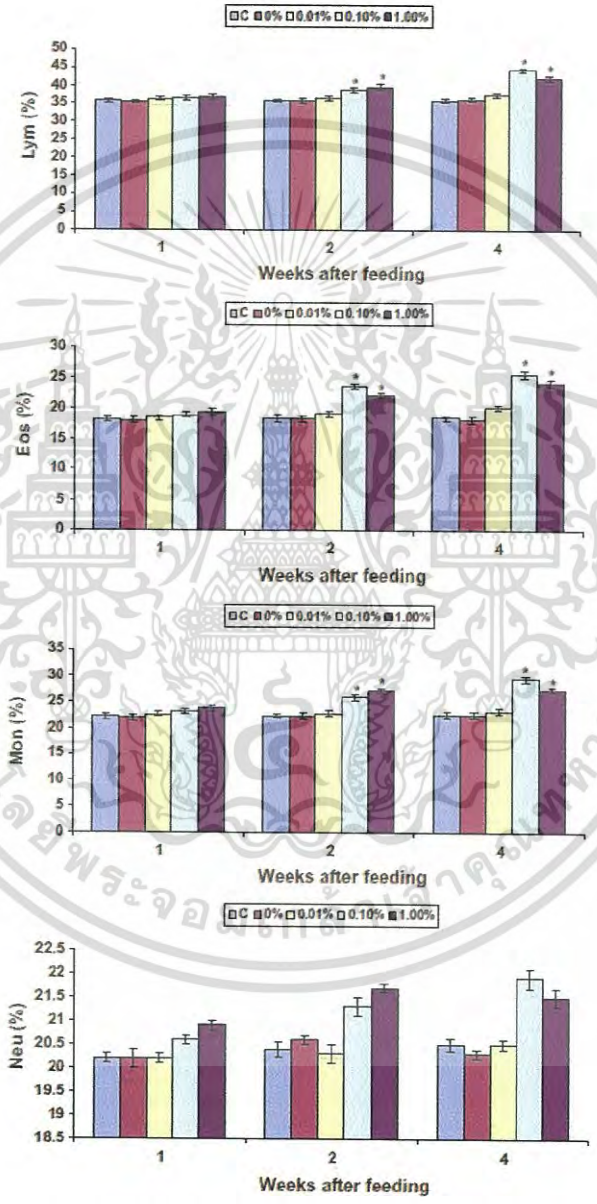
2.7 การประยุกต์ใช้สารสกัดจาก *Suaeda maritima* กับสัตว์

Ravikumar *et al.* (2011) ทดสอบฤทธิ์การปกป้องตับและต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากชะครามในหนู Wistar albino ที่ถูกเหนี่ยวนำความเครียดโดยฉีด concanavalin-A เข้าหลอดเลือดดำของหนูในขนาดน้ำหนัก 12 มก./กก. น้ำหนักตัว ทดลองโดยใช้สารสกัดชะครามที่ความเข้มข้น 75, 150 และ 300 มก./กก. น้ำหนักตัว ผลการทดลองพบว่า ในวันที่ 9 หนูที่ได้รับ concanavalin-A มีระดับ AST, ALT, ALP และ bilirubin สูงขึ้น ส่วนหนูที่ได้รับสารจากชะครามที่ความเข้มข้น 75 มก./กก. น้ำหนักตัว ก่อนได้รับ concanavalin-A (300 มก./กก. น้ำหนักตัว) ช่วยลดระดับในเลือดของเอนไซม์จากตับได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับ concanavalin-A เพียงอย่างเดียว และการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อพยาธิวิทยาของตับพบว่าโครงสร้างตับที่เป็นปกติถูกรบกวนโดยการได้รับสารเคมีที่เป็นพิษต่อตับ หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากชะครามและกลุ่มที่ได้รับ silymarin ยังคงมีโครงสร้างของเซลล์เป็นปกติ แต่พบการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย การวิเคราะห์พฤกษเคมีเบื้องต้นแสดงให้ถึง triterpenoidsในสารสกัดซึ่งอาจจะเป็นที่มาของฤทธิ์ปกป้องตับ ค่า LD_{50} ของสารสกัดมีค่า 3 ก./กก. น้ำหนักตัว และค่า IC_{50} ของสารสกัดในการขจัด hydroxyl (1.32 ± 52.21 µg/ml) และ nitric oxide (9.14 ± 0.94 µg/ml) แสดงถึงการออกฤทธิ์ที่ใกล้เคียงกับวิตามินซี ผลของการศึกษานี้อาจจะมีประโยชน์ต่อการพัฒนายาสมุนไพรเพื่อใช้ในการรักษาตับอักเสบในอนาคต (ตารางที่ 2.9)

Immanuel *et al.* (2004) ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านจุลชีพของพืช 6 ชนิด ได้แก่ ละหุ่ง (*Ricinus communis*) ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus niruri*) *Leucus aspera* มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) สาหร่ายทะเล *Ulva lactuca* และ *Sargassum wightii* ใช้บิวทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่า น้ำหนักของสารที่สกัดออกมาได้มีค่าระหว่าง 10.20 ถึง 17.50% ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดเหล่านี้ถูกทดสอบกับเชื้อก่อโรคในกุ้งคือ *Vibrio parahaemolyticus* โดยพิจารณาขนาดพื้นที่ยับยั้งเชื้อ (zone of inhibition) และนำสารสกัดในรูปแบบผงไปเสริมในอาร์ทีเมียที่เป็นอาหารของกุ้งแชบ๊วย (*Peneaus indicus*) ที่เลี้ยงในแท็งค์แยกเดี่ยว พบว่ากุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่ไม่มีเชื้อ *V. parahaemolyticus* และได้รับอาร์ทีเมียที่ไม่เสริมสารสกัดมีการรอดชีวิต และอัตราการเติบโตจำเพาะ (SGR) สูงสุดที่ 86.10 และ 2.87% ตามลำดับ และมีปริมาณแบคทีเรียในเนื้อและเนื้อเยื่อตับกับตับอ่อน 0.43 x 10^3 และ 0.52 x 10^3 CFU/g ตามลำดับ ส่วนกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้น 10^7CFU/ml และได้รับอาร์ทีเมียที่ไม่เสริมสารสกัด มีอัตราการรอดและอัตราการเติบโตจำเพาะต่ำสุดที่ 24.44 และ 1.11% ตามลำดับ และสารสกัดละหุ่ง (T1) ให้ผลดีที่สุด (ตารางที่ 2.10 และ 2.11)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Harikrishnan *et al.* (2012) ทำการทดลองกับปลาแฮลิบัตญี่ปุ่น (*Paralichythys olivaceus*) โดยให้อาหารผสมกับสารสกัดจากชะคราม 0.01, 0.1 และ 1% เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์พบว่า ปลาที่ได้รับสารสกัดจากชะคราม 0.1 และ 1 มีปริมาณ Lymphocytes, Eosinophils และ Monocytes เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 2.5)



ภาพที่ 2.5 ปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ของปลาแฮลิบัตญี่ปุ่น (*P. olivaceus*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจาก *S. maritima* ในความเข้มข้นต่างกัน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Harikrishnan *et al.* (2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.9 ค่า IC_{50} ของสารสกัดใบ *A. marina* และวิตามินซี จากการวัดฤทธิ์ด้วยวิธีการต่างๆ (µg/ml)

กลุ่ม	การสังเกตทางกล้องจุลทรรศน์					
	การสลายตัวในเซลล์ตับ (การเปลี่ยนแปลงของไขมันและสารที่ไม่ละลายน้ำ)	การมีรูปร่างผิดปกติของเซลล์ตับ	การที่เซลล์ตายเป็นหย่อมๆ	การคั่งในหลอดเลือดดำ	การคั่งในช่องโพรงเล็ก	บริเวณเลือดออกในกลีบตับ
กระสายยา	+	Ø	Ø	+	Ø	Ø
Coa-A	++++	+++	+++	++	++	++
Coa-A + Silymarin	+	⊥	⊥	+	⊥	⊥
Coa-A + ชะคราม 75 mg/kg	+++	++	++	++	++	+
Coa-A + ชะคราม 150 mg/kg	++	+	⊥	+	+	+
Coa-A + ชะคราม 300 mg/kg	+	⊥	⊥	++	+	⊥

Ø ไม่พบ; ⊥ น้อยมาก; +เล็กน้อย; ++ปานกลาง; +++ รุนแรง; ++++ รุนแรงมาก

(ตับของหนู 6 ตัวในกลุ่มทดลองที่ถูกตรวจสอบ)

ที่มา : Ravikumar *et al.* (2011)

ตารางที่ 2.10 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดบิวทานอลของพืชสปีชีส์ต่างๆ ต่อเชื้อก่อโรคในกุ้ง *V. parahaemolyticus*

สารสกัดบิวทานอล	พื้นที่ยับยั้ง (mm)			ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	A1	A2	A3	
ละหุ่ง (T1)	19.5	21	20.5	20.3 ± 0.62
ลูกใต้ใบ (T2)	19	19.5	19.5	19.3 ± 0.23
L.aspera (T3)	16	14	15	15.0 ± 0.81
มันสำปะหลัง (T4)	18.5	18	17.5	18.0 ± 0.40
U. lactuca (T5)	16.5	18.5	17.5	17.5 ± 0.81
S. wightii (T6)	16	16	17	16.3 ± 0.47

A1, A2, A3 = การทดลองที่ทำซ้ำสามครั้ง

ที่มา : Immanuel *et al.* (2004)

Citarasu *et al.* (2003) ทำการศึกษาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้แก่มะแว้งต้น (*Solanum trilobatum*), ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) และ *Psoralea corylifolia* ในรูปสารสกัดเมทานอล ถูกส่งเข้าไปภายในอาร์ทีเมีย (bioencapsulation) จากนั้นนำไปเป็นอาหารของตัวอ่อนกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ระยะ PL 1-25 ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* และ *Vibrio* sp. ตัวอ่อนกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำที่ไม่มีเชื้อโรคและได้รับอาร์ทีเมียที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพรมีอัตรารอดชีวิตและมีอัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) สูงสุดที่ 90 และ 12.43%ตามลำดับ และมีปริมาณแบคทีเรียน้อยกว่ากลุ่มอื่น ตัวอ่อนกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อแบคทีเรียและได้รับอาร์ทีเมียที่ไม่ได้เสริมสารสกัดสมุนไพรมีอัตรารอดชีวิตและมีอัตราการเติบโตจำเพาะต่ำสุดที่ 10-30 และ 8.42-9.1% ตามลำดับ ในขณะที่มีปริมาณแบคทีเรียมากที่สุด (2.86×10^3 ถึง 3.76×10^5 cfu/g) ผลการทดลองบ่งชี้ว่าสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรช่วยเพิ่มการรอดชีวิตและอัตราการเติบโตจำเพาะและลดปริมาณแบคทีเรียในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ และเมื่อเปรียบเทียบสารสกัดสมุนไพรด้วยกัน ตัวอ่อนกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาร์ทีเมียที่เสริมด้วย *P. corylifolia* แสดงถึงแนวโน้มที่จะมีการรอดชีวิต อัตราการเติบโตสูงสุดที่ >50 และ 11.5% ตามลำดับ และมีปริมาณแบคทีเรียต่ำสุดที่ 12.1×10^5 cfu/g (ตารางที่ 2.12 ถึง 2.16)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.11 การรอดชีวิต น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเติบโตจำเพาะ (%) ของตัวอ่อนกุ้งแชบ๊วยที่ถูกเลี้ยงด้วยไรทะเลที่เสริมสารสกัดสมุนไพรและสาหร่ายทะเล เมื่อนำไปเลี้ยง ในน้ำที่มีเชื้อและไม่มีเชื้อ *V. parahaemolyticus*

กลุ่ม	ความยาวเริ่มต้น (ซม.)	น้ำหนักเริ่มต้น (ก.)	ความยาวสุดท้าย (ซม.)	น้ำหนักสุดท้าย (ก.)	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (ก.)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ	การรอดชีวิต (%)
C1 (ปกติ)	6.45 ± 0.30	4.94 ± 0.095	8.81 ± 0.36	11.69 ± 0.429	6.75 ± 0.392^{a}	2.87 ± 0.052^{a}	86.10 ± 3.89^{a}
C2 (ไม่ได้รับไรที่เสริมสารสกัด)	6.64 ± 0.25	5.19 ± 0.203	7.35 ± 0.26	7.26 ± 0.408	2.07 ± 0.250^{b}	1.11 ± 0.023^{b}	24.44 ± 3.84^{b}
ละหุ่ง (T1)	6.52 ± 0.41	4.98 ± 0.172	8.20 ± 0.28	9.50 ± 0.436	4.52± 0.398^{c}	2.15 ± 0.031c^{a}	58.88 ± 5.09^{c}
ลูกใต้ใบ (T2)	6.44 ± 0.42	4.96 ± 0.145	8.10 ± 0.42	9.42 ± 0.345	4.46 ± 0.315^{c}	2.13 ± 0.028^{ca}	55.55 ± 1.92^{c}
L.aspera (T3)	6.49 ± 0.28	5.09 ± 0.210	7.58 ± 0.44	7.90 ± 0.171	2.81 ± 0.156d^{b}	1.46 ± 0.018^{cb}	43.32 ± 5.77^{d}
มันสำปะหลัง (T4)	6.58 ± 0.32	5.15 ± 0.125	8.04 ± 0.36	9.13 ± 0.213	3.98 ± 0.195^{e}	1.91 ± 0.017^{cb}	52.22 ± 3.84^{c}
U. lactuca (T5)	6.38 ± 0.46	4.81 ± 0.057	7.84 ± 0.26	8.64 ± 0.575	3.83 ± 0.260^{c}	1.95 ± 0.027^{cb}	51.10 ± 6.93^{c}
S. wightii (T6)	6.75 ± 0.55	5.23 ± 0.182	7.87 ± 0.24	8.32 ± 0.449	3.07 ± 0.320^{e}	1.54± 0.030^{cb}	45.55 ± 5.09^{d}

ค่าในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ; SNK test

ที่มา : Immanuel *et al* . (2004)

ตารางที่ 2.12 การรอดชีวิต น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเติบโตจำเพาะ (%) ของตัวอ่อนกุ้งแชบ๊วยที่ถูกเลี้ยงด้วยไรทะเลที่เสริมสารสกัดสมุนไพรและสาหร่ายทะเล เมื่อนำไปเลี้ยง ในน้ำที่มีเชื้อและไม่มีเชื้อ *V. parahaemolyticus*

กลุ่ม	การรอดชีวิต	ความยาว (มิลลิเมตร)		น้ำหนัก (มิลลิกรัม)		น้ำหนักเพิ่มขึ้น (มิลลิกรัม)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ
		เริ่มต้น	สุดท้าย	เริ่มต้น	สุดท้าย		
ไม่มีเชื้อ	90.00 ± 8.52	6.71 ± 0.3	24.05 ± 1.58	1.95 ± 0.7	43.39 ± 0.42^{a}	41.44	12.4
มีเชื้อ (ไม่ได้เสริมสมุนไพร)	30.00 ± 3.7	6.65 ± 0.18	13.75 ± 1.03	2.07 ± 0.17	20.35 ± 0.86^{e}	18.28	9.14
มะแว้งต้น	58.00 ± 6.60	6.75 ± 0.29	22.33 ± 0.63	2.12 ± 0.12	30.81 ± 1.23^{d}	28.69	10.7
ฟ้าทะลายโจร	65.00 ± 8.90	6.66 ± 0.32	24.2 ± 1.42	2.00 ± 0.10	39.01 ± 0.71^{b}	37.01	11.88
Psoralea corylifolia	72.00 ± 5.15	6.75 ± 0.44	23.17 ± 0.84	2.09 ± 0.17	35.31 ± 0.51^{c}	33.22	11.33

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน (a-e) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ที่มา : Citarasu *et al.* (2003)

148301

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.13 อัตราการเติบโตจำเพาะของตัวอ่อนกุ้งกุลาดำ (PL 1-25) ในน้ำที่มีเชื้อ *S. aureus* ก่อนและหลังการให้อาร์ทีเมียที่เสริมสารสกัดสมุนไพร

กลุ่ม	การรอดชีวิต	ความยาว (มิลลิเมตร)		น้ำหนัก (มิลลิกรัม)		น้ำหนักเพิ่มขึ้น (มิลลิกรัม)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ
		เริ่มต้น	สุดท้าย	เริ่มต้น	สุดท้าย		
ไม่มีเชื้อ	90.00 ± 8.52	6.71 ± 0.3	24.05 ± 1.58	1.95 ± 0.7	43.39 ± 0.42[a]	41.44	12.4
มีเชื้อ (ไม่ได้เสริมสมุนไพร)	20.00 ± 3.5	6.75 ± 0.44	13.12 ± 0.85	1.90 ± 0.09	17.41 ± 0.53[e]	15.51	8.86
มะแว้งต้น	37.5 ± 4.30	6.76 ± 0.27	22.60 ± 0.50	1.95 ± 0.07	32.24 ± 0.93[d]	30.29	11.22
ฟ้าทะลายโจร	57.5 ± 7.70	6.62 ± 0.28	23.04 ± 1.25	1.93 ± 0.09	36.72 ± 0.56[b]	34.79	11.78
P.corylifolia	60.00 ± 7.25	6.55 ± 0.35	22.59 ± 0.39	1.99 ± 0.27	40.34 ± 1.10[c]	38.35	12.03

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน (a-e) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ที่มา : Citarasu *et al.* (2003)

ตารางที่ 2.14 อัตราการเติบโตจำเพาะของตัวอ่อนกุ้งกุลาดำ (PL 1-25) ในน้ำที่มีเชื้อ *S. typhi* ก่อนและหลังการให้อาร์ทีเมียที่เสริมสารสกัดสมุนไพร

กลุ่ม	การรอดชีวิต	ความยาว (มิลลิเมตร)		น้ำหนัก (มิลลิกรัม)		น้ำหนักเพิ่มขึ้น (มิลลิกรัม)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ
		เริ่มต้น	สุดท้าย	เริ่มต้น	สุดท้าย		
ไม่มีเชื้อ	90.00 ± 8.52	6.71 ± 0.3	24.05 ± 1.58	1.95 ± 0.7	43.39 ± 0.42[a]	41.44	12.4
มีเชื้อ (ไม่ได้เสริมสมุนไพร)	10.00 ± 1.85	6.67 ± 0.28	13.00 ± 0.70	1.90 ± 0.09	13.65 ± 0.81[c]	11.75	7.54
มะแว้งต้น	50.00 ± 3.38	6.77 ± 0.25	21.50 ± 0.94	2.07 ± 0.19	28.64 ± 0.59[d]	26.75	10.5
ฟ้าทะลายโจร	52.5 ± 4.63	6.75 ± 0.44	23.54 ± 1.44	2.06 ± 0.11	37.48 ± 0.66[b]	35.42	11.6
P.corylifolia	55.00 ± 3.78	6.51 ± 0.32	20.90 ± 1.28	2.06 ± 0.11	33.48 ± 1.08[c]	31.42	11.15

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน (a-e) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(P<0.05)

ที่มา : Citarasu *et al.* (2003)

ตารางที่ 2.15 อัตราการเติบโตจำเพาะของตัวอ่อนกุ้งกุลาดำ (PL 1-25) ในน้ำที่มีเชื้อ *Vibrio* sp.ก่อนและหลังการให้อาร์ทีเมียที่เสริมสารสกัดสมุนไพร

กลุ่ม	การรอดชีวิต	ความยาว (มิลลิเมตร)		น้ำหนัก (มิลลิกรัม)		น้ำหนักเพิ่มขึ้น (มิลลิกรัม)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ
		เริ่มต้น	สุดท้าย	เริ่มต้น	สุดท้าย		
ไม่มีเชื้อ	90.00 ± 8.52	6.71 ± 0.3	24.05 ± 1.58	1.95 ± 0.7	43.39 ± 0.42[a]	41.44	12.4
มีเชื้อ (ไม่ได้เสริมสมุนไพร)	25.00 ± 1.93	6.75 ± 0.25	12.90 ± 1.08	1.93 ± 0.09	18.79 ± 0.40[e]	16.86	9.1
มะแว้งต้น	52.5 ± 2.46	6.80 ± 0.23	21.50 ± 1.33	2.07 ± 0.19	28.60 ± 0.44[d]	26.53	10.5
ฟ้าทะลายโจร	45.00 ± 4.63	6.54 ± 0.41	22.11 ± 0.92	1.90 ± 0.09	36.07 ± 1.03[b]	34.17	11.77
P.corylifolia	47.5 ± 3.37	6.71 ± 0.28	22.27 ± 0.75	1.99 ± 0.11	34.28 ± 0.95[c]	32.29	11.38

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน (a-e) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P<0.05$)

ที่มา : Citarasu *et al.* (2003)

ตารางที่ 2.16 ปริมาณแบคทีเรีย (cfu/g) ของตัวอ่อนกุ้งกุลาดำ (PL 1-25 ที่ติดเชื้อชนิดต่างๆ)

กลุ่ม	ปริมาณแบคทีเรีย (cfu/g)			
	P. aeruginosa	*S. aureus*	*S. typhi*	*Vibrio sp.*
ไม่ติดเชื้อ	$9.68 \times 10^{1} \pm 1.3 \times 10^{1}$	$1.34 \times 10^{5} \pm 1.40 \times 10^{4}$	$9.78 \times 10^{4} \pm 2.83 \times 10^{3}$	$1.46 \times 10^{5} \pm 6.5 \times 10^{3}$
ติดเชื้อ	$2.86 \times 10^{3} \pm 1.8 \times 10^{2}$	$3.27 \times 10^{5} \pm 1.78 \times 10^{4}$	$1.76 \times 10^{5} \pm 7.20 \times 10^{3}$	$3.76 \times 10^{5} \pm 6.73 \times 10^{3}$
มะแว้งต้น	$1.30 \times 10^{3} \pm 1.0 \times 10^{1}$	$1.05 \times 10^{5} \pm 8.82 \times 10^{3}$	$1.15 \times 10^{5} \pm 7.82 \times 10^{3}$	$1.27 \times 10^{5} \pm 8.50 \times 10^{3}$
ฟ้าทะลายโจร	$6.00 \times 10^{2} \pm 1.34 \times 10^{2}$	$9.48 \times 10^{4} \pm 6.65 \times 10^{3}$	$8.52 \times 10^{4} \pm 3.63 \times 10^{3}$	$1.12 \times 10^{4} \pm 5.90 \times 10^{3}$
P. corylifolia	$1.14 \times 10^{3} \pm 1.34 \times 10^{2}$	$8.76 \times 10^{4} \pm 6.90 \times 10^{3}$	$9.23 \times 10^{4} \pm 5.00 \times 10^{2}$	$1.12 \times 10^{5} \pm 1.54 \times 10^{3}$

ที่มา : Citarasu *et al.* (2003)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แบคทีเรีย สัตว์ และพืชทดลอง

3.1.1 แบคทีเรีย (*Vibrio parahaemolyticus*) ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ บมจ. เจริญโภคภัณฑ์อาหาร

3.1.2 กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ฟาร์มบ้านโพธิ์ อ.บ้านโพธิ์ จ.ฉะเชิงเทรา

3.1.3 ปลากะพงขาว *(Lates calcarifer)* ฟาร์มสองคลอง อ.บางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา

3.1.4 ชะคราม (*Suaeda maritima*) จากพื้นที่ป่าชายเลน ต.บางแก้ว อ.เมือง จ.สมุทรสงคราม

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ทำสารสกัดจากชะคราม

3.2.1.1 บีกเกอร์ขนาด 50 และ 100 ml

3.2.1.2 แท่งแก้วคนสาร

3.2.1.3 ช้อนตักสาร

3.2.1.4 หลอดทดลอง

3.2.1.5 ไมโครปิเปต 1-10 ml, 1-100 µl และ 100-1000 µl

3.2.1.6 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง

3.2.1.7 เครื่องระเหยไอน้ำ (Rotary evaporator)

3.2.1.8 Hot air oven

3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ทำ Minimum inhibitory concentration (MIC)

3.2.2.1 ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อ (Incubator)

3.2.2.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

3.2.2.3 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)

3.2.2.4 หลอดทดลอง

3.2.2.5 96-well plate

3.2.2.6 เครื่อง vortex

3.2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานทดลองเลี้ยงกุ้งขาวและปลากะพงขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3.1 Salinometer

3.2.3.2 pH meter

3.2.3.3 DO meter

3.2.3.4 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง

3.2.3.5 ถังปริมาตร 250 ลิตร

3.2.3.6 ถังปริมาตร 500 ลิตร

3.2.3.7 ปั๊มลม

3.2.3.8 สวิง

3.2.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือดปลา

3.2.4.1 เข็มฉีดยา

3.2.4.2 แผ่นดินน้ำมัน

3.2.4.3 capillary tube

3.2.4.4 สไลด์ และ cover glass

3.2.4.5 สไลด์นับเม็ดเลือด

3.2.4.6 กล้องจุลทรรศน์

3.2.4.7 น้ำยา Yokoyama's white cell fluid

3.2.4.8 Micro pipette

3.2.4.9 Methanol 100%

3.2.4.10 เครื่อง Haematocrit centrifuge

3.2.4.11 Micro tube

3.2.4.12 โถย้อมสไลด์

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 การเตรียมชะคราม

3.3.1.1 เก็บใบชะครามจากพื้นที่ป่าชายเลน ต.บางแก้ว จ.สมุทรสงคราม ระหว่างเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม 2559 นำมาล้างด้วยน้ำสะอาดเพื่อชะล้างสิ่งสกปรก

3.3.1.2 นำชะครามมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วคัดแยกเอาก้านและดอกออก ให้เหลือเฉพาะส่วนใบที่เขียว ชั่งน้ำหนักสด บันทึกข้อมูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.3 นำส่วนใบสีเขียวไปอบ โดยใช้เครื่องอบแห้งเป่าลมร้อน ใช้ความร้อน 60 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้ง บันทึกข้อมูลเพื่อคำนวณ % ความชื้น

3.3.2 การสกัดสารจากชะคราม ดัดแปลงวิธีการสกัดจาก จุไรวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์ และ สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์ (2553)

3.3.2.1 นำชะครามที่อบแห้งแล้วมาบดให้ละเอียด แล้วแบ่งผงชะครามออกเป็น 3 ส่วน ส่วนละ 50 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล.

3.3.2.2 นำผงไปแช่ในตัวทำละลายต่างกัน 3 ชนิด คือ น้ำ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และปิโตรเลียมอีเทอร์ นาน 24 ชั่วโมง

3.3.2.3 นำสารละลายมากรองผ่านผ้าขาวบาง และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

3.3.2.4 นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator

3.3.3 การวิเคราะห์สารสกัดจากชะคราม ดัดแปลงวิธีการจาก อนันต์ โพธิ์สังกา และคณะ (2014)

3.3.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-ciocalteau Phenol Test เทียบจากกราฟมาตรฐานของ Gallic acid (ภาคผนวก ก1)

3.3.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ ด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้ Quercetin เป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ก2)

3.3.3.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้สาร 2.2-diphenyl-1-picrylhydrazyl วิเคราะห์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 nm (ภาคผนวก ก3)

3.3.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

โดยการหาค่า MIC (Minimal inhibitory concentration) ด้วยวิธี Broth dilution test ทำใน microtiter plate 96-well เติม broth ในแต่ละหลุมปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลุมแรกของแถวที่ 1 และ 2 เติมสารสกัดใบชะครามจากน้ำกลั่น หลุมแรกของแถวที่ 3 และ 4 เติมสารสกัดใบชะครามจากเอทานอลให้ได้ความเข้มข้นในหลุมแรกที่ 200,000 ppm หลุมแรกของแถวที่ 5 และ 6 เติมยาปฏิชีวนะ oxytetracycline ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 30,000 µg. หลังจากนั้นในหลุมถัดไปของทั้ง 6 แถวเจือจางแบบ 2-fold serial dilution แถวที่ 7 เป็นชุดควบคุมแบบบวก (positive control) เป็น broth ที่เติมเชื้อแบคทีเรียแต่ไม่เติมสารสกัดหรือยาปฏิชีวนะ เพื่อแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ใน broth และแถวที่ 8 เป็นชุดควบคุมแบบลบ (negative control) เป็น broth ที่ไม่เติมเชื้อแบคทีเรีย เพื่อแสดงให้เห็นว่าไม่มีการปนเปื้อนในอาหาร เติมเชื้อ *V. Parahaemolyticus* ที่ปรับขนาดแล้ว 10 ไมโครลิตรลงในทุกหลุมของแถวที่ 1-7 เพื่อให้แต่ละหลุมมีเชื้อที่ความเข้มข้น 10^4 cfu การเตรียมเชื้อทำโดยนำเชื้อบริสุทธิ์มาปรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland จากนั้นนำมาเจือจางในน้ำเกลือ 0.85% อัตราส่วน 1:100 ปิดฝาแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเติมสาร Resazurin เพื่อช่วยบ่งชี้การเจริญของแบคทีเรีย แล้วนำไปบ่มต่ออีก 2 ชั่วโมง โดยหากเชื้อแบคทีเรียมีการเจริญจะรีดิวซ์ Resazurin เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีแดง (ภาคผนวก ข1) ตามวิธีของ Sarker *et al.* (2007) เมื่อได้ผลการทดสอบในเบื้องต้นจึงพิจารณาเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.5 การศึกษาผลของอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามต่อกุ้งขาวแวนนาไม ดัดแปลงวิธีการทดลองจาก Immanuel *et al.* (2004) และ Citarasu *et al.* (2003)

3.3.5.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง การทดลองละ 4 ซ้ำ ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารกุ้งไม่ผสมสารสกัดจากใบชะครามใช้เป็นชุดควบคุม

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารกุ้งผสมสารสกัดจากใบชะคราม 2.5% ของน้ำหนักอาหาร

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารกุ้งผสมสารสกัดจากใบชะคราม 5.0% ของน้ำหนักอาหาร

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารกุ้งผสมสารสกัดจากใบชะคราม 7.5% ของน้ำหนักอาหาร

3.3.5.2 วิธีการทดลอง

1) การเตรียมสารสกัดจากใบชะคราม นำชะครามที่อบแล้ว มาปั่นด้วยเครื่องปั่น แล้วนำมาสกัดด้วย เอทานอล 70% ในอัตราส่วนชะคราม 1 กรัมต่อตัวทำละลาย 50 มิลลิลิตร โดยแช่ไว้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง และตามด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำไประเหยด้วยเครื่องกลั่นลำดับส่วนที่ อุณหภูมิ 80 °C

2) การเตรียมอาหารทดลอง นำอาหารกุ้งไม่ผสมสารสกัดจากใบชะครามใช้เป็นสูตรควบคุม และอาหารกุ้งผสมสารสกัดจากใบชะครามที่ความเข้มข้น 2.5, 5.0 และ 7.5% ของน้ำหนักอาหาร คลุกเคล้าให้ทั่วจากนั้นเติมน้ำมันปลาหมึก 30-40 มล./กก.อาหาร เพื่อดึงดูดให้กุ้งกินอาหาร นำมาอัดเม็ด และอบที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ตลอดการทดลอง

3) การเตรียมแบคทีเรียสำหรับแช่ลูกกุ้ง นำแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* เลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) ที่มีเกลือความเข้มข้น 2 % โดยถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มล. มาเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 10 มล. และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 18 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 8 นาที แล้วเทส่วนใสที่เป็นอาหารทิ้งไป ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 2% ล้างซ้ำ 2 รอบ นำเชื้อที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เตรียมเชื้อที่ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml โดยเทียบความขุ่นกับ 0.5 McFarland standard

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) การเตรียมกุ้งขาวและระบบเลี้ยง เตรียมน้ำที่ใช้เลี้ยงความเค็ม 15 ppt ในถังเลี้ยงขนาด 250 ลิตร และนำลูกกุ้งขาว PL 9 จากฟาร์มบ้านโพธิ์ อ.บ้านโพธิ์ จ.ฉะเชิงเทรา มาเลี้ยงปรับสภาพจนถึง PL 15 โดยให้อาหารกุ้งขาวอาหารผงสำเร็จรูป วันละ 4 ครั้ง โดยเครื่องให้อาหารอัตโนมัติ หลังจากนั้นนำลูกกุ้ง PL 15 ลงถังพลาสติกทดลองขนาด 19 x 27 x 12 ซม. จำนวน 80 ตัว ต่อน้ำ 10 ลิตร ให้อาหารวันละ 8% ของน้ำหนักตัวกุ้ง โดยให้วันละ 4 ครั้ง โดยใช้เครื่องให้อาหารอัตโนมัติ ดูดตะกอนที่พื้นตู้และเปลี่ยนถ่ายน้ำ 10% วันเว้นวัน ระยะเวลาในการเลี้ยง 15 วัน กุ้งที่เหลือจำนวนซ้ำละ 60 ตัว จะถูกนำไปทดสอบการต้านทานเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธีการแช่ในน้ำที่มีเชื้อความเข้มข้น 10^8CFU/ml นาน 4 วัน

5) การบันทึกข้อมูล การเติบโตโดยชั่งน้ำหนักกุ้งก่อนทำการทดลองและสิ้นสุดการทดลองและจำนวนกุ้งที่เหลือ แล้วนำมาคำนวณหาอัตราการรอดและน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น

3.3.6 การศึกษาผลของอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามต่อการเติบโต และค่าโลหิตวิทยาของปลากะพงขาว ดัดแปลงวิธีการทดลองจาก จุไรวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์ และสมพร รุ่งกำเนิดวงศ์ (2553) และ Harikrishnan *et al.* (2012)

3.3.6.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง การทดลองละ 4 ซ้ำ ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารปลากะพงขาวไม่ผสมสารสกัดจากใบชะครามเป็นชุดควบคุม
ชุดการทดลองที่ 2 อาหารปลาผสมสารสกัดจากชะคราม 0.5% ของน้ำหนักอาหาร
ชุดการทดลองที่ 3 อาหารปลาผสมสารสกัดจากชะคราม 1.0% ของน้ำหนักอาหาร
ชุดการทดลองที่ 4 อาหารปลาผสมสารสกัดจากชะคราม 2.0% ของน้ำหนักอาหาร

3.3.6.2 วิธีการทดลอง

1) การเตรียมสารสกัดจากใบชะคราม นำชะครามที่อบแล้ว มาปั่นด้วยเครื่องปั่น เมื่อได้ตามที่ต้องการแล้วนำมาสกัดด้วย เอทานอล 70% ในอัตราส่วนชะคราม 1 กรัมต่อตัวทำละลาย 50 มิลลิลิตร โดยจะแช่ไว้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำไประเหยด้วยเครื่องกลั่นลำดับส่วนที่ อุณหภูมิ 80 ℃

2) การเตรียมอาหารทดลอง นำอาหารปลาไม่ผสมสารสกัดจากใบชะครามใช้เป็นอาหารสูตรควบคุม และอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 % ของน้ำหนักอาหาร คลุกเคล้าให้ทั่วจากนั้นเติมน้ำมันปลาหมึก 30-40 มล./กก. อาหาร เพื่อดึงดูดให้ปลากินอาหาร นำมาอัดเม็ดและอบที่อุณหภูมิ 60 ℃ เก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ℃ เพื่อใช้ตลอดการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) การเตรียมปลากะพงขาวและระบบเลี้ยง เตรียมน้ำที่ใช้เลี้ยงความเค็ม 10 ppt จากนั้นเติมน้ำลงถังเลี้ยงขนาด 500 ลิตร และนำลูกปลากะพงขาวมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพ ฝึกให้กินอาหาร ควบคุมนาน 2 สัปดาห์ ลูกปลากะพงขาวน้ำหนักประมาณ 2 กรัม แล้วจึงนำปลาไปปล่อยถังเลี้ยงทดลองขนาด 250 ลิตร ถังละ 30 ตัว ให้อาหาร 5% ของน้ำหนักตัวต่อวัน แบ่งให้วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น ระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์ เปลี่ยนถ่ายน้ำ 30% สัปดาห์ละ 1 ครั้ง

4) การบันทึกข้อมูล ชั่งน้ำหนักปลาก่อนการทดลองและบันทึกน้ำหนักทุก 2 สัปดาห์ จนกระทั่งครบ 8 สัปดาห์ แล้วนำมาคำนวณหาน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นอัตรารอดและอัตราการเติบโตจำเพาะ และหาค่าโลหิตวิทยาเมื่อครบสัปดาห์ที่ 4 และสิ้นสุดการทดลองที่ 8 สัปดาห์ โดยสุ่มปลากะพงขาวชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ตัว มาทำการสลบเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดบริเวณหาง (caudal blood vessels puncture) โดยเคลือบแฮปพารินในกระบอกฉีดยาเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด หลังจากนั้นแบ่งเลือดปลาใส่ในไมโครฮีมาโตคริต เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% haematocrit) จำนวนเม็ดเลือดขาว จำนวนเม็ดเลือดแดง และจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาวโดยวิธีของ Braxhall and Daisley (1973) รายละเอียดวิธีการทดลองแสดงใน ภาคผนวก ค

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

3.5 สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.6 ระยะเวลาในการทำวิจัย

เดือนมิถุนายน 2559 – เดือนพฤศจิกายน 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสกัด (yield) Total phenolic compounds (TPC) Total flavonoid content (TFC) และค่าการต้านอนุมูลอิสระในใบชะครามที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน 3 ชนิด

ใบชะครามสดที่นำมาอบพบว่ามีค่าความชื้นเฉลี่ย 85% โดยใบชะครามสดน้ำหนัก 1 กก. หลังจากผ่านการอบแห้งแล้วจะเหลือน้ำหนักเฉลี่ยที่ 0.15 กก. การสกัดใบชะครามด้วยน้ำกลั่นได้ปริมาณสารสกัดสูงสุด เท่ากับ 50.24±2.06 % น.น. แห้ง รองลงมาเป็นเอทานอล และปิโตรเลียมอีเทอร์เท่ากับ 20.34±0.83 และ 2.04±0.10 % น.น. แห้ง ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังตารางที่ 4.1 สารสกัดใบชะครามจากน้ำกลั่นมีปริมาณ TPC มากที่สุดเท่ากับ 8.41±0.02 µg GAE/g รองลงมาเป็นเอทานอลและปิโตรเลียมอีเทอร์ เท่ากับ 7.00±0.03 และ 4.90±0.03 µg GAE/g ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สารสกัดจากปิโตรเลียมอีเทอร์มีปริมาณ TFC สูงสุดเท่ากับ 47.98±0.12 µg QE/g รองลงมาเป็นเอทานอลและน้ำกลั่น เท่ากับ 42.89±0.11 และ 5.60±0.04 µg QE/g ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังตารางที่ 4.2 สารสกัดใบชะครามจากน้ำกลั่นมีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด เท่ากับ 75.23±5.38% รองลงมาเป็นเอทานอล เท่ากับ 20.92±2.56% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนปิโตรเลียมอีเทอร์ไม่แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระ (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารสกัดใบชะครามที่ได้จากตัวทำละลาย 3 ชนิด

ตัวทำละลาย	ปริมาณสารสกัด (% น้ำหนักแห้ง)
น้ำกลั่น	50.24±2.06[a]
เอทานอล 95%	20.34±0.83[b]
ปิโตรเลียมอีเทอร์	2.04±0.10[c]

ค่าเฉลี่ย±SE ที่มีอักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 TPC และ TFC ของสารสกัดใบชะครามจากตัวทำละลาย 3 ชนิด

ตัวทำละลาย	TPC (µg GAE/g)	TFC (µg QE/g)
น้ำกลั่น	8.41±0.02[a]	5.60±0.04[c]
เอทานอล 95%	7.00±0.03[b]	42.89±0.11[b]
ปีโตรเลียมอีเทอร์	4.90±0.03[c]	47.98±0.12[a]

ค่าเฉลี่ย±SE ที่มีอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในแนวตั้งหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

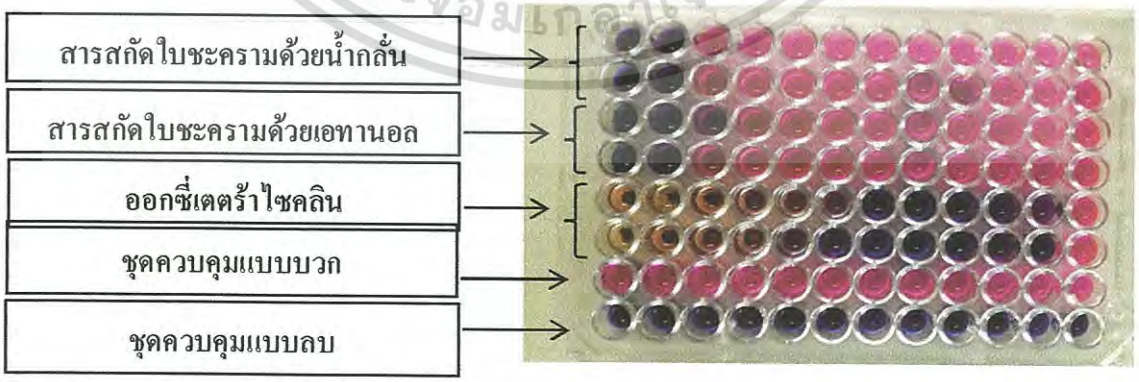
ตารางที่ 4.3 ค่าการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ของสารสกัดใบชะครามจากตัวทำละลาย 3 ชนิด

ตัวทำละลาย	DPPH (% ยับยั้ง)
น้ำกลั่น	75.23±5.38[a]
เอทานอล 95%	20.92±2.56[b]
ปีโตรเลียมอีเทอร์	ND

ค่าเฉลี่ย±SE ที่มีอักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.2 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากสารสกัดจากใบชะคราม

การทดสอบสารสกัดใบชะครามจากตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำกลั่น และ เอทานอล 95% พบว่าสารสกัดจากเอทานอล 95% ได้ค่า MIC ในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ต่ำที่สุด ที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *V. Parahaemolyticus* ของสารสกัดใบชะคราม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของสารสกัดจากใบชะครามที่เสริมในอาหารต่อการเติบโตและความต้านทานต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในกุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามสูตรต่าง ๆ มีการเติบโต และการต้านทานเชื้อ *V. parahaemolyticus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) น้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ยของกุ้งขาวชุดควบคุมที่กินอาหารผสมสารสกัดจากใบชะคราม 0% และชุดที่กินอาหารผสมสารสกัดจากใบชะคราม 2.5, 5.0, และ 7.5 % ของน้ำหนักอาหาร เท่ากับ 61.23±0.26, 62.30±0.04, 66.13±2.31 และ 59.08±0.28 มก./ตัว ตามลำดับ โดยกุ้งขาวที่กินอาหารผสมสารสกัดจากใบชะคราม 5.0 % ของน้ำหนักอาหาร มีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายและน้ำหนักเพิ่มขึ้นเฉลี่ยมากกว่ากุ้งขาวที่กินอาหารผสมสารสกัดจากใบชะคราม 0, 2.5 และ 7.5 % ของน้ำหนักอาหาร ในขณะที่อัตรารอดของลูกกุ้งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังตารางที่ 4.4

4.4 ผลของสารสกัดจากใบชะครามที่เสริมในอาหารต่อการเติบโต และค่าโลหิตวิทยาของปลากะพงขาว

4.4.1 ผลของอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามต่อการเติบโต

การทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวโดยให้อาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามที่ 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 % ของน้ำหนักอาหาร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์พบว่า ปลากะพงขาวที่ให้อาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามที่ระดับความเข้มข้นที่ 1.0 % ของน้ำหนักอาหาร มีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุมที่กินอาหารผสมสารสกัดจากใบชะคราม 0% และชุดที่กินอาหารผสมสารสกัดจากใบชะคราม 0.5 และ 2.0 % ของน้ำหนักอาหาร รองลงมาคือชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามที่ 2.0 % ของน้ำหนักอาหาร ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามที่ 1.0 % ของน้ำหนักอาหาร และชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าอาหารที่ผสมสารสกัดใบชะครามความเข้มข้น 1.0 % ของน้ำหนักอาหาร สามารถช่วยส่งเสริมการเติบโตของปลากะพงขาวได้ดีที่สุด โดยอัตราการรอดของปลากะพงขาวระหว่างชุดทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังตารางที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การเติบโตของกุ้งขาวที่กินอาหารเสริมสารสกัดใบชะครามที่ความเข้มข้นต่างกัน

	ความเข้มข้นสารสกัดใบชะคราม (% ของน้ำหนักอาหาร)			
	0	2.5	5.0	7.5
น้ำหนักเริ่มต้น (มก./ตัว)	4.0±0.14^{a}	4.08±0.08^{a}	4.00±0.12^{a}	4.08±0.16^{a}
น้ำหนักสุดท้าย (มก./ตัว)	61.23±0.26^{b}	62.30±0.04^{b}	66.13±2.31^{a}	59.08±0.28^{b}
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (มก./ตัว)	57.20±0.18^{b}	58.23±0.09^{b}	62.13±2.32^{a}	55.00±0.23^{b}
อัตรารอด ^{A} (%)	81.25±0.51^{a}	85.31±1.07^{a}	85.94±1.29^{a}	81.88±2.19^{a}
อัตรารอด ^{B} (%)	40.83±2.59^{a}	42.08±3.87^{a}	85.00±0.68^{b}	85.83±2.59^{b}

ค่าเฉลี่ย±SE ที่มีอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในแนวนอนหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

อัตรารอด ^{A} (%) = อัตรารอดของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดชะคราม 15 วัน

อัตรารอด ^{B} (%) = อัตรารอดของกุ้งขาวหลังทำการแช่ในเชื้อ *V. parahaemolyticus* นาน 4 วัน

ตารางที่ 4.5 การเติบโตของปลากะพงขาวที่กินอาหารเสริมสารสกัดใบชะครามที่ความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้นสารสกัด (% ของน้ำหนักอาหาร)	น้ำหนักเริ่มต้น (ก./ตัว)	น้ำหนักสุดท้าย (ก./ตัว)	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (ก./ตัว)	อัตรารอด (%)
0	0.89±0.01^{a}	22.77±0.58^{c}	21.89±0.56^{c}	80.00±3.60^{a}
0.5	0.87±0.07^{a}	23.95±1.13^{bc}	23.08±1.07^{bc}	80.83±4.98^{a}
1.0	0.89±0.12^{a}	31.98±1.07^{a}	31.09±1.06^{a}	83.33±5.27^{a}
2.0	0.96±0.06^{a}	26.66±0.91^{b}	25.70±0.97^{b}	84.17±3.44^{a}

ค่าเฉลี่ย±SE ที่มีอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในแนวตั้งหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.4.2 ผลของอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามต่อค่าโลหิตวิทยา

การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยาของปลากะพงขาวที่อายุการเลี้ยง 4 สัปดาห์ พบว่า ปลากะพงขาวชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามที่ 2.0 % ของน้ำหนักอาหาร ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 22.25±3.23% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับปลากะพงขาวชุดควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบชะคราม 0% และชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบชะคราม 0.5 และ 1.0 % ของน้ำหนักอาหาร สำหรับจำนวนเม็ดเลือดแดงและจำนวนเม็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลือดขาวของปลากะพงขาวระหว่างชุดทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ดังตารางที่ 4.6 และ 4.7

ตารางที่ 4.6 ปริมาณเม็ดเลือดแดง จำนวนเม็ดเลือดแดง และจำนวนเม็ดเลือดขาว ของปลากะพงขาวที่กินอาหารเสริมสารสกัดใบชะครามที่ความเข้มข้นต่างกัน

		ความเข้มข้นสารสกัดใบชะคราม (% ของน้ำหนักอาหาร)			
		0	0.5	1.0	2.0
ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%)	4 weeks	38.00±3.14[a]	32.75±0.34[a]	33.08±4.52[a]	22.25±3.23[b]
	8 weeks	39.83±3.00[a]	34.50±0.55[a]	34.33±0.0.61[a]	34.00±1.65[a]
จำนวนเม็ดเลือดแดง (10^4cells/mm^3)	4 weeks	46.94±3.29[a]	53.31±3.78[a]	57.29±2.75[a]	57.77±6.98[a]
	8 weeks	58.56±1.37[a]	62.42±1.82[a]	58.58±2.62[a]	65.27±1.86[a]
จำนวนเม็ดเลือดขาว (10^2cells/mm^3)	4 weeks	34.79±3.29[a]	40.83±3.20[a]	37.81±9.38[a]	31.56±1.52[a]
	8 weeks	37.71±1.91[a]	34.48±1.88[a]	36.35±2.60[a]	39.58±2.84[a]

ค่าเฉลี่ย±SE ที่มีอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในแนวนอนหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 4.7 ชนิดของเม็ดเลือดขาว ลิมโฟไซท์ อิโอซิโนฟิล โมโนไซท์ เบโซฟิล ทรอมโบไซท์ และนิวโทรฟิลของปลากะพงขาวที่กินอาหารเสริมสารสกัดใบชะครามที่ความเข้มข้นต่างกัน

ชนิดของเม็ดเลือดขาว	อายุ	ความเข้มข้นสารสกัดใบชะคราม (% ของน้ำหนักอาหาร)			
		0	0.5	1.0	2.0
ลิมโฟไซท์	4 สัปดาห์	48.96±2.11[a]	54.54±0.75[a]	50.88±2.33[a]	54.13±1.14[a]
	8 สัปดาห์	55.50±1.26[a]	55.25±1.63[a]	54.17±1.01[a]	56.58±1.25[a]
อิโอซิโนฟิล	4 สัปดาห์	0.71±0.24[b]	0.83±0.30[b]	1.08±0.05[ab]	1.75±0.28[a]
	8 สัปดาห์	1.38±0.38[a]	1.50±0.18[a]	1.58±0.22[a]	1.38±0.08[a]
โมโนไซท์	4 สัปดาห์	23.08±1.44[a]	19.00±0.35[a]	21.13±1.89[a]	18.33±1.48[a]
	8 สัปดาห์	19.33±1.82[a]	17.17±1.81[a]	19.42±2.01[a]	18.29±0.97[a]
เบโซฟิล	4 สัปดาห์	1.33±0.12[a]	1.46±0.24[a]	1.38±0.2[a]	1.92±0.31[a]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	8 สัปดาห์	1.96±0.36[a]	2.08±0.41[a]	1.71±0.21[a]	2.21±0.04[a]
ทรอมโบไซท์	4 สัปดาห์	23.13±1.28[a]	22.21±0.51[a]	23.46±0.61[a]	20.29±1.36[a]
	8 สัปดาห์	17.71±0.63[a]	20.71±0.46[a]	20.08±1.65[a]	18.17±1.63[a]
นิวโทรฟิล	4 สัปดาห์	2.79±0.50[ab]	1.96±0.36[b]	2.08±0.14[b]	3.58±0.45[a]
	8 สัปดาห์	4.13±0.13[a]	3.29±0.31[a]	3.04±0.77[a]	3.38±0.28[a]

ค่าเฉลี่ย±SE ที่มีอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในแนวนอนหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ปริมาณสารสกัด (yield) Total phenolic compounds (TPC) Total flavonoid content (TFC) และค่าการต้านอนุมูลอิสระในใบชะครามที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน

ใบชะครามสดที่ทำการทดลองครั้งนี้มีค่าความชื้นเฉลี่ย 85% เมื่อนำมาอบแห้งและทดลองสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ พบว่าน้ำกลั่นได้ปริมาณสารสกัดสูงสุด เท่ากับ 50.24±2.06 % น.น. แห้ง และสารสกัดใบชะครามจากน้ำกลั่นมีปริมาณ TPC มากที่สุดเท่ากับ 8.41±0.02 µg GAE/g โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สอดคล้องกับการทดลองของ Sudjaroen (2015) และ Pornpitakdamrongan and Sudjaroen (2014) ที่พบว่า สารสกัดใบชะครามจากน้ำกลั่นได้ปริมาณ TPC สูงกว่าเอทานอล มีค่าเท่ากับ 14.47 และ 6.93 GAE/g DW ตามลำดับ ซึ่งปริมาณสาร TPC ที่แตกต่างกันในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากสภาพขั้วของตัวทำละลาย โดย TPC จัดเป็นสารอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถละลายได้ดีในสภาพที่มีขั้วปานกลางถึงสูง ส่วนสารสกัดใบชะครามจากปิโตรเลียมอีเทอร์มีปริมาณ TFC สูงสุดเท่ากับ 47.98±0.12 µg QE/g รองลงมาเป็นเอทานอล 95% และน้ำกลั่นเท่ากับ 42.89±0.11 และ 5.60±0.04 µg QE/g ตามลำดับ ฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลรวมอยู่ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป และมีโครงสร้างที่ซับซ้อนมากขึ้นซึ่งส่งผลต่อการละลายของสาร การศึกษาของ อรชร ไอสันเทียะ และ กาญจนา วงศ์กระจ่าง (2558) ทดลองสกัดฟลาโวนอยด์จากดอกดาวเรืองสดโดยใช้ระบบตัวทำละลายผสม 12 ระดับ จากสภาพขั้วต่ำไปจนถึงสภาพขั้วสูง พบว่าปริมาณ TFC ที่สกัดได้จากดอกดาวเรืองสดไม่แปรผันตามสภาพความมีขั้วของตัวทำละลาย ส่วนค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดใบชะครามจากน้ำกลั่นมีค่าสูงสุดเท่ากับ 75.23±5.38% สัมพันธ์กับปริมาณ TPC ในน้ำกลั่นที่มีปริมาณสูงที่สุด

5.2 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากสารสกัดจากใบชะคราม

ทดสอบสารสกัดใบชะครามจากตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำกลั่น และเอทานอล 95% พบว่าสารสกัดจากเอทานอล 95% ได้ค่า MIC ในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ต่ำที่สุด ที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm สอดคล้องกับ Kanjana *et al.* (2011) ที่ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ของสารสกัดสาหร่าย *Gracilaria fisheri* จากตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ hexane, chloroform, methanol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ ethanol พบว่า สารสกัดสาหร่าย *G. fisheri* จากเอทานอล ได้ค่า MIC ต่ำที่สุด (hexane=190±10.3, chloroform=90±9.7, methanol=100±9.5 และ ethanol=90±5.5 µg/ml เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีสามารถละลายองค์ประกอบในพืชได้ทั้งสารที่ละลายในตัวทำละลายมีขั้วและไม่มีขั้ว และช่วยส่งเสริมในการพาสารเหล่านี้ผ่านผนังเซลล์เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้สารสกัดจากเอทานอลมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จึงเลือกสารสกัดใบชะครามจากเอทานอลมาผสมในอาหารสำหรับทดลองเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมและปลากะพงขาว

5.3 ผลของสารสกัดจากใบชะครามที่เสริมในอาหารต่อการเติบโตและความต้านทานต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในกุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามสูตรต่าง ๆ มีการเติบโต และการต้านทานเชื้อ *V. parahaemolyticus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) น้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ยของกุ้งขาวที่กินอาหารผสมสารสกัดจากใบชะคราม 0, 2.5, 5.0, และ 7.5 % ของ นน.อาหาร เท่ากับ 61.23±0.26, 62.30±0.04, 66.13±2.31 และ 59.08±0.28 มก./ตัว ตามลำดับ โดยกุ้งขาวที่กินอาหารผสมสารสกัดจากใบชะคราม 5.0 % ของ นน.อาหาร มีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายและน้ำหนักเพิ่มขึ้นเฉลี่ยมากกว่ากุ้งขาวที่กินอาหารผสมสารสกัดจากใบชะคราม 0, 2.5 และ 7.5 % ของ นน.อาหาร ในขณะที่อัตรารอดของลูกกุ้งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ซึ่งการทดลองของ Immanuel *et al.* (2004) พบว่าการเสริมสารสกัดสมุนไพรและสาหร่ายทะเลในอาร์ทีเมียที่ใช้เลี้ยงกุ้ง สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิต อัตราการเติบโตจำเพาะ และลดปริมาณ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อและเนื้อเยื่อตับกับตับอ่อนของกุ้งแชบ๊วย เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งแชบ๊วยชุดทดลองที่ไม่เสริมสารสกัดสมุนไพรและสาหร่ายทะเลในอาร์ทีเมีย หลังจากให้กุ้งขาวกินอาหารทดลองทั้ง 4 สูตร เป็นระยะเวลา 15 วัน จึงนำกุ้งมาทำการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* โดยแช่ในเชื้อความเข้มข้น 10^8 CFU/mL นาน 4 วัน พบว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมสารสกัดจากใบชะคราม 5.0 และ 7.5 % ของ นน.อาหาร มีอัตราการรอดสูงเท่ากับ 85.00±0.68 และ 85.83±2.59% ตามลำดับ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) กับชุดทดลองที่กินอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามที่ความเข้มข้น 0 และ 2.5 % ของ นน.อาหาร ที่มีอัตรารอดต่ำเท่ากับ 40.83±2.59 และ 42.08±3.87% ตามลำดับ ผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Balcazar *et al.* (2007) ที่ทดลองเสริมโปรไบโอติกในอาหารและศึกษาความทนทานต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในกุ้งขาว ซึ่งพบว่ากุ้งเริ่มมีการตายในวันที่ 4 หลังทำการแช่เชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 ผลของสารสกัดจากใบชะครามที่เสริมในอาหารต่อการเติบโตของปลากะพงขาว

5.4.1 ผลของอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามต่อการเติบโต

ผลการเลี้ยงปลากะพงขาวโดยให้อาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามที่ 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 % ของ นน.อาหาร เลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ปลากะพงขาวที่ให้อาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามที่ระดับความเข้มข้นที่ 1.0 % ของ นน.อาหาร มีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) รองลงมาคือชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามที่ 2.0 % ของ นน.อาหาร มีการศึกษาการใช้สมุนไพรช่วยส่งเสริมการเติบโตของปลาชนิดอื่นๆ เช่น Kaewtapee (2011) ทดลองผสมโด่ไม่รู้ล้ม (*Elephantopus scaber*) และย้อสะพานควาย (*Thailentadopsis tenuis*) ในอาหารที่อัตราส่วน 40 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ช่วยเร่งการเติบโตของปลานิล (Nile tilapia) Nya and Austin (2009) ศึกษาใช้กระเทียมผสมในอาหารที่อัตราส่วน 5 และ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ช่วยเพิ่มการเติบโตของปลาเทร้าสายรุ้ง (rainbow trort) สำหรับการทดลองครั้งนี้การใช้อาหารที่ผสมสารสกัดใบชะครามความเข้มข้น 1.0 % ของ นน.อาหาร สามารถช่วยส่งเสริมการเติบโตของปลากะพงขาวได้ดีที่สุด ส่วนอัตราการรอดของปลากะพงขาวระหว่างชุดทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

5.4.2 ผลของอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามต่อค่าโลหิตวิทยา

การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยาของปลากะพงขาวที่อายุการเลี้ยง 4 สัปดาห์ พบว่า ปลากะพงขาวชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามที่ 2.0 % ของ นน.อาหาร ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 22.25±3.23% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวระหว่างชุดทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ชนิดของเม็ดเลือดขาวของปลากะพงขาวระหว่างชุดทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ยกเว้นเม็ดเลือดขาวชนิด eosinophils และ neutrophils ซึ่งมีหน้าที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการปกป้องเซลล์จากแบคทีเรียและสิ่งแปลกปลอมต่างๆ การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวนเม็ดเลือดขาวแสดงถึงการทำงานของภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ ในสภาวะที่ปลามีการติดเชื้อก่อโรคจำนวนเม็ดเลือดขาวจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นในขณะที่จำนวนเม็ดเลือดแดงลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับปลาที่ไม่ติดเชื้อ กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (2539) ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นจะมีค่าลดลงเมื่อปลาไม่กินอาหารหรือติดเชื้อ (Blaxhall. 1972) ปลาที่มีความเครียดหรืออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจะกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มคอร์ติซอล (cortisol) ในกระแสเลือดซึ่งไปยับยั้งการทำงานของไขกระดูกและเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือด (haemopoietic tissue) ทำให้การสร้างเม็ดเลือดแดงลดลง (Mazeaud and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Donalson. 1977) อย่างไรก็ตาม ที่อายุการเลี้ยง 8 สัปดาห์ ค่าโลหิตวิทยาของปลากะพงขาวระหว่างชุดทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แสดงให้เห็นว่า สำหรับการทดลองครั้งนี้ปลากะพงขาวชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามที่ 2.0 % ที่พบความผิดปกติของค่าโลหิตวิทยาที่อายุ 4 สัปดาห์ หลังจากได้รับอาหารที่ผสมสารสกัดจากใบชะครามอย่างต่อเนื่อง ค่าโลหิตวิทยาสามารถกลับมาสู่ระดับปกติไม่แตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ ในสัปดาห์ที่ 8 ของการเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

6.1 น้ำกลั่นสามารถสกัดใบชะครามได้ปริมาณสารสกัดสูงสุด เท่ากับ 50.24±2.06 % น.น. แห้ง มีปริมาณ Total phenolic compounds (TPC) สูงสุด เท่ากับ 8.41±0.02 µg GAE/g และมีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด เท่ากับ 75.23±5.38% ส่วนสารสกัดใบชะครามจากปิโตรเลียมอีเทอร์ มีปริมาณ TFC สูงสุด เท่ากับ 47.98±0.12 µg QE/g

6.2 สารสกัดใบชะครามจากเอทานอล 95% มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* สูงสุด โดยมีค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) ในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ต่ำสุด ที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm

6.3 กุ้งขาวแวนนาไม PL15 ที่กินอาหารเสริมสารสกัดใบชะครามที่ความเข้มข้น 5.0 % ของน้ำหนักอาหาร เป็นเวลา 15 วัน มีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายและน้ำหนักเพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงสุด และมีอัตรารอดสูงหลังการทดลองแช่ในเชื้อ *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml นาน 4 วัน

6.4 ปลากะพงขาว

6.4.1 ปลากะพงขาวน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 1.84±0.08 กรัม ที่กินอาหารเสริมสารสกัดใบชะครามที่ความเข้มข้น 1.0 % ของน้ำหนักอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงสุด ส่วนอัตรารอดของปลากะพงขาวทุกชุดทดลองไม่แตกต่างกัน

6.4.2 ค่าโลหิตวิทยาของปลากะพงขาวที่อายุ 4 สัปดาห์ ปลาที่กินอาหารเสริมสารสกัดใบชะครามที่ความเข้มข้น 2.0 % ของน้ำหนักอาหาร มีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่ำ และเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลและอิโอซิโนฟิลสูง ที่อายุการเลี้ยง 8 สัปดาห์ ค่าโลหิตวิทยาของปลาทุกชุดทดลองไม่แตกต่างกัน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรจะทำการศึกษาเพิ่มเติม เกี่ยวกับการเลี้ยงปลากะพงขาวจนถึงขนาดตัวเต็มวัยด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามว่าส่งผลต่อการเติบโตและค่าโลหิตวิทยาหรือไม่

2. ควรทำการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและปริมาณสารต่างๆ ในใบชะครามในแต่ละช่วงฤดูกาล เพื่อดูผลกระทบจากปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความเค็มในดิน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรมประมง. 2559. **สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2557.** ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. เอกสารฉบับที่ 11/2559. หน้า 41.

กิจการ ศุภมาตย์, สาวิตรี ศิลาเกษ, วุฒิพร พรหมขุนทอง และ สิทธิ บุณยรัตผลิน. 2539. **โรคและพยาธิปลา.** คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์สงขลา. 212 หน้า.

ขวัญเรือน สุวรรณรัตน์. 2556. "มาตรฐานกุ้งไทยต้องใส่ใจเรื่องสารตกค้าง." [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.nicaonline.com/index.php?option=com_content&view=article&id = 1149:2013-10-29-06-02-36&catid=37:2012-02-20-02-58-06&Itemid=117. สืบค้น 10 พฤศจิกายน 2559.

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

ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. **การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะประมง. กรมประมง. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 197 หน้า.

ดวงฤดี หวั่นหนู, อรพิน เกิดชูชื่น, ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์ และศิริวรรณ ตั้งแสงประทีป. 2553. "ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากชะคราม (*Suaeda maritima*)." **ว. วิทย์.** กษ. 41(3/1)(พิเศษ) : 637-640.

นันทวัน บุญยะประภัศร, วิมล ศรีสุข, อรัญญา จุติวิบูลย์สุข, ประพินศรา สอนเล็ก, วิไลวรรณ ทองใบน้อย, วงศ์สถิต ฉั่วกุล, Fong, H.S. Pezzuto, J. และ Kosmeder, J. 2545. "ผักพื้นบ้านในป่าชายเลน." **วารสารสมุนไพร.** 9(1).

วริศรา ชื่นอารมย์, อรพิน เกิดชูชื่น และณัฏฐา เลาหกุลจิตต์. 2553. "สารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากชะคราม (*Suaeda maritima*)." **ว. วิทย์.** กษ. 41(3/1)(พิเศษ) : 621-624.

สุรศักดิ์ วงศ์กิตติเวชสกุล. 2540. **หนังสือสารานุกรมปลาไทย.** บริษัท เอม ซัพพลาย จำกัด. กรุงเทพมหานคร: 170 หน้า.

สายชล เพลินจิตต์, ศิริลักษณ์ วงส์พิเชษ และธนิต ผิวนิ่ม. 2557. "ผลการเสริมน้ำสมุนไพรในอาหารต่อการรอดตายและการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม." **การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัย**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 4.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2557ก. "สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2558." [Online]. เข้าถึงได้จาก :http://www.foodfti.com/Files/Name/CONTENT474087522960 .pdf. สืบค้น 10 พฤศจิกายน 2559.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2557ข. "เศรษฐกิจการผลิตและการตลาดปลากะพงขาวในกระชัง." **เอกสารวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร เลขที่ 106**. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อรชร ไอสันเทียะ และ กาญจนา วงศ์กระจ่าง. 2558. "การศึกษาระบบตัวทำละลายของการสกัดสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดจากดอกดาวเรืองสด." **รายงานสืบเนื่องจากการประชุมสัมมนาวิชาการนำเสนองานวิจัยระดับชาติและนานาชาติ (Proceedings)**. เครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 15.

อนันต์ โพธิ์ลังกา, วรวิทย์ รัตนพิเศษ และ เกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์. 2014. "การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิคกับฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากต้นเฉาก๊วยและต้นหมาน้อย." **Journal of science and technology MSU**. vol 33 no 3 May-June 2014 : 224-232.

Balcazar, J.L. Rojas-Luna, T. and Cunningham, D.P. 2007. "Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp *(Litopenaeus vannamei)* following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*." **Journal of Invertebrate Pathology**. 96 : 147-150.

Banerjee, D. Chakrabarti, S. Alok, K.H. Shivaji, B. Jharna, R. and Biswapati, M. 2008. "Antioxidant activity and total phenolics of some mangroves in Sundarbans." **African Journal of Biotechnology.** 7(6) : 805-810.

Becula, J.M. Gnanadesigan, M. Rajkumar, P.B. Ravikumar, S. and Anand, M. 2012. "Antiviral, antioxidant and toxicological evaluation of mangrove plant form South East of India." **Tropical Biomedicine :** 352-357.

Blaxhall, P. C. 1972. "The hematological assessment of the health of freshwater fish." A review of selected literature. **Journal of Fish Biology**. 4 : 593-604.

Citarasu, T. Venkatramalingam, K. Micheal, B.M. Raja, J.S.R. and Petermarian M. 2003. "Influence of the antibacterial herbs, *Solanum trilobatum*, *Andrographis paniculata* and *Psoralea*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

corylifolia on the survival, growth and bacterial load of *Penaeus monodon* post larvae." **Aquaculture International**. 11 : 581-595.

FAO. 2013. "Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) of cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304)." **FAO Fisheries and Aquaculture Report No.1053.** Rome : 54 pp.

Harikrishnan, R. Kim, J.S. Kim, M.C. Dharaneedharan, S. Kim, D.H. H, S.H. Hong, C.Y. Song, C.Y Balasundaram, C. and Heo, M.S. 2012. "Effect of dietary supplementation with *Suaeda maritima* on blood physiology, innate immune response, and disease resistance in olive flounder against *Miamiensis avidus*." **Experimental Parasitology**. 131 : 195–203.

Immanuel, G. Vincybai, V.C. Sivaram, V. Palavesam, A. and Marian, M.P. 2004. "Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles." **Aquaculture.** 236 : 53-65.

Kaewtapee, W. 2011. "Use of herbs as supplementary fed for growth enhancer in tilapia." **Rajabhat Chiang Mai Research Journal 2011**. 12 : 121-30.

Kanjana, K. Tawut, R. and Somluk, A. 2011. "Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*." **Fish & shellfish Immunology**. 30 : 389-396.

Larsen, K. 2000. "Chenopodiaceae. In T." **Flora of Thailand**. vol. 7 part 2: 257-259.

Mazeaud, F. and E. M. Donalson. 1977. "Primary and secondary effects of stress on fish." **Transactions of American Fisheries Society**. 106 : 201-202.

Nya, E.J. and Austin, B. 2009. "Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)." **Journal of Fish Diseases**. 32 (11): 963–970.

Oueslati, S. Trabelsi, N. Boulaaba, M. Legault, J. Abdelly C. and Ksouri, R. 2012. "Evaluation of antioxidant activities of the edible and medicinal *Suaeda* species and related phenolic compounds." **Industrial Crops and Products**. 36 : 513–518.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Patra, JK. Dhal, NK. and Thatoi, HN. 2011. "*In vitro* bioactivity and phytochemical screening of *Suaeda maritima* (Dumort) : A mangrove associate from Bhitarkanika, India." **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. 4 : 727-734.

Pornpitakdamrong, A. and Sudjaroen, Y. 2014. "Seablite *(Suaeda maritima)* product for cooking, Samut Songkram province." **Thailand Scientific Research**. 5 : 850-856.

Ravikumar, S. Gnanadesigan, M. Jacob, I. S. and Kalaiarasi, A. 2011. " Hepatoprotective and antioxidant properties of *Suaeda maritima* (L.) Dumort ethanolic extract on concanavalin-A induced hepatotoxicity in rats." **Indian Journal of Experimental Biology**. 49 : 455-460.

Sarker, S. D. Nahar, L. and Kumararasamy, Y. 2007. " Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals." **Methods.** 42 : 321-324.

Sudjaroen, Y. 2015. " Evaluation for nutritive values and antioxidant activities of dried seablite (*Suaeda maritima*)." **Scientific Research and Essays**. 10(9) : 306-312.

Vazquez, GR. and Guerrero, GA. 2007. "Characterization of blood cells and haematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes)". **Tissue Cell**. 39 : 151-160.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก 1 การวิเคราะห์ Total phenolic compounds (TPC) โดยใช้ Folin ciocalteu reagent

การเตรียมสารเคมี

1. Gallic acid 0.0200 g ปรับปริมาตรด้วย Ethanol ความเข้มข้น 95% (มาจาก Ethanol ความเข้มข้น 100% 95 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 ml) 50 ml
2. Folin ciocalteu ความเข้มข้นเจือจาง 10 เท่า เตรียมจาก Folin ciocalteu 10 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 ml
3. Sodium carbonate เตรียมจาก Sodium carbonate 20 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 ml นำไปต้มให้สารละลาย ทิ้งไว้ให้เย็นอุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง แล้วกรองสารด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

วิธีการ

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ลงในหลอดทดลอง (ตารางภาคผนวก ก 1)

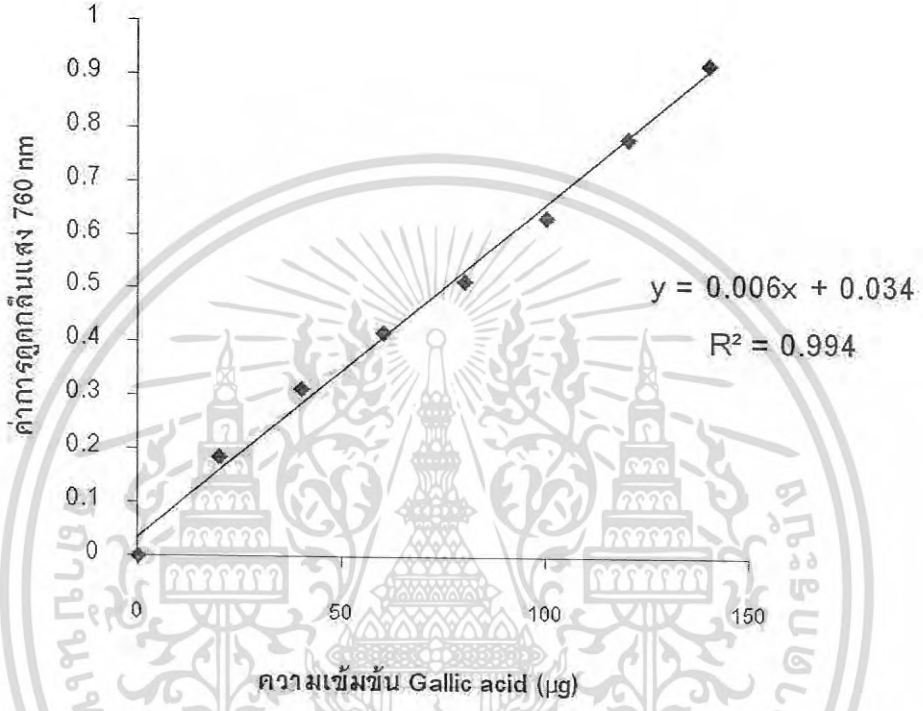
ตารางภาคผนวก ก 1 สารละลายมาตรฐาน Gallic acid สำหรับการวิเคราะห์ Total phenolic compounds (TPC)

หลอดที่	ปริมาณ Gallic acid (µg)	ปริมาณน้ำกลั่น (ml)
1 (Blank)	0	10
2	20	9.98
3	40	9.96
4	60	9.94
5	80	9.92
6	100	9.90
7	120	9.88
8	140	9.86

2. นำสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ที่เตรียมไว้มาเติม Folin ciocalteu reagent 2 ml เขย่าให้เข้ากัน และทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที
3. เติม Na_2CO_3 2 ml เขย่าให้เข้ากัน และทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 60 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm และบันทึกผล เพื่อคำนวณหากราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ปิเปตสารสกัดจากใบชะครามความเข้มข้น 1% มา 0.4 ml และเติมกลั่น 9.96 ml ลงในหลอดทดลอง
6. นำสารสกัดที่เตรียมไว้ทำตามวิธีในข้อ 3, 4 และ 5 ตามลำดับ
7. บันทึกผลการวิเคราะห์ เพื่อคำนวณหาโดย TPC เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ ก 1)



ภาพที่ ก 1 กราฟมาตรฐานวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (TPC)

ก 2 การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ (TFC)

การเตรียมสารเคมี

1. $NaNO_3$ 5% เตรียมจาก $NaNO_3$ 5 g เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml
2. $AlCl_3$ 10% เตรียมจาก $AlCl_3$ 10 g เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml
3. NaOH 1 M เตรียมจาก NaOH 4 g เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin ที่มีตัวทำละลายน้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง (ตารางภาคผนวก ก 2.1) และสารละลายมาตรฐาน Quercetin ที่มีตัวทำละลายเอทานอลลงในหลอดทดลอง (ตารางภาคผนวก ก 2.2)
2. นำสารละลายมาตรฐาน Quercetin ที่เตรียมไว้มาเติม 5% $NaNO_2$ ปริมาตร 0.3 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
3. เติม 10% $AlCl_3$ ปริมาตร 0.3 ml เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 6 นาที
4. เติม 1 M NaOH ปริมาตร 2 ml (1 Mole = 40 g)
5. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.4 ml เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm และบันทึกผล เพื่อคำนวณหากราฟมาตรฐาน
7. ปิเปตสารสกัดจากใบชะครามความเข้มข้น 1% มา 1 ml และน้ำกลั่น 4 ml ลงในหลอดทดลอง
8. นำสารละลายที่เตรียมไว้ทำตามวิธีในข้อที่ 2, 3, 4 และ 6 ตามลำดับ และบันทึกผลการวิเคราะห์เพื่อคำนวณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ ก 2 และ ก 3)

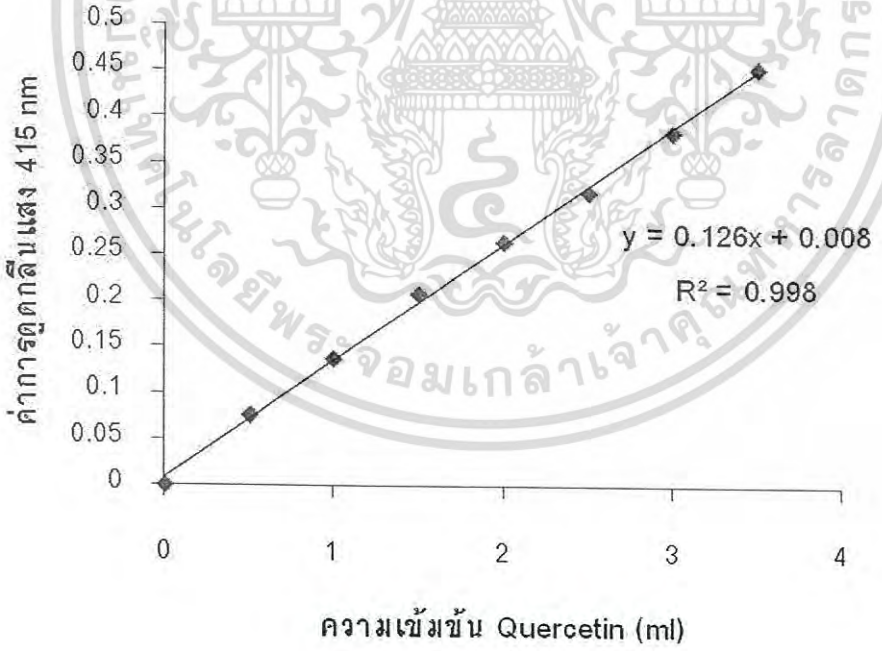
ตารางภาคผนวก ก 2.1 สารละลายมาตรฐาน Quercetin สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยล์ (TFC) ตัวทำละลายน้ำกลั่น

หลอดที่	Quercetin (ml)	น้ำกลั่น (ml)
1	0	10
2	0.5	9.5
3	1	9
4	1.5	8.5
5	2	8
6	2.5	7.5
7	3	7
8	3.5	6.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

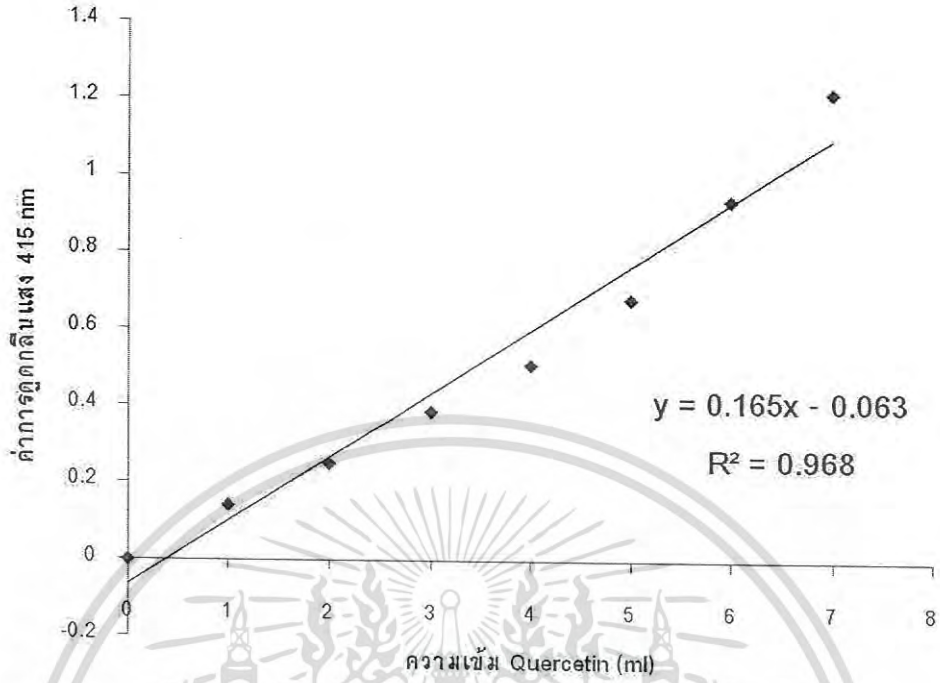
ตารางภาคผนวก ก 2.2 สารละลายมาตรฐาน Quercetin สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยล์ (TPC) ตัวทำละลายเอทานอล 95%

หลอดที่	Quercetin (ml)	Ethanol 95% (ml)
1	0	10
2	1	9
3	2	8
4	3	7
5	4	6
6	5	5
7	6	4
8	7	3



ภาพที่ ก 2 กราฟมาตรฐานวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (TFC) (น้ำกลั่น)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ก 3 กราฟมาตรฐานวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (TFC) (เอทานอล 95%)

ก 3 การวิเคราะห์ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay

การเตรียมสารเคมี

DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ เตรียมจาก DPPH (มวลโมเลกุล 394.32 g/mol) 0.0079 g ปรับปริมาตรด้วย Ethanol ความเข้มข้น 95% (มาจาก Ethanol ความเข้มข้น 100% 95 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 ml) 100 ml

วิธีการ

1. นำสารสกัดจากใบชะครามความเข้มข้น 1% มาเจือจาง 5 เท่า ด้วย Ethanol 95%
2. ปิเปตสารสกัดที่เจือจางแล้วมา 1 ml ส่วนหลอดควบคุมให้ใช้น้ำกลั่น หรือ Ethanol 95% 1 ml (ตามวิธีที่นำตัวทำละลายมาวิเคราะห์) แทนสารสกัดจากใบชะคราม
3. เติม DPPH 2 ml เขย่าให้เข้ากัน และทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 516 nm โดยใช้ น้ำกลั่น หรือ Ethanol 95% เป็น Blank (ตามวิธีที่นำตัวทำละลายมาวิเคราะห์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. บันทึกผลการวิเคราะห์ และคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\text{การกำจัดอนุมูล DPPH (\%)} = \left(\frac{\text{ค่า A ของหลอดควบคุม - ค่า A ของหลอดตัวอย่าง}}{\text{ค่า A ของหลอดควบคุม}}\right) \times 100 \qquad \text{(ก 1)}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

วิธีการทดสอบโดยใช้รีซาซูรินบนไมโครไทเทอร์เพลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดสอบโดยใช้รีซาซูรินบนไมโครไทเทอร์เพลท

เป็นวิธีที่คิดค้นขึ้นโดย Drummond and Waigh ในปี 2000 และถูกนำมาดัดแปลงในงานวิจัยนี้ เพื่อความแม่นยำในการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ โดยใช้วิธีการสกัดหยาบ (Crude Extract) การแยกสารโดยใช้วิธีโครมาโตกราฟ หรือการทำสารประกอบให้บริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการต้านแบคทีเรียในหลายๆ สายพันธุ์วิธีการที่ถูกดัดแปลงขึ้นมานี้เป็นวิธีที่ง่าย ไวต่อการตรวจวัด รวดเร็ว ทนทาน น่าเชื่อถือ และสามารถใช้เพื่อประเมินคุณสมบัติการต้านแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติได้ (Sarker *et al.*, 2007)

96 well plate หลังจากการทำวิธีที่ใช้ resazurin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สีชมพูแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียมีการเติบโต สีน้ำเงินหมายถึงการยับยั้งการเติบโต เชื้อทดลองคือ *Staphylococcus aureus*; C_1 ตัวควบคุมปราศจากเชื้อ(สารทดสอบที่เจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) + broth + น้ำเกลือ + ตัวบ่งชี้ ไม่มีแบคทีเรีย; C_2 ตัวควบคุมที่ปราศจากยา (แบคทีเรีย + broth + ตัวบ่งชี้) ; C_3 ตัวควบคุมบวก (Ciprofloxacin ที่เจือจางเป็นลำดับ +broth + ตัวบ่งชี้+ แบคทีเรีย) ; A-D สารประกอบ/สารสกัดที่ทดสอบ (เจือจางเป็นลำดับในหลุมที่ 1-12+borth + ตัวบ่งชี้ +แบคทีเรีย) ดังภาพที่ ข 1

ภาพที่ ข 1 การทำ MIC ใน 96 well plate ตามวิธีที่ใช้ resazurin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ที่มา : Sarker *et al.* (2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

วิธีการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดบริเวณหาง (caudal blood vessels puncture) โดยเคลือบแฮปพารินในกระบอกฉีดยาเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นแบ่งเลือดปลาใส่ในไมโครฮีมาโตคริต เพื่อใช้วิเคราะห์หาค่าเปอร์เซนต์ฮีมาโตคริต ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว

1. นำเลือดปลาจากกระบอกฉีดยามาใส่ในไมโครฮีมาโตคริต อุดปลายด้านหนึ่งด้วยดินน้ำมันขาว นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ค่าฮีมาโตคริตตามวิธีของ Vazquez and Guerrero (2007)

$$\text{เปอร์เซ็นต์ค่าฮีมาโตคริต} = \frac{(\text{ความยาวชั้นเม็ดเลือดแดงใน microhaematocrit tube} \times 100)}{\text{ความยาวของเลือดทั้งหมดใน microhaematocrit tube}} \quad (\text{ค } 1)$$

2. วิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ตามวิธีของ Vazquez and Guerrero (2007) โดยนำเลือดปลาใน microhaematocrit tube มาถ่ายลงใน diluting pipette ให้ถึงขีด 0.5 เช็ดเลือดที่ปลายออกให้หมด ก่อนจุ่มลงในน้ำยา Yokoyama's white cell fluid จนถึงขีด 101 จะได้เลือดที่มีความเจือจาง 1:200 ใช้นิ้วอุดที่ปลายทั้งสองด้านพลิกไปมาช้าๆ ประมาณ 2 นาที ปล่อยน้ำยาจากปิเปต 2-3 หยดแรกทิ้งเพื่อกำจัดน้ำยาที่ไม่ได้ผสมกับเลือดทิ้ง จากนั้นนำส่วนปลายด้านล่างของปิเปตมาแตะระหว่าง counting chamber และ cover glass นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์หาตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัสตรงกลาง 25 ช่องจากนั้นนับจำนวนเม็ดเลือดแดงใน 5 ช่องโดยใช้กำลังขยาย 40 เท่า ส่วนการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวนับเฉพาะสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ (16 ช่อง) ที่ตำแหน่งมุมทั้ง 4 แล้วนำไปคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\text{จำนวนเม็ดเลือดแดง} = \text{จำนวนเม็ดเลือดที่นับได้ 5 ช่อง} \times 5 \times 10 \times 200$$

$$= \text{_____} \text{ เซลล์/ ลบ.มม.} \quad (\text{ค } 2)$$

$$\text{จำนวนเม็ดเลือดขาว} = \text{จำนวนเม็ดเลือดที่นับได้ 16 ช่อง} \times 10 \times 200$$

$$= \text{_____} \text{ เซลล์/ ลบ.มม.} \quad (\text{ค } 3)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว นำเลือดของปลากะพงขาวมาหยดบนสไลด์แก้วที่ทำความสะอาดแล้ว 1 หยด ใช้สไลด์อีกแผ่น smear เลือดให้แผ่เป็นฟิล์มบางๆ ทิ้งให้แห้ง จากนั้นนำสไลด์เลือดมาจุ่มใน methyl alcohol 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง หยด Wright Stain เป็นเวลา 3 นาที เคาะสีส่วนที่เกินจากสไลด์ออกให้สะอาด จากนั้นหยด buffer pH 6.8 ทิ้งไว้ 5 นาที เคาะ buffer pH 6.8 ทิ้ง และหยดด้วย Giemsa ทิ้งไว้ 15 นาที ล้างสีย้อมด้วยน้ำกลั่นแล้วหยด buffer pH 6.2 นาน 30 วินาที และล้างด้วยน้ำ ทิ้งไว้ให้แห้ง และนำสไลด์ไปจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายอภิชาติ ภาวนา
วัน เดือน ปีเกิด	5 เมษายน พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดชลบุรี
ที่อยู่	301/32 หมู่บ้านรุ่งอรุณ 2 ซอยฉลองกรุง 7 ถ. ฉลองกรุง แขวงลำปลาทิว เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
ประวัติการศึกษา	2546 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประสบการณ์การทำงานและผลงานวิจัย

พ.ศ.2546-2548	พนักงานผลิตลูกกุ้งกุลาดำ มนัสฟาร์ม อ.บ้านโพธิ์ จ.ฉะเชิงเทรา
พ.ศ.2548-2554	ตำแหน่งนักวิชาการ บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน)
พ.ศ.2554-ปัจจุบัน	ตำแหน่งผู้จัดการแผนก บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้