ผลของบัวบก (*Centella asiatica*) ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

นางสาววรรณา ศิริมานะพงษ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาโรคสัตว์น้ำ ภาควิชา อายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6606-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF ASIATIC PENNYWORT (*Centella asiatica*) ON IMMUNE SYSTEM OF THE WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)

Miss Wanna Sirimanapong

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Aquatic Animal Diseases
Department of Veterinary Medicine
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN 974-17-6606-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของบัวบก (*Centella asiatica*) ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว-แวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)
โดย	นางสาววรรณา ศิริมานะพงษ์
สาขาวิชา	โรคสัตว์น้ำ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นนทวิทย์ อารีย์ชน

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. นันทริกา ชันซื่อ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นนทวิทย์ อารีย์ชน)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง รัตนาภรณ์ พรหมาสา)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วรรณา ศิริมานะพงษ์ : ผลของบัวบก (*Centella asiatica*) ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*). [EFFECT OF ASIATIC PENNYWORT (*Centella asiatica)* ON IMMUNE SYSTEM OF THE WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)]
อ.ที่ปรึกษา : รศ.น.สพ.ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, ผศ. ดร. นนทวิทย์ อารีย์ชน. 100 หน้า. ISBN 974-17-6606-8.

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสต์ลาวา 15 (PL15) และระยะตัวเต็มวัย น้ำหนัก 10-15 กรัม โดยให้กุ้งกินอาหารที่ผสมสารสกัดบัวบก (2.52 % w/w ของสาร Asiaticoside) ความเข้มข้น 0, 1, 5 และ10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วนด้วยกันคือ 1. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบด้านความคุ้มโรคต่อเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในลูกกุ้งระยะ PL15 หลังจากให้กินอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบเป็นระยะเวลา 15 และ 30 วัน พบว่าจำนวนกุ้งรอดชีวิตหลังจากจุ่มเชื้อ *Vibrio vulnificus* ความเข้มข้น $1.19x10^{16}$ CFU/ml. (วันที่ 15) และ $5.4x10^{21}$ CFU/ml. (วันที่ 30) เป็นระยะเวลา 3 นาที กุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตรารอดชีวิตของกุ้งสูงที่สุด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 0, 1 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ($P<0.05$) 2. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมระยะตัวเต็มวัย พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดแดงรวมปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด และความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียนของกุ้งที่ได้รับสารสกัดบัวบกความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากการศึกษานี้ควรเลือกใช้สารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ให้ลูกกุ้งกินเพื่อช่วยควบคุมการติดเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในลูกกุ้งได้ ในขณะที่กุ้งตัวเต็มวัยไม่มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต	.....
สาขาวิชา โรคสัตว์น้ำ	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	.....
ปีการศึกษา 2547	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	.....
	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	.....

4575566931 : MAJOR AQUATIC ANIMAL DISEASES

KEY WORD: ASIATICOSIDE / IMMUNITY / WHITE SHRIMP/ ASIATIC PENNYWORT

WANNA SIRIMANAPONG : EFFECT OF ASIATIC PENNYWORT (*Centella asiatica)* ON IMMUNE SYSTEM OF THE WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*). THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF. JIRASAK TANGTRONGPIROS, Ph.D THESIS COADVISOR : ASSOC.PROF. CHAIYO CHAICHANTIPAYUTH, Ph.D ASST.PROF. NONTAWITH AREECHON, Ph.D 100 pp. ISBN 974-17-6606-8.

The objective of this study was to investigate the effects of crude extract of Asiatic pennywort (*Centella asiatica*) in feed on the immune system of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in postlarva15 (PL15) and adult (10-15 g. body weight) The crude extract (with 2.52 % w/w of asiaticoside) was added in feed at the concentrations of 0, 1, 5, and 10 g/kg feed. The experiment was separated into two parts. The first part was to evaluate the survival rate of shrimp fed with experimental diet for 15 and 30 days after three minutes exposure to *Vibrio vulnificus* at the concentrations of $1.19x10^{16}$ CFU/ml (day 15) and $5.4x10^{21}$ CFU/ml (day 30). Shrimp fed with Asiatic pennywort at the concentration of 5 g/kg in the diet had significantly highest survival rate compare to the shrimp fed with the extract at 0, 1 and 10 g/kg diet ($P<0.05$). In the second experiment, the effect of Asiatic pennywort on the immune system of adult shrimp was studied. There was no significant difference of the total haemocyte count, phenoloxidase activity, bactericidal activity and clearance ability of bacteria in all groups of diet ($P>0.05$). In conclusion, the crude extract of Asiatic pennywort at the concentration of 5 g per 1 kg feed could be benefit to control *Vibrio vulnificus* infection in postlarva stage of shrimp, while there was no significant difference among immune parameters in the adult shrimp.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department of Veterinary Medicine	Student's signature ……..
Field of study Aquatic Animal Diseases	Advisor's signature ……..
Academic year 2004	Co-advisor's signature ……..
	Co-advisor's signature ……..

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับความอนุเคราะห์และเกื้อกูลทั้งจากคณาจารย์และบุคลากรหลายท่าน ขอขอบพระคุณ รศ.น.สพ.ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ซึ่งให้ทั้งความรู้ ข้อคิด และสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ตลอดกระบวนการ รศ.ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับสมุนไพรบัวบก และให้ข้อคิดเกี่ยวกับการศึกษาสมุนไพร ผศ.ดร.นนทวิทย์ อารีย์ชน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ทั้งในด้านการทดลองและการเขียนวิทยานิพนธ์

รศ.สพ.ญ.ดร.นันทริกา ชันซื่อ และ รศ.สพ.ญ.รัตนาภรณ์ พรหมาสา ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ.อัจฉรา ธวัชสิน สำหรับคำแนะนำทางด้านสถิติ อาจารย์ น.สพ.พิภพ สดสี สำหรับคำแนะนำในการวางแผนการทดลอง และการเขียนวิทยานิพนธ์ อาจารย์วีณา เคยพุดซา และอาจารย์วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล สำหรับคำแนะนำในการทดลอง

ขอขอบคุณ คุณอมรรัตน์ สินประเสริฐนาวิน คุณนวพรรษ ภาคีพันธุ์ คุณมาลินี กิตกำธร นายพงศกร ชุมเปีย นางสาวมนทิรา ไววานนท์ และคุณกฤษณา นพสุวรรณ์ ที่มีส่วนทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงได้

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และน้อง ๆ ที่เป็นกำลังใจในการทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญภาพ ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

1.5 วิธีการดำเนินการวิจัย 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 แนวคิดและทฤษฎี 4

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.2.1 กุ้งขาวแวนนาไม 4

2.2.2 ลักษณะกุ้งขาวแวนนาไมและถิ่นที่อยู่อาศัย 5

2.2.3 สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม 6

2.2.4 ระบบของอวัยวะต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อของกุ้ง 6

2.2.5 ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง..... 10

2.2.6 บัวบก..... 13

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 20

3.1 การเตรียมสูตรอาหาร..... 20

3.2 การศึกษาผลของสารสกัดบัวบกต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว 21

3.2.1 การทดลองที่ 1 ประสิทธิภาพของบัวบก ด้านความคุ้มโรคต่อเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในลูกกุ้ง 21

หน้า

3.2.2 การทดลองที่ 2 ประสิทธิภาพของบัวบก ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม 22
3.3 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ 27
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล 27

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 28
4.1 ผลการวิเคราะห์อาหารที่ผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ 28
4.2 ผลการทดลองที่ 1 ประสิทธิภาพของบัวบก ด้านความคุ้มโรคต่อเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในลูกกุ้ง 29
4.3 ผลการทดลองที่ 2 ประสิทธิภาพของบัวบก ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว-แวนนาไม 35
4.3.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte count) 35
4.3.2 ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) 37
4.3.3 ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity)..... 39
4.3.4 ผลการเปรียบเทียบ ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte count), ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) และประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) ในวันที่ 10 ของการให้อาหารที่ผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 42
4.3.5 ผลการเปรียบเทียบ ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte count), ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) และประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) ในวันที่ 20 ของการให้อาหารที่ผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 43
4.3.6 ผลการเปรียบเทียบ ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte count), ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) และประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) ในวันที่ 30 ของการให้อาหารที่ผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 44

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.7 ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียนของกุ้งขาวแวนนาไม (Clearance ability of bacteria) …… 45
4.3.8 การรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม ……..…….. 47

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ …….. 49
5.1 สรุปผลการวิจัย …….. 49
5.2 อภิปรายผลการวิจัย …… 51
5.3 ข้อเสนอแนะ …….. 55

รายการอ้างอิง ……. 56

ภาคผนวก …… 62
ภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์หาความว่องไวของเอ็นไซม์ฟีนอล-ออกซิเดส …… 63
ภาคผนวกที่ 2 การเตรียมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant) ……. 67
ภาคผนวกที่ 3 การปรับค่า Osmolarity โดยการใช้ Sodium chloride …… 71
ภาคผนวกที่ 4 บันทึกผลการตรวจคุณภาพน้ำ …… 72
ภาคผนวกที่ 5 บันทึกผลการนับจำนวนกุ้งที่รอดชีวิต …… 74
ภาคผนวกที่ 6 บันทึกผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม ……. 78
ภาคผนวกที่ 7 บันทึกลักษณะกุ้งในการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม …….. 82

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ …….. 88

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงแผนงานวิจัย 3

ตารางที่ 2 การแบ่งสูตรอาหาร 20

ตารางที่ 3 แบ่งกลุ่มการทดลองประสิทธิภาพของบัวบก ด้านความคุ้มโรคต่อเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในลูกกุ้ง..... 21

ตารางที่ 4 แบ่งกลุ่มการทดลองประสิทธิภาพของบัวบก ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว-แวนนาไม 22

ตารางที่ 5 แบ่งกลุ่มการทดลองความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียนของกุ้งขาวแวนนาไม 26

ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์อาหารที่ผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ 28

ตารางที่ 7 ผลของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับการจุ่มเชื้อ *Vibrio vulnificus* ครั้งที่ 1 ค่าเฉลี่ย (Mean ± S.E.) 31

ตารางที่ 8 ผลของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับการจุ่มเชื้อ *Vibrio vulnificus* ครั้งที่ 2 ค่าเฉลี่ย (Mean ± S.E.) 33

ตารางที่ 9 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (เซลล์/มิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน (Mean ± S.E.) 35

ตารางที่ 10 ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg.protein) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา10, 20 และ 30 วัน (Mean ± S.E.) 37

ตารางที่ 11 ค่าการเจือจางต่ำสุดของน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน ที่ทำให้แบคทีเรียลดลงร้อยละ 50 40

หน้า

ตารางที่ 12 จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่พบ เมื่อสิ้นสุดการหาค่าความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน (Mean ± S.E.)..... 40

ตารางที่ 13 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (เซลล์/มิลลิลิตร), ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg. protein) และความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) (CFU/ml.) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10 วัน..... 42

ตารางที่ 14 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (เซลล์/มิลลิลิตร), ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg. protein) และความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) (CFU/ml.) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 20 วัน..... 43

ตารางที่ 15 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (เซลล์/มิลลิลิตร), ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg. protein) และความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) (CFU/ml.) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน..... 44

ตารางที่ 16 ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียน (Clearance ability of bacteria) ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง (Mean ± S.E.)..... 45

ตารางที่ 17 การรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน (Mean ± S.E.)..... 47

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงกลไก proPO activating system ของกุ้งนาง (crayfish) ที่ถูกกระตุ้นโดย β-1,3-glucans ……. 12

รูปที่ 2 แสดงโครงสร้าง Asiaticoside และ Madecassoside …… 14

แผนภูมิแท่งที่ 1 อัตรารอดชีวิตของกุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น ต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 15 วัน หลังจากจุ่มเชื้อ *Vibrio vulnificus* ครั้งที่ 1 เป็นเวลา 7 วัน …….. 32

แผนภูมิแท่งที่ 2 อัตรารอดชีวิตของกุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น ต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน หลังจากจุ่มเชื้อ *Vibrio vulnificus* ครั้งที่ 2 เป็นเวลา 7 วัน …….. 34

แผนภูมิแท่งที่ 3 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (เซลล์/มิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน …….. 36

แผนภูมิแท่งที่ 4 ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg.protein) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน …….. 38

แผนภูมิแท่งที่ 5 จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่พบ เมื่อสิ้นสุดการหาค่าความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน …… 41

แผนภูมิแท่งที่ 6 ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียน (Clearance ability of bacteria) ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง …… 46

แผนภูมิแท่งที่ 7 การรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน ……. 48

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กุ้งทะเล เป็นอาหารที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากเป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพสูงและมีรสชาติดีสามารถนำไปประกอบอาหารได้หลากหลาย ผลผลิตส่วนใหญ่มาจากการเพาะเลี้ยง ในรอบ 10 ปีที่ผ่านมานี้ พบว่า 84% ของผลผลิตกุ้งทั่วโลก ประมาณ 814,250 เมตริกตันมาจากการเพาะเลี้ยง (ประจวบ, 2543) ปัจจุบันการผลิตกุ้งในโลกได้มาจาก 6 ชนิดหลัก คือกุ้งกุลาดำ *(Penaeus monodon)* 65% กุ้งขาวแวนนาไม *(Litopenaeus vannamei)* 14% กุ้งแชบ๊วย *(Penaeus merguiensis)* 1% กุ้งน้ำตาลออสเตรเลีย *(Metapenaeis endeavovre)* 2% และ *Penaeus* spp.อื่นๆ 7% เช่น กุ้งขาวจีน *(Penaeus chinensis)* *Metapenaeus* spp. 4% (อาทินันท์, 2546)

กุ้งขาวแวนนาไม *(Litopenaeus vannamei)* เป็นสายพันธุ์กุ้งทะเลที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา ประเทศเม็กซิโก ประเทศกัวเตมาลา ประเทศนิคารากัว ประเทศคอสตาริกา ประเทศปานามา ประเทศโคลัมเบีย ประเทศเอควาดอร์ และประเทศเปรู ซึ่งกุ้งสายพันธุ์นี้มีความแข็งแรงและทนทานมาก จึงมีการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติอย่างแพร่หลาย ในแถบแนวชายฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก ตั้งแต่ประเทศเม็กซิโกถึงประเทศเปรู เนื่องจากภูมิภาคในแถบนี้มีระดับความลึกจากเส้นแนวชายฝั่งลงไปประมาณ 72 เมตร หรือ 235 ฟุต มีพื้นท้องทะเลเป็นเหมือนโคลนจึงเหมาะสมแก่การเจริญเติบโต และยังเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ ประเทศเอควาดอร์เป็นประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ที่มีฟาร์มเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ และลูกกุ้ง (กมลศิริ, 2546)

ประเทศไทยเริ่มนำเข้ากุ้งขาวแวนนาไมมาเลี้ยงในปี พ.ศ. 2541 ซึ่งเป็นช่วงแรกของการทดลองเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม จึงไม่ค่อยประสบความสำเร็จและไม่ได้รับความสนใจเท่าที่ควร ประกอบกับการจัดหาพันธุ์กุ้งขณะนั้นมีความยากลำบากและมีราคาแพง แต่ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งกุลาดำประสบปัญหา เช่น โรคระบาด ขาดแคลน พ่อแม่พันธุ์กุ้งที่มีคุณภาพดี และปัญหาที่สำคัญ คือ กุ้งกุลาดำแคระแกรนเลี้ยงไม่โต ผู้เลี้ยงกุ้งจึงหันมาเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมกันมากขึ้น

ในอดีตนั้น คนไทยนิยมใช้สมุนไพรไทยในการป้องกัน และรักษาโรคของมนุษย์เอง และสัตว์เลี้ยงเช่นการใช้ผลสดของมะเกลือ ในการถ่ายพยาธิตัวตืด พยาธิไส้เดือน พยาธิปากขอ พยาธิ

เข็มหมุด ในคนและสัตว์มาช้านาน เมื่อเวชภัณฑ์สมัยใหม่เข้ามามีบทบาทต่อความเป็นอยู่ของคนมากขึ้น การใช้สมุนไพรจึงถูกละเลยไป อย่างไรก็ดี ในปัจจุบันมนุษย์เริ่มใส่ใจในสุขภาพ และสิ่งที่บริโภคมากขึ้น ความนิยมในการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเพิ่มขึ้นอย่างมาก สมุนไพรจึงถูกนำกลับมาใช้ โดยมีการศึกษาค้นคว้าส่วนประกอบ และผลที่ได้รับจากการใช้สมุนไพรเหล่านี้อย่างแพร่หลาย (สุดสรร, 2547) เช่น การศึกษาผลของกวาวเครือขาวต่อระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงและผลผลิตไข่ในไก่ไข่ (ประภัสรา และคณะ, 2547), การศึกษาและพัฒนาการผลิตและการใช้สมุนไพรกระเทียม ฟ้าทะลายโจร และขมิ้นชันทดแทนสารต้านจุลชีพและสารสังเคราะห์เติมอาหารไก่และสุกร (สาโรช และคณะ, 2547), ผลของข่าผงต่อระดับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่เนื้อ (บงกช และคณะ,2547), การใช้สมุนไพรแทนนินสูง (ใบชา) ต่อสมรรถภาพการผลิตไข่ของนกกระทาญี่ปุ่น (อรทัย และคณะ,2547), ฤทธิ์ของข่าต่อการยับยั้งเชื้อโรคจากทางเดินอาหารของสุกร (ศิริพร และคณะ, 2547), การใช้ขมิ้นชันเป็นสารต้านออกซิเดชั่นต่อสถานภาพภูมิคุ้มกันและสมรรถภาพ การเจริญเติบโตของไก่เนื้อซึ่งอยู่ในภาวะเครียด (ชัยวัฒน์ และคณะ, 2547) และผลของบัวบกต่อ คุณลักษณะการเจริญเติบโต ปริมาณเอ็นไซม์จากเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็ก (ขุนพล และคณะ, 2547)

พืชสมุนไพรที่นิยม เช่น ฟ้าทะลายโจร ขมิ้นชัน และกระเทียม ฯลฯ บัวบกเป็นพืชสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่คนรู้จักสรรพคุณ และใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ มาตั้งแต่สมัยโบราณ นิยมใช้เป็น ยาพอก สำหรับแผลไฟไหม้ ฟกช้ำ บวมอักเสบ ห้ามเลือด แผลสด แผลเรื้อรัง แก้อาการปวดศีรษะข้างเดียว ลดความดัน และบรรเทาอาการปวดประจำเดือน (พเยาว์, 2534) และรู้จักกันอย่างแพร่หลายในรูปของเครื่องดื่มบำรุงร่างกายซึ่งใช้ในการแก้ร้อนใน กระหายน้ำ แก้ไข้ตัวร้อน รักษาอาการเจ็บคอ ขับปัสสาวะ (เสงี่ยม, 2518) มีส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญคือ asiaticoside และ madecassoside (Tyler, 1993)

สารประกอบที่พบว่ามีปริมาณมากคือ asiaticoside (สุชาดา และ ชัยโย, 2541) มีรายงานการใช้สารสกัดบัวบกโดยให้หนู (mice) กินขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ (Farnsworth และ Bunyapraphatsara ,1992) จนถึงปัจจุบันนี้ ยังมีข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของบัวบกไม่มากนัก โดยเฉพาะการใช้สัตว์ทดลองที่เป็นสัตว์น้ำ จึงมีแนวคิดในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของบัวบกเกี่ยวกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำเศรษฐกิจ โดยเฉพาะสัตว์จำพวกกุ้ง เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นของพืชสมุนไพรพื้นบ้านนำมาประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ เป็นการใช้ทรัพยากรภายในประเทศให้คุ้มค่า หลีกเลี่ยงการตกค้างของการใช้ยาหรือสารเคมีในการผลิตสัตว์ และพัฒนาการเลี้ยงสัตว์ในระบบชีวภาพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาผลสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ asiaticoside ที่มีต่อภูมิคุ้มกันและสุขภาพของกุ้งขาว-แวนนาไม เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมให้มีปริมาณและคุณภาพดีขึ้น

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ asiaticoside ที่มีผลต่อภูมิคุ้มกันและสุขภาพของกุ้งขาวแวนนาไม โดยทำการศึกษากุ้งขาวแวนนาไมเป็น 2 ระยะ คือ ระยะ Postlarvae 15 และระยะตัวเต็มวัย น้ำหนัก 10-15 กรัม เป็นระยะเวลา 1 เดือน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการใช้สมุนไพรเลี้ยงกุ้ง และพัฒนาการเลี้ยงกุ้งขาว-แวนนาไมให้ได้ผลผลิตที่ดีมีคุณภาพ

1.4.2 เพิ่มมูลค่าเพิ่มให้แก่ทรัพยากรในการพัฒนาการเลี้ยงสัตว์

1.4.3 เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาสมุนไพรที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว-แวนนาไม และใช้เป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคต

1.5 วิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาเป็นเวลาประมาณ 12 เดือน เริ่มตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2547 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2548 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงแผนงานวิจัย

แผนการดำเนินงาน	พ.ศ. 2547												พ.ศ. 2548		
	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.
	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4
1. ทบทวนเอกสาร												
2. ดำเนินการศึกษาล่วงหน้า												
3. นำเสนอโครงร่างงานวิจัย												
4. ดำเนินการศึกษา												
5. เก็บรวบรวมผลการศึกษา												
6. วิเคราะห์และแปลผล												
7. เขียนวิทยานิพนธ์												

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

ในสัตว์มีกระดูกสันหลังจะมีขบวนการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันโดยการทำงานของ antibodies, opsonins, lymphocytes และ macrophages ส่วนสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจะมีเพียงโปรตีนบางชนิดและเซลล์เท่านั้นที่เป็นส่วนประกอบในระบบการป้องกันโรค แต่สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจะมีกลไกที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน สามารถจดจำและทำลายสิ่งแปลกปลอมที่ผ่านเข้ามาได้ด้วยขบวนการ coagulation, phagocytosis, encapsulation, nodule formation และ melanisation (Johansson *et al*., 2000) สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังตามอนุกรมวิธาน ได้แก่ สัตว์จำพวกมีขาเป็นข้อ เช่น แมลง พวกมีตัวเป็นหนาม เช่น ปลาดาว หอยเม่น พวกที่มีแกนลำตัว เช่น เพรียงหัวหอม พวกลำตัวอ่อนนิ่ม เช่น แมงกะพรุน หนอนตัวแบน หนอนตัวกลม พวกมีเปลือกแข็งห่อหุ้ม เช่น ปู และกุ้ง ฯลฯ (Arms และ Camp, 1991)

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2.1 กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

กุ้งขาวแวนนาไม เป็นสายพันธุ์กุ้งทะเลในกลุ่มกุ้งขาวแปซิฟิก กุ้งขาวแวนนาไม ถูกค้นพบโดย Boome ในปี ค.ศ. 1931 มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Litopenaeus vannamei* ชื่อสามัญที่องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) รับรองและใช้เรียกกันทั่วโลกคือ Whiteleg shrimp กุ้งขาวที่ทำการเพาะเลี้ยงกันอยู่ในปัจจุบันนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามสภาพภูมิศาสตร์ของโลก ได้แก่ 1. กุ้งขาวตะวันตก (Western coast white shrimp) ได้แก่ กุ้งขาวแวนนาไม *(Litopenaeus vannamei)* และ กุ้งสีน้ำเงิน *(Penaeus stylirostris)* 2. กุ้งขาวตะวันออก (Eastern coast white shrimp) ได้แก่ กุ้งแชบ๊วย *(Penaeus merguiensis)*, กุ้งขาวจีน *(Penaeus chinensis* หรือ *Penaeus orientalis)* และกุ้งขาวอินเดีย *(Penaeus indicus)* (อาทินันท์, 2546)

อนุกรมวิธานของกุ้งขาวแวนนาไม ดังนี้

Kingdom : Animalia

Phylum : Arthropoda

Class : Crustacean

Subclass : Malacostraca

Superorder : Eucarid Ecarida

Order : Decapoda

Suborder : Eucarida

Section : Penacidea

Family : Penaeidae

Genus : Penaeus Litopenaeus

Subgenus : Penacus Litopenacus

Species : Vannamei

2.2.2 ลักษณะกุ้งขาวแวนนาไมและถิ่นที่อยู่อาศัย

ลักษณะเฉพาะตัวของกุ้งขาวแวนนาไม ลำตัวสีขาวมี 8 ปล้อง หน้าอกใหญ่ การเคลื่อนไหวรวดเร็ว ส่วนหัวมี 1 ปล้อง มีกรีอยู่ในระดับยาวประมาณ 0.8 เท่าของความยาวปล้องลำตัว หัวสันกรีสูง ปลายกรีแคบ ส่วนของกรีมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมสีแดงอมน้ำตาล กรีด้านบนมี 8 หยัก กรีด้านล่างมี 2 หยัก ร่องบนกรีเห็นได้ชัด เปลือกหัวสีขาวอมชมพู ขาเดินมีสีขาว ขาว่ายน้ำมี 5 คู่ ปลายขาสีแดง ส่วนหางมี 1 ปล้อง ปลายหางมีสีแดงเข้ม แพนหางมี 4 ใบ และมีกรีหางอยู่ด้านบน ขนาดตัวที่สมบูรณ์เต็มที่ของกุ้งสายพันธุ์นี้จะมีขนาดที่เล็กกว่ากุ้งกุลาดำ (กมลศิริ, 2546) โดยความยาวจากกรีหัวถึงปลายกรีหางประมาณ 230 มิลลิเมตร ความยาวจากโคนหัวถึงปลายกรีหัวประมาณ 65 มิลลิเมตร ความยาวจากโคนหัวถึงปลายกรีหางประมาณ 165 มิลลิเมตร เส้นรอบวงหัวประมาณ 94 มิลลิเมตร เส้นรอบวงตัวประมาณ 98 มิลลิเมตร แพนหางยาวประมาณ 35 มิลลิเมตร ระยะห่างของตาประมาณ 2 มิลลิเมตร น้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 120 กรัม หากินทุกระดับความลึกของน้ำ ลอกคราบทุกๆ สัปดาห์ และไม่ชอบหมกตัวตามพื้นดิน (อาทินันท์, 2546) กุ้งขาวแวนนาไม *(Litopenaeus vannamei)* เป็นสายพันธุ์กุ้งทะเลที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา ประเทศเม็กซิโก ประเทศกัวเตมาลา ประเทศนิคารากัว ประเทศคอสตาริกา ประเทศปานามา ประเทศโคลัมเบีย ประเทศเอควาดอร์ และ

ประเทศเปรู ซึ่งกุ้งสายพันธุ์นี้มีความแข็งแรงและทนทานมาก จึงมีการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติอย่างแพร่หลาย ในแถบแนวชายฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก ตั้งแต่ประเทศเม็กซิโกถึงประเทศเปรู เนื่องจากภูมิภาคในแถบนี้มีระดับความลึกจากเส้นแนวชายฝั่งลงไปประมาณ 72 เมตร หรือ 235 ฟุต มีพื้นท้องทะเลเป็นเหมือนโคลนจึงเหมาะสมแก่การเจริญเติบโต และยังเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ ประเทศเอควาดอร์เป็นประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ที่มีฟาร์มเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ และลูกกุ้ง (กมลศิริ, 2546)

2.2.3 สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งที่เลี้ยงได้ทั้งระบบธรรมชาติ ระบบกึ่งหนาแน่น และระบบหนาแน่น โดยลักษณะพิเศษของกุ้งสายพันธุ์นี้คือ สร้างความคุ้นเคยหรือปรับลักษณะนิสัยภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงได้ง่าย สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในน้ำที่มีระดับความเค็ม 5-35 ppt และความเค็มต่ำ 0-5 ppt แต่ระดับความเค็มที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีคือ 10-22 ppt จึงสามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในบริเวณพื้นที่ชายฝั่งหรือพื้นที่ที่มีความเค็มต่ำ ส่วนอุณหภูมิของน้ำที่เจริญเติบโตได้ดีคือ 26-29 ^{o}C แต่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ในช่วงอุณหภูมิ 25-35 ^{o}C ระดับออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (D.O.) ควรมีค่า 4-9 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนค่าความเป็นกรดและด่าง (pH) ควรอยู่ระหว่าง 7.2-8.6 กุ้งชนิดนี้ชอบน้ำที่มีความกระด้างรวมประมาณ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าอัลคาไลน์ในช่วง 80-150 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะเดียวกันกุ้งชนิดนี้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงและตื่นตกใจง่าย (กมลศิริ, 2546)

2.2.4 ระบบของอวัยวะต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อของกุ้ง (ยอดยิ่ง, 2540)

ระบบห่อหุ้มร่างกาย (Integumentary system)

กุ้งมีส่วนห่อหุ้มร่างกายคือ เปลือก ซึ่งเป็นของแข็งชั้นของเซลล์ที่ปกคลุมเนื้อเยื่อและอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เรียกว่า “Epidermis” ซึ่งอยู่ที่ใต้เปลือก เปลือกแบ่งออกเป็น 4 ชั้น คือ

1. ชั้นนอกสุด (Epicuticle) ประกอบด้วยสารประเภท ไขมัน โปรตีน และหินปูนพวกแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

2. ชั้นที่สอง (Exocuticle) ประกอบด้วยสารไคติน (Chitin) โปรตีน แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) รงค์วัตถุเมลานิน (Melanin) และคาโรตินอยด์ (Carotinoid) มีลักษณะเป็นชั้นบาง ๆ หลายชั้นเรียงซ้อนกัน

3. ชั้นที่สาม (Endocuticle) เป็นชั้นที่หนาที่สุด มีลักษณะและส่วนประกอบคล้ายชั้นที่สองแต่มี รงค์วัตถุเมลานิน และคาโรตินอยด์ น้อยกว่า ความหนาของชั้นนี้จะไม่เท่ากันในส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย

4. ชั้นในสุดท้าย หรือชั้นที่สี่ (Membranous layer or uncalcified layer) มีโปรตีน และไคติน เป็นส่วนประกอบ เป็นชั้นที่บางมากใต้ชั้น endocuticle

ระบบหมุนเวียนของเลือด (Circulatory system)

ระบบหมุนเวียนของเลือดกุ้งเป็นแบบระบบเปิด (Open system) เมื่อหัวใจบีบตัวเลือดดีจะออกจากหัวใจไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายโดยมีลิ้น (Valve) ปิดกั้นไม่ให้เลือดไหลกลับ เมื่อเลือดถูกส่งไปทั่วร่างกาย และเลือดซึ่งขาดออกซิเจน (O_2) จะไหลกลับลงสู่แอ่งเลือดต่าง ๆ ทั่วร่างกาย และไหลผ่านเข้ายังบริเวณเหงือกที่รับ O_2ใหม่เข้ามา เลือดที่มี O_2 แล้ว (Oxygenated blood) จะออกจากเหงือกผ่านเส้นเลือดดีไปเข้าแอ่งเลือดรอบหัวใจ (Pericardium) แล้วเข้าสู่หัวใจ

ในน้ำเลือด (Haemolymph) ของกุ้งจะมีโปรตีนอยู่ประมาณ 80 – 95 % และมีไขมัน (Lipid) เล็กน้อย

ฮีโมไซยานิน (Haemocyanin) เป็นไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) ที่มีทองแดงเป็นส่วนประกอบปนอยู่ในน้ำเลือด มีหน้าที่แลกเปลี่ยนก๊าซ พวกที่มี O_2 จะเป็นสีฟ้า (เลือดดี) พวกที่ไม่มี O_2 (reduced form) จะไม่มีสี

เม็ดเลือด (Blood cell) เม็ดเลือดของกุ้งไม่ได้ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนก๊าซ เนื่องจากฮีโมไซยานิน ซึ่งเป็นตัวทำปฏิกิริยากับ O_2 ไม่ได้อยู่ในเม็ดเลือด แต่อยู่ในน้ำเลือด กุ้งมีหน้าที่ กำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยวิธี Phagocytosis, Encapsulation, Coaggulation นั่นคือ เม็ดเลือดของกุ้งที่จะหน้าที่คล้ายเม็ดเลือดขาวของสัตว์มีกระดูกสันหลัง

เม็ดเลือดกุ้งแบ่งออกเป็น 3 ชนิดคือ

1. Hyalinocyte หรือ Agranulocyte เป็นเม็ดเลือดขนาดเล็กที่สุด และพบมากที่สุด ไม่มีกรานูล (Granule) ในไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) มีนิวเคลียสใหญ่ และไซโตพลาสซึมน้อย

2. Intermediate granulocyte หรือ Semi-granulocyte เป็นเม็ดเลือดที่มีกรานูลขนาดเล็กและไม่เท่ากัน นิวเคลียสกลมหรือรูปไข่ อยู่กลางเซลล์ นิวเคลียสเล็กกว่า Agranulocyte มีรูปร่างหลายแบบ

3. Granulocyte หรือ Eosinogranulocyte เป็นเม็ดเลือดขนาดใหญ่ มีรูปร่างหลายแบบ นิวเคลียสมีลักษณะคล้ายเมล็ดถั่ว (Kidney or bean shape) อยู่กลางเซลล์ มีกรานูลขนาดใหญ่และสม่ำเสมอ นิวเคลียสมีขนาดเล็กกว่า Agranulocyte และ Semi-granulocyte

อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (Haematopietic tissue) พบอยู่ในที่ต่าง ๆ กันคือ

1. รอบ ๆ lateral artery ซึ่งอยู่ใต้กรีทั้ง 2 เส้น

2. ด้านบนกระเพาะอาหารส่วนหน้า (Cardiac stomach) รวมทั้งในตับอ่อน (Hepatopancreas) ซึ่งเรียกว่า Epigastric haematopietic tissue)

3. ใน Maxillaped คู่ที่ 1 และ 2

4. ด้านหลังสมอง

อวัยวะสร้างเม็ดเลือดดังกล่าวมีลักษณะเป็นพูกลมหรือยาวรี และมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) ห่อหุ้มอยู่ โดยเชื่อมแต่ละพูเข้าด้วยกัน ระหว่างพูจะมีแอ่งเลือดเล็ก ๆ ทำหน้าที่ผลิตเม็ดเลือด โดยเม็ดเลือดมีการพัฒนาที่กลางพูก่อน แล้วจึงเคลื่อนออกจากพูข้างแอ่งเลือดที่อยู่รอบ ๆ จากนั้นจึงเข้าสู่ระบบหมุนเวียนของเลือด

Oka organ หรือ Lymphoid organ เป็นอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการสร้างระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system) มีอยู่ 1 คู่ มีลักษณะเป็นท่อจำนวนมากรวมเป็นกลุ่มรอบ ๆ เส้นเลือด Subgastric artery) ที่แตกแขนงมาจาก Anterior aorta ทั้งสองเส้นบริเวณส่วนหน้าหัวใจเล็กน้อย ในบริเวณนี้จะมีแอ่งเลือดเล็ก ๆ แทรกอยู่ทั่วไป เมื่อทำการผ่าตัดกุ้ง จะเห็นเป็นก้อนใส ๆ 2 ก้อน อยู่ข้างหน้าตับและตับอ่อน

ระบบหายใจ (Respiratory system)

กุ้งวัยอ่อนสามารถหายใจ หรือแลกเปลี่ยนก๊าซ ได้ทางผิวนอกที่ปกคลุมตัว (Integumentary respiration) แต่เมื่อมันเติบโตขึ้นจะหายใจทางเหงือก (Gill) ซึ่งจะมีการแลกเปลี่ยนก๊าซ และควบคุม Osmoregulation ของน้ำรอบ ๆ ตัว กับของเหลวภายในตัวด้วย

เหงือกกุ้ง เป็นแบบ Dendrobranchiate ประกอบด้วย

1. Central axis 2. Primary gill 3. First and secondary gill filament โดยที่ secondary gill filament ถูกปกคลุมด้วย cuticle 3 ชั้น คือ Epicuticle, Exocuticle และ Endocuticle เหมือนกับเปลือกกุ้ง Cuticle ทั้ง 3 ชั้นนี้จะมีช่องเล็ก ๆ (pore canal) ทะลุผ่านถึงกันได้ ใต้ cuticle จะเป็นชั้นของเซลล์เยื่อบุผิว (Epithelium) บาง ๆ เรียงตัวกันอยู่ชั้นเดียว ตรงนี้คือจุดที่แบคทีเรียและสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กสามารถเจาะผ่านเข้าไปได้ ภายในเหงือกทั้ง 3 ส่วน จะพบเม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด ถูกสร้างขึ้นมาโดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณ secondary และ primary gill filament เม็ดเลือดเหล่านี้จะทำการดักจับแบคทีเรียที่เข้ามาทาง pore canal และทำลายด้วยขบวนการ Encapsulation และ Phagocytosis

ระบบย่อยอาหาร (Digestive system)

ท่อทางเดินอาหารของกุ้ง (Alimentary canal) แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ

1. ส่วนต้น (Foregut) ประกอบด้วย ปาก หลอดอาหาร และกระเพาะอาหารซึ่งอยู่ต่อมาจากหลอดอาหารไปจนถึงบริเวณกึ่งกลางของตับและตับอ่อน มีลักษณะคล้ายตัว U หรือ J (U or J shape)

2. ส่วนกลาง (Midgut) ประกอบด้วย ลำไส้ Anterior midgut caeca และ Posterior midgut caeca

- ลำไส้ (Intestine) เป็นส่วนที่ทำหน้าที่ดูดซึมอาหาร เป็นท่อยาวต่อจากกระเพาะอาหารผ่านตับและตับอ่อนไปยังด้านท้ายของลำตัว ลำไส้จะอยู่ใต้เส้นเลือด (Posterior aorta) ไปตลอดความยาวจนถึงปลายปล้องที่ 5

- Anterior midgut caeca อยู่ต่อจากกระเพาะอาหารส่วนท้ายมีลักษณะเป็นขดม้วนเป็นก้อนยื่นออกไปด้านบนของกระเพาะอาหารส่วนท้าย บริเวณหน้าตับและตับ

- Posterior midgut caeca อยู่ทางตอนท้ายของตัวกุ้งระหว่างปล้องที่ 5 และ 6 เป็นส่วนที่ขดงอขึ้นไปด้านบน

3. ส่วนท้าย (Hindgut) เป็นส่วนที่ต่อจาก Posterior midgut caeca ไปจนถึง anus

ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas, midgut gland และ digestive diverticular) มีลักษณะเป็นพูขนาดใหญ่ 2 พู อยู่ในช่องว่างของส่วนหัว บริเวณด้านหลังของกระเพาะอาหาร โดยมีลำไส้ลอดผ่านกลางไปออกทางด้านท้ายของตับและตับอ่อน มีช่องติดต่อกับกระเพาะอาหาร ส่วนท้ายที่บริเวณรอยต่อของกระเพาะอาหารกับลำไส้ อาหารที่ย่อยละเอียดจากกระเพาะอาหารจะผ่านทางช่องนี้เข้า Primary duct ของตับและตับอ่อนซึ่งอยู่รอบลำไส้ Primary duct จะแยกเป็น Secondary duct หรือ Diverticular จำนวนมาก ลักษณะเป็นท่อยาว ซึ่งมีปลายตัน (Blind=ending duct) แบ่งเป็น 4 ส่วน คือ

1. ส่วนปลาย (Apical region)
2. ส่วนกลาง (Media region)
3. ส่วนต้น (Proximal region)
4. บริเวณเริ่มต้นของท่อ (Origin region)

ท่อตับและตับอ่อนแต่ละท่อ มีแอ่งเลือดแทรกอยู่ระหว่างท่อ ในแต่ละท่อพบเซลล์บุผนังท่อ 4 ชนิด คือ

1. E-cell (Embryonic cell) เป็นเซลล์ขนาดเล็กที่สุด และไม่พัฒนา พบอยู่บริเวณส่วนของปลายท่อมักพบกำลังแบ่งเซลล์อยู่ด้วย

2. F-cell (Fibrillar หรือ Dark cell) มีรูปร่างคล้ายหยดน้ำ พบกระจายอยู่เกือบตลอดความยาวของท่อ แต่ที่ปลายท่อจะพบร่วมกับ R-cell และ B-cell มีหน้าที่สังเคราะห์และหลั่งเอ็นไซม์ที่ใช้ในการย่อยอาหาร

3. R-cell (Resorption cell หรือ Light cell) เป็นเซลล์รูปร่างสี่เหลี่ยมทรงสูงมีไขมันมากสะสมอยู่ในไซโตพลาสซึม พบหนาแน่นบริเวณจุดเริ่มต้นของท่อ (Origin region) เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ดูดซึมและสะสมอาหารประเภทไขมัน

4. B-cell (Blister-like cell หรือ Vacuolated cell) เป็นเซลล์ที่มี Vacuole อยู่ เชื่อว่าเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ และหลั่งเอ็นไซม์

ในกุ้งที่แข็งแรงจะพบ R-cell มากที่สุด เนื่องจากเป็นเซลล์ขนาดใหญ่และมีไขมันในไซโตพลาสซึมมาก ทำให้ Lumen แคบลง B-cell จะพบค่อนข้างน้อยและไม่พบตรงจุดเริ่มต้นของท่อ ส่วน F-cell พบกระจายเกือบตลอดความยาวของท่อ

กุ้งไม่สมบูรณ์ R-cell จะมีขนาดเล็กลง เนื่องจากมีไขมันในเซลล์น้อยลง Lumen จะมีขนาดใหญ่ขึ้น B-cell มีจำนวนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและจะพบที่จุดเริ่มต้นของท่อด้วย ส่วน F-cell ไม่เปลี่ยนแปลง ถ้ากุ้งอดอาหารนานเข้าจะไม่พบไขมันใน R-cell F-cell มีขนาดเล็กลงขณะที่ B-cell จะพบมากที่สุด

2.2.5 ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

ระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system) เป็นระบบที่ช่วยป้องกันเชื้อโรค และสิ่งแปลกปลอมแต่ละชนิด โดยมีความจำและสามารถจำแนกชนิดของสารแปลกปลอม ความสำคัญของ Immunity คือ ทำให้สุขภาพดีสามารถต่อต้านโรคหรือสารที่มีพิษ (Toxins) ซึ่งเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ และสิ่งแวดล้อมได้ (ยอดยิ่ง, 2540)

การป้องกันหรือต่อต้านเชื้อโดยระบบภูมิคุ้มกัน สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. Humoral immunity เป็นขบวนการป้องกันสิ่งแปลกปลอม โดยการใช้ขบวนการดังนี้ (Smith และ Chrisholm, 1992)

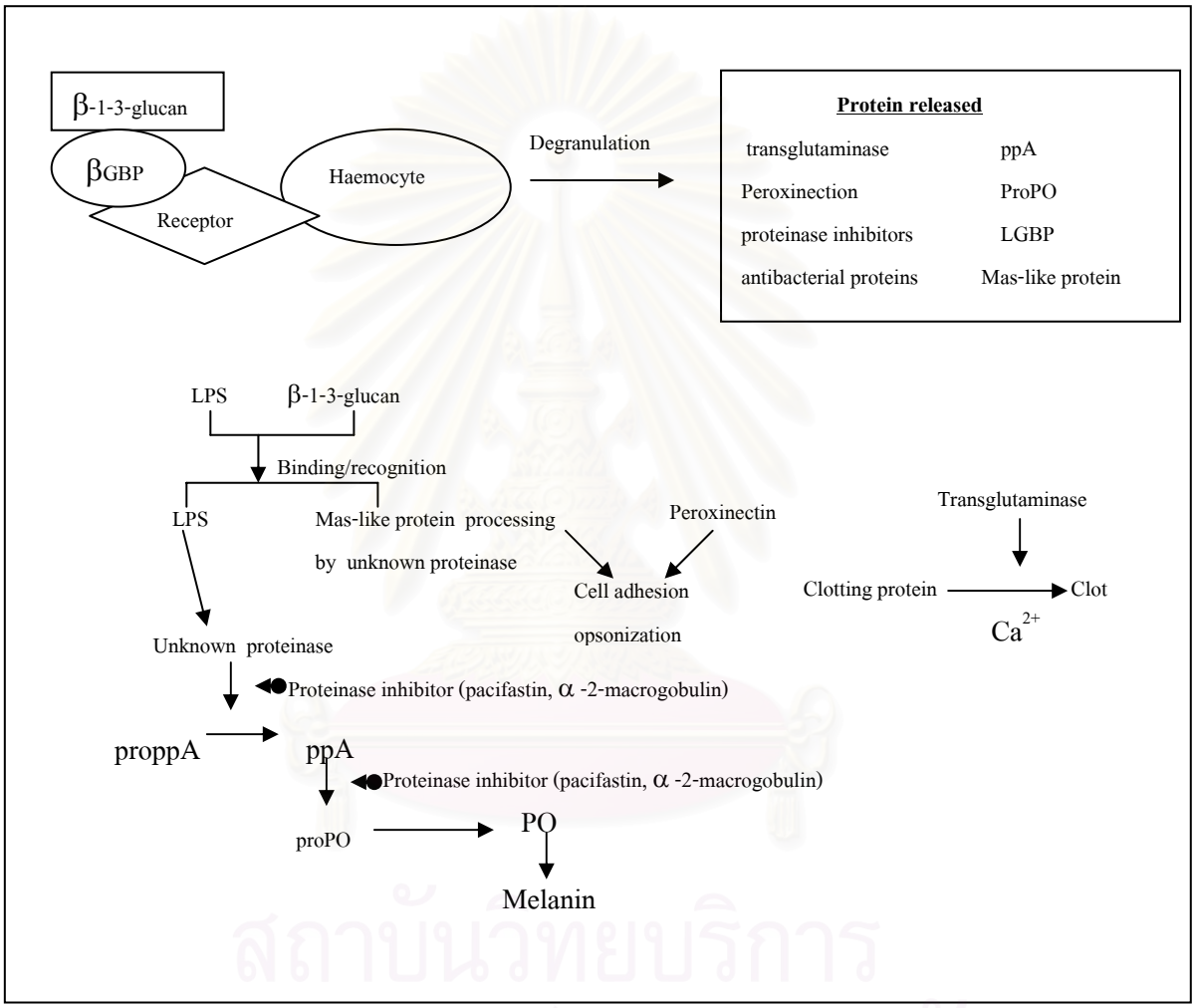
- ขบวนการ Prophenoloxidase (proPO) activating system => ส่งผลให้เกิด Cascade Reaction
- ขบวนการ Coagulogen Clotting System => ส่งผลให้เกิด Clotting
- ขบวนการ Natural Agglutinin => ส่งผลให้เกิด Opsonization
- ขบวนการ Cytokine-like Factors => ส่งผลให้เกิด Phagocytosis และ Cell Aggregation

2. Cellular immunity เป็นการป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยการใช้เซลล์เม็ดเลือดผ่านขบวนการ Phagocytosis และ ขบวนการ Degranulation (Bodhipaksha, 1994)

ขบวนการ Prophenoloxidase (proPO) activating system

สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจะมีเม็ดเลือด (haemocytes) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับโปรตีนที่เรียกว่า Prophenoloxidase (proPO) เป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มีส่วนร่วมทั้งในขบวนการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง และขบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอม (Cheng และ Chen, 2002) ซึ่งเกี่ยวข้องในขบวนการกระตุ้นการผลิตเมลานิน (melanisation) กระตุ้นขบวนการเกาะของเซลล์กับสิ่งแปลกปลอม (cell adhesion) กระตุ้นขบวนการสร้างถุงหุ้มล้อมรอบสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) และทำให้เกิดขบวนการเก็บกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (phagocytosis) (Lee และ Soderhall, 2002) ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จำพวกแมลงสามารถพบ proPO ได้ในเม็ดเลือด และพลาสมา (plasma) หรือมีส่วนน้อยใน น้ำเลือด (haemolymph) (Hernandez-Lopez *et al*., 2003) Brivio และคณะ (1992) พบว่าแมลงจะมีพลาสมา ที่เป็นแหล่งสำคัญในการแยก proPO ส่วนในสัตว์จำพวกมีเปลือกแข็งห่อหุ้ม (crustaceans) เช่น กุ้งจะพบ proPO ที่อยู่ในเม็ดเลือด เป็นส่วนใหญ่ (Gollas-Galvan *et al*., 1997) โดย proPO activating system สามารถกระตุ้นได้จากส่วนประกอบของ จุลินทรีย์ เช่น lipopolysaccharides (LPS) หรือ peptidoglycans และ β-1,3-glucans นอกจากนี้ขบวนการ proPO activating system สามารถกระตุ้นได้จากเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการทำลายและเก็บกินสิ่งแปลกปลอม (Cheng และ Chen, 2002) กลไกนี้จะมีเอ็นไซม์เป็นลำดับขั้น (proteinases cascade) โดยเริ่มต้นจากการถูกกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอม เหนี่ยวนำให้มีการเสื่อมสลายของเซลล์เม็ดเลือด แล้วส่งผลให้มีการปลดปล่อยโปรตีนภายในเม็ดเลือดออกมาหลายชนิด เช่น proPO, ppA (prophenoloxidase activating enzyme หรือที่เรียกว่า trypsin–like serine proteinase), peroxinectin, transglutaminase, proteinase inhibitors, antibacterial proteins และ Mas–like protein (Lee และ Soderhall, 2002) หลังจาก proPO ถูกปล่อยออกจากเม็ดเลือดแล้ว จะมีการกระตุ้นและถูกเหนี่ยวนำโดย Ca^{2+}- dependent trypsin-like serine proteinase หรือที่เรียกว่า ppA (Gollas-Galvan *et al*., 1997) เปลี่ยนไปเป็น PO ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการเปลี่ยนสารตั้งต้นในขบวนการสังเคราะห์เมลานิน โดยการเปลี่ยน monophenol ให้เป็น *o*-diphenol โดยขบวนการ hydroxylation และเปลี่ยน *o*-phenols ให้เป็น *o*-quinones โดยขบวนการ oxidation ซึ่ง *o*-quinones จะเป็นสารตั้งต้นในขบวนการสังเคราะห์เมลานิน (melanin biosynthesis) (Lee และ Soderhall, 2002) PO ถือเป็นเอนไซม์สุดท้ายของการกระตุ้นขบวนการ proPO activation system (Cheng และ Chen, 2002)

ดังนั้นการติดตามสุขภาพของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น พวกแมลง หรือพวกมีเปลือกแข็งห่อหุ้มสามารถศึกษาได้จากกลไก proPO activating system เนื่องจากเป็นกลไกของเม็ดเลือด พลาสมา และ น้ำเลือด ในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่มากระตุ้นและเหนี่ยวนำให้เกิดกลไกดังกล่าว (Hernandez-Lopez *et al*., 2003) ดังรูปภาพที่ 1



รูปที่ 1 แสดงกลไก proPO activating system ของกุ้งนาง (crayfish) ที่ถูกกระตุ้นโดย β-1,3-glucans (Lee และ Soderhall, 2002)

ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total Haemocyte Count)

การศึกษา Total Haemocyte Count (THC) สามารถใช้เป็นดรรชนีในการบ่งบอกสุขภาพของสัตว์ได้ เช่น การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ THC ใช้เป็นเครื่องบ่งบอกสภาวะความเครียดของปูน้ำจืดพันธุ์ *Paratelphusa spinigera* (Narain และ Srivastava, 1979) และจะเห็นว่าการเพิ่มขึ้นของ THC หมายถึงการเพิ่มประสิทธิภาพของภูมิคุ้มกันในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น ซึ่งสามารถนำไปสู่การต่อต้านสิ่งแปลกปลอมในสัตว์จำพวกมีเปลือกแข็งห่อหุ้ม (crustaceans) เช่น กุ้ง และปู (Le Moullac *et al*., 1998) ในกุ้งสีน้ำเงิน (*Penaeus stylirostris*) พบว่ามี THC เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่ออยู่ในช่วง premolt stage มากกว่าช่วง intermolt stage (Le Moullac *et al*., 1997)

ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity)

การศึกษาประสิทธิภาพของการทำลายเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด พบว่ามีการศึกษาในกุ้งหลายชนิดเช่น กุ้ง *Homarus americanus* (Cornick และ Stewart, 1968) และกุ้งกุลาดำ (Ratanapo และ Chulavatnatol, 1990) จากการศึกษาของกิจการและคณะ (2543) พบว่าน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำก็มีสารประกอบที่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสได้ ถึงแม้ว่าจะมีอยู่ในระดับความเข้มข้นต่ำ การศึกษาของ Evans และคณะ (1968) พบว่าหลังจากที่กุ้ง *Penulirus argus* ได้รับเชื้อแบคทีเรียแล้วสามารถตรวจพบสาร bactericidin ในร่างกายสูงขึ้น และในกุ้ง *Homarus americanus* เมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรียก็สามารถตรวจพบสาร bactericidin ในร่างกายสูงขึ้นได้เช่นเดียวกัน (Stewart และ Zwicker, 1972) ดังนั้นถ้ากุ้งได้รับการกระตุ้นในระดับที่เหมาะสมด้วยสารที่เป็นส่วนประกอบของ lipopolysaccharides (LPS) หรือ peptidoglycans ซึ่งมีอยู่ในผนังเซลล์แบคทีเรีย ก็สามารถทำให้ระบบภูมิคุ้มกันในตัวกุ้งสูงขึ้นและสามารถป้องกันโรคติดเชื้อในกุ้งได้ด้วย (Unestam และ Soderhall, 1977)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.6 บัวบก

ชื่อทางพฤกษศาสตร์

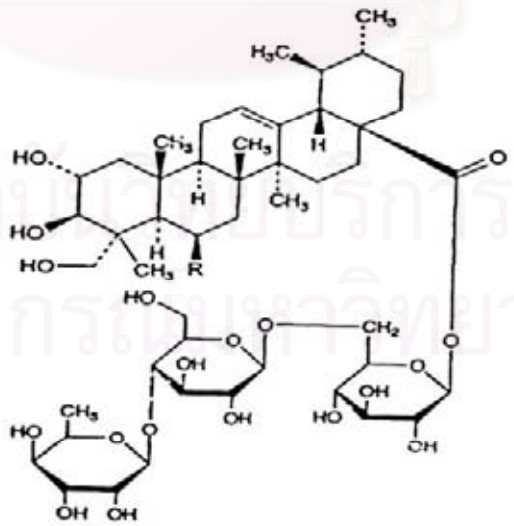
บัวบก ชื่อทางพฤกษศาสตร์ : *Centella asiatica* (Linn.) Urban ชื่อพ้อง : ผักแว่น ผักหนอก จำปา-เครือ กะบังนอก ผักหนอกช้าง ปะหนะเอขาเด๊าะ ฮักคัก แจ๊ะแซะเช่า (พเยาว์, 2534) ชื่อสามัญ : Asiatic pennywort (ถนอมศรี, 2538), Bua bok, Pa-na-e-khaa-doh, Phak waen, Phak nok (Farnsworth และ Bunyapraphatsara, 1992), Gotu Kola, Indian Pennywort, Indian Water Navelwort (Barnes, Anderson and Phillipson, 1996) วงศ์ : Umbelliferae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : บัวบกเป็นไม้ล้มลุก จำพวกผัก แตกเป็นกระจุก ลำต้นทอดไปแตะดินตรงไหนก็จะแตกรากและใบเป็นต้นใหม่ ทำให้ขึ้นแพร่ติดต่อกันเป็นพืดไปเป็นบริเวณกว้าง ลักษณะใบเป็น ใบเดี่ยวแตกเป็นกระจุกติดกับราก ใบลักษณะกลมหรือรูปไต เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-4 เซนติเมตร ขอบใบมีรอยหยัก ผิวใบด้าน แต่หลังใบเรียบ ด้านท้องใบมีขนสั้น ๆ เล็กน้อย ก้านใบยาว 1.5-7 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อคล้ายร่ม ก้านดอกแตกออกมาจากโคนใบ แต่ละช่อมีดอกย่อย 3-6 ดอก ดอกย่อยมีกลีบเลี้ยงหุ้มอยู่ 2 กลีบ มีกลีบดอก 5 กลีบ สีม่วงแดงเข้ม เกสรตัวผู้มี 5 อันสั้น ๆ ออกระหว่างกลีบดอก รังไข่มีก้านเกสรตัวเมีย 2 อัน ค่อนข้างสั้น ปลายเป็นเส้นเล็ก ๆ 2 เส้น (สรศักดิ์, 2539) ก้านช่อดอกสั้น ออกเป็นคู่หรือ 3 อันตามซอกใบ กลีบเลี้ยงสีเขียว 2 กลีบ ดอกย่อยขนาดเล็ก ช่อละ 3 ดอก กลีบดอกรูปไข่สีม่วงเข้ม ผลขนาดเล็ก สีขาวหรือเขียว เป็น 2 พู (ถนอมศรี, 2538)

ส่วนประกอบทางเคมี

ส่วนประกอบทางเคมี : การศึกษาทางพฤกษเคมี พบว่าบัวบกประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดที่สำคัญ คือ Saponin glycosides ชนิด Triterpenoid saponin ที่มีชื่อว่า Asiaticoside และ Madecassoside พบว่า Glycoside ทั้งสองชนิดนี้เมื่อผ่านขบวนการ hydrolysis จะได้น้ำตาล Glucose 2 โมเลกุล น้ำตาล Rhamnose 1 โมเลกุล และ Sapogenins ที่มีชื่อว่า Asiatic acid กับ madecassic acid ตามลำดับ (สรศักดิ์, 2539)



R = H, asiaticoside **R = OH, madecassoside**

รูปที่ 2 แสดงโครงสร้าง Asiaticoside และ Madecassoside

นอกจากสารหลัก ๆ ที่พบในบัวบกแล้วยังมีสารเคมีที่สามารถพบได้ในส่วนต่างๆ ของบัวบกซึ่งมาจากแหล่งต่าง ๆ ดังนี้ (Farnsworth และ Bunyapraphatsara, 1992)

ใบ (Leaves)

- Asiaticoside
- Bicycloelemene
- Borneol acetate
- Campesterol
- β-caryophyllene
- α-copaene
- β-elemene
- Germacrene
- Kaempferol
- Kaempferol-3-O-β-D-glucoside
- Linamarase
- Kaempferol-l-7-O-β-D-glucoside
- Myrcene
- β-pinene
- α-pinene
- Quercetin-3-O-β-D-glucoside
- β-sitosterol
- γ-terpinene
- β-*trans*-farnesene

ทั้งต้น (Whole plant)

- Asiatic acid
- Asiaticoside
- Betulinic acid
- Brahmic acid
- Brahminoside
- Brahmoside
- Centellic acid
- Centella asiatica compound BK
- Centellose
- Glucose
- Hydrocotyline
- Indocentelloside
- Indocentoic
- Isobrahmic acid
- Isothankunic acid
- Isothankuniside
- Madecassic acid
- Madasiatic acid
- Madecassoside
- Mesoinositol
- Methyl-5-hydroxy-3,6-diketo-23-norurs-12-en-28-oate
- Phellandrene

ก้านใบ (Petioles)

- Asiatic acid
- Madacassic acid
- Asiaticoside

ลำต้น (Stems)

- Asiatic acid
- Madacassic acid
- Asiaticoside

ระบุไม่ได้ว่ามาจากส่วนใดของพืช (Not specified part used)

- Alkaloids
- D-arabinose
- Asiatic acid
- Asiaticoside
- Brahmic acid
- Brahminoside
- Brahmoside
- Carbohydrates
- Centellic acid
- Centic acid
- Centellose
- Centoic acid
- D-glucoside
- Madecassic acid
- Oxyasiaticoside
- Pectins
- Resins
- L-rhamnose
- Starch
- Thankunic acid
- Thankuniside
- Vitamin

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

1. ฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Immunostimulant activity)

Farnsworth และ Bunyapraphatsara (1992) รายงานการใช้สารสกัดบัวบกโดยให้หนู (mice) กินขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ การศึกษาโดยการฉีดสารสกัด asiaticoside เข้ากล้ามเนื้อ ในหนูตะเภา (guinea pig), หนู (rat), หนู (mice) และกระต่าย ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยมีการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาว (leukocytosis) เพิ่มการไหลเวียนของระบบเลือดไปยังเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน กระตุ้นการหลั่งเมือก และการเจริญของขนและเล็บ (Boiteau และ Ratsimamanga, 1956)

2. ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity)

Farnsworth และ Bunyapraphatsara (1992) ได้รายงานประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย พบว่า สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* β -*Streptococcus* gr A และ *Pseudomonas aeruginosa* ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อบริเวณบาดแผล

3. ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อรา (Antifungal activity)

มีรายงานการศึกษาสารสกัดบัวบกโดยใช้ เอทานอล 95% พบว่าสารสกัดดังกล่าว มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* และ *Trichophyton rubrum* (Farnsworth และ Bunyapraphatsara, 1992)

4. ฤทธิ์ในการสมานแผล (Wound healing effects)

Shukla และคณะ (1999) ศึกษาฤทธิ์ของ asiaticoside ซึ่งแยกได้จาก บัวบก *(Centella asiatica)* เกี่ยวกับกลไกการหายของบาดแผลในหนูตะเภา (guinea pig) โดยใช้สารละลาย asiaticoside ความเข้มข้น 0.05%, 0.1% และ 0.2% ทาบาดแผล 2 ครั้งต่อวันเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการตัดชิ้นเนื้อไปตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่าที่ความเข้มข้น 0.2% สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างเนื้อเยื่อคอลลาเจน (Collagen) บริเวณบาดแผลมากกว่าความเข้มข้น 0.05% และ 0.1% นอกจากนี้ได้ทำการทดลองต่อในหนู (rat) ที่เป็นเบาหวาน พบว่าเมื่อใช้สารละลาย asiaticoside ที่ความเข้มข้น 0.4% พบว่าสามารถกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของเนื้อเยื่อคอลลาเจนได้เช่นเดียวกับหนูปกติ

การศึกษาในหนู (rat) เกี่ยวกับการหายของบาดแผล โดยให้สารสกัดจาก บัวบก *(Centella asiatica)* ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน โดยให้กิน พบว่า มีผลช่วยให้บาดแผลเล็กลงและหายเร็วขึ้น (Poizot และ Dumez, 1978)

5. ฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Cytotoxic activity) และเซลล์ เนื้องอก (Anti-tumour)

รายงานผลการยับยั้งเซลล์เนื้องอกโดยการใช้สารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์ของบัวบก (*Centella asiatica*) โดยวิธี โครมาโตกราฟี (Chromatographic) พบว่า สารสกัดบริสุทธิ์มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้องอกชนิด Transformed cells (Babu และคณะ, 1995)

6. ฤทธิ์ในการลดการอักเสบ (Anti-inflammatory activity)

รายงานฤทธิ์ในการลดการอักเสบโดยให้ผู้ป่วยที่มีบาดแผลรับประทานบัวบก พบว่าสามารถลดการอักเสบที่เกิดขึ้นจากบาดแผลได้ (Farnsworth และ Bunyapraphatsara, 1992)

7. ฤทธิ์ต่อระบบประสาท (Neurological effects)

การศึกษาการใช้สารสกัดบัวบกโดยวิธีใช้ตัวทำละลายเป็นแอลกอฮอล์ 95% แล้วใช้สารสกัดที่ได้ฉีดเข้าช่องท้องของหนู (rat) พบว่ามีฤทธิ์ทางระบบประสาทต่อหนู สามารถทำให้หนูซึมได้ และมีรายงานว่าส่วนผสมของสารสกัดบัวบก triterpenoid glycosides โดยการฉีดเข้าช่องท้อง

ของหนู (mice) ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และการฉีดเข้าทางเส้นเลือดแดงในกระต่ายมีฤทธิ์ทำให้สัตว์ซึมได้ แต่ถ้าฉีดสารสกัดเข้าทางเส้นเลือดดำของสุนัข พบว่าจะไม่มีฤทธิ์ในการทำให้สัตว์ซึม (Farnsworth และ Bunyapraphatsara, 1992)

8. ฤทธิ์ต่อระบบสืบพันธุ์ (Reproductive effects)

รายงานฤทธิ์ของสารสกัดบัวบก โดยให้ทางชั้นใต้ผิวหนังของหนู (mice) พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของระบบสืบพันธุ์ได้ (Farnsworth และ Bunyapraphatsara, 1992)

9. ฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อเรียบ (Smooth muscle effects)

สารสกัดบัวบก โดยใช้ตัวทำละลายคือ น้ำและแอลกอฮอล์ (อัตราส่วน 1:1) ที่ขนาด 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดการหดเกร็งของลำไส้เล็กของหนูตะเภา (guinea pig) และใช้ตัวทำละลายเป็นแอลกอฮอล์ 95% มีฤทธิ์ในการคลายกล้ามเนื้อเรียบของลำไส้ส่วนต้น (duodenum) ของกระต่าย และมดลูกของหนู (rat) ที่ไม่ตั้งท้อง (Farnsworth และ Bunyapraphatsara, 1992)

10. ฤทธิ์ในการรักษาแผลในกระเพาะอาหาร (Antiulcer effects)

Cheng และ Koo (2000) ศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะของบัวบก (*Centella asiatica*) โดยให้สารสกัดบัวบก ขนาด 0.05 กรัม/กิโลกรัม 0.25 กรัม/กิโลกรัม และ 0.5 กรัม/กิโลกรัม โดยให้ทางปากหนู (rat) ก่อนให้ เอทานอล 50% เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหาร พบว่ารอยโรคลดลง 58-82% และยังสามารถลดการทำงานของเอ็นไซม์ mucosal myeloperoxidase (MPO)

11. ฤทธิ์ในการลดความดัน (Hypotensive effects)

สารสกัดบัวบกส่วนใบ โดยใช้ตัวทำละลาย คือ น้ำและแอลกอฮอล์ (อัตราส่วน 1:1) มีฤทธิ์ในการลดความดันโลหิตของหนู (rat) โดยให้ทางเส้นเลือดดำ แต่ฤทธิ์ที่ลดความดันโลหิตนั้นไม่เกิดผลในสุนัข (Farnsworth และ Bunyapraphatsara, 1992)

12. ผลต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง (Effect on red blood cells)

สกัดสารจากส่วนใบของบัวบก โดยใช้ตัวทำละลาย คือน้ำและแอลกอฮอล์(อัตราส่วน 1:1) สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ และมีผลต่อการทำงานของหัวใจหนู (rat) โดยการให้กิน ขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (Farnsworth และ Bunyapraphatsara, 1992)

13. ฤทธิ์ในการลดอาการแพ้ (Antihistamine activity)

สารสกัดบัวบกส่วนใบ โดยใช้ตัวทำละลายคือ น้ำและแอลกอฮอล์ (อัตราส่วน 1:1) มีฤทธิ์ในการป้องกันกลไกการหลั่งสารฮีสตามีน (histamine) ได้ (Farnsworth และ Bunyapraphatsara, 1992)

14. ฤทธิ์ในการลดไข้ (Antipyretic activity)

สกัดสารจากใบบัวบกโดยการใช้แอลกอฮอล์ 95% เป็นตัวทำละลาย พบว่ามีฤทธิ์ลดไข้ในหนู (rat) โดยการให้ทางช่องท้อง ทำให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 1.2 ^{o}F (Farnsworth และ Bunyapraphatsara, 1992)

การศึกษาฤทธิ์เภสัชจลนศาสตร์

สุชาดา และชัยโย (2541) รายงานว่าเมื่อให้สารประกอบ glycoside ของบัวบกโดยให้ทางปากแก่สัตว์ทดลอง พบว่า มีปริมาณ 50 % จะถูกดูดซึมได้ในส่วนต้นของลำไส้ใหญ่และคงอยู่ในร่างกายได้ 4-6 วัน ปริมาณ 81 % จะถูกขับออกทางอุจจาระใน 48 ชั่วโมง 2.1 % อยู่ในปัสสาวะ และ 1.1 % ออกมากับลมหายใจ

การศึกษาพิษวิทยา

ได้มีการศึกษาพบว่า เมื่อทาครีมที่มีความเข้มข้นของบัวบก 1 % วันละครั้งบนผิวหนังของหนูตะเภาซ้ำบนบริเวณเดียวกันติดต่อกันนาน 1 เดือน ไม่ทำให้เกิดอาการเป็นพิษใด ๆ และไม่พบความผิดปกติของต่อมรากขนและเส้นเลือดของผิวหนัง และในการวิจัยทางคลินิก พบว่า ครีมบัวบกความแรง 1 % ไม่ทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ที่เกิดเฉพาะที่และทั่วร่างกาย ส่วนการศึกษาการเกิดพิษโดยการฉีดสารละลายของ asiaticoside 5 มิลลิกรัมเข้าใต้ผิวหนังของหนูตะเภา พบว่าทำให้เกิดปฏิกิริยาเฉพาะที่คือทำให้เกิดผื่นแดง และมีการกระจายของเม็ดเลือดขาวชนิด macrophage เข้าในชั้น dermis ของผิวหนัง (สุชาดา และ ชัยโย, 2541)

การศึกษาของ Farnsworth และ Bunyapraphatsara (1992) เกี่ยวกับความเป็นพิษเฉียบพลันของหนู (mouse) ไม่แสดงอาการเมื่อใช้ความเข้มข้นสารสกัดบัวบกที่สกัดด้วย 50% เอทานอล 1 กรัม/กิโลกรัม และในกรณีที่ใช้สารสกัดบัวบกความเข้มข้น 40-50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ฉีดเข้ากล้ามเนื้อของหนู (mice) และกระต่าย พบว่าความเข้มข้นที่ใช้มีความเป็นพิษต่อสัตว์ และความเข้มข้นของสารสกัดบัวบกที่สามารถใช้ในหนู (mice) ได้สูงสุดคือ 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (Brinkhaus และคณะ, 2000)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมสูตรอาหาร

การเตรียมสูตรอาหาร และการผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบในอาหารกุ้ง

3.1.1 สูตรอาหารต่อกิโลกรัม มีส่วนผสม ดังนี้

Fish meal 60 %	ปริมาณ 0.25 กิโลกรัม
Soy bean meal 45 %	ปริมาณ 0.20 กิโลกรัม
Wheat flour 14 %	ปริมาณ 0.25 กิโลกรัม
Shrimp meal 45 %	ปริมาณ 0.15 กิโลกรัม
Squid liver powder	ปริมาณ 0.05 กิโลกรัม
Modified starch	ปริมาณ 0.05 กิโลกรัม
Lecithin	ปริมาณ 0.01 กิโลกรัม
Fish oil	ปริมาณ 0.01 กิโลกรัม
Premix	ปริมาณ 0.03 กิโลกรัม

3.1.2 สารสกัดบัวบกอย่างหยาบ จากองค์การเภสัชกรรม Lot Number : D470002 ระบุความเข้มข้นของสาร asiaticoside 2.52 % w/w

3.1.3 การผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบกับอาหารกุ้ง โดยผสมวัตถุดิบในเครื่องผสมอาหารเป็นระยะเวลา 20 นาที

ตารางที่ 2 การแบ่งสูตรอาหาร

สูตรที่	ส่วนผสม
1	อาหารกุ้งผสม สารสกัดบัวบกอย่างหยาบ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม
2	อาหารกุ้งผสม สารสกัดบัวบกอย่างหยาบ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม
3	อาหารกุ้งผสม สารสกัดบัวบกอย่างหยาบ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม
4	อาหารกุ้งปกติ ไม่มีส่วนผสมของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ

3.1.4 นำวัตถุดิบที่ผสมเข้ากันแล้วจากข้อ 3.1.3 เข้าเครื่องอัดเม็ด และปรับขนาดเม็ดอาหาร

3.1.5 นำอาหารที่อัดเม็ดแล้วเข้าตู้อบไอน้ำ อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 5 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.6 นำอาหารที่ได้จากข้อ 3.1.5 เข้าตู้อบแห้ง อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.1.7 นำอาหารออกจากตู้อบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วทำการคัดขนาดอาหารอัดเม็ด ผ่านตะแกรง โดยมีขนาดเม็ดอาหารเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 มิลลิเมตร ลักษณะท่อนทรงกระบอก แล้วบรรจุใส่ถุง เก็บไว้ในตู้เย็น

3.2 การศึกษาผลของสารสกัดบัวบกต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง

3.2.1 การทดลองที่ 1 : ประสิทธิภาพของบัวบก ด้านความคุ้มโรคต่อเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในลูกกุ้ง

สัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสต์ลาวา (PL15) มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยงในจังหวัดฉะเชิงเทรามาทำการตรวจสุขภาพเบื้องต้น คือ ความสมบูรณ์แข็งแรงของกุ้ง การดีดตัว อวัยวะทุกส่วนครบ ฯลฯ นำกุ้งมาเลี้ยงในตู้ขนาด 45x60x30 เซนติเมตร บรรจุน้ำ 60 ลิตร ความเค็ม 10 ppt จำนวน 20 ตู้ 1,000 ตัว/ตู้ เพื่อเป็นการปรับสภาพสัตว์ก่อนการทดลองเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ โดยการให้อาหารสูตรที่ 4 (สูตรควบคุม) วันละ 4 ครั้ง คือ 8.00 น. 12.00 น. 16.00 น. และ 21.00 น. ในปริมาณ 3% ของน้ำหนักตัว

การแบ่งกลุ่มการทดลอง

ทำการแบ่งกลุ่มการทดลองโดยในแต่ละกลุ่มการทดลองจะแบ่งดังนี้

ตารางที่ 3 แบ่งกลุ่มการทดลองประสิทธิภาพของบัวบก ด้านความคุ้มโรคต่อเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในลูกกุ้ง

กลุ่มที่	สูตรอาหารที่ใช้	จำนวน
1	สูตรที่ 1 อาหารกุ้งผสม สารสกัดบัวบกอย่างหยาบ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	4 ตู้
2	สูตรที่ 2 อาหารกุ้งผสม สารสกัดบัวบกอย่างหยาบ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	4 ตู้
3	สูตรที่ 3 อาหารกุ้งผสม สารสกัดบัวบกอย่างหยาบ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	4 ตู้
4	สูตรที่ 4 อาหารกุ้งปกติไม่มีส่วนผสมของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ (Positive control)	4 ตู้
5	สูตรที่ 4 อาหารกุ้งปกติไม่มีส่วนผสมของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ (Negative control)	4 ตู้

การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์

หลังจากที่แบ่งกุ้งออก 5 กลุ่มการทดลอง และทำการเลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นเป็นระยะเวลา 15 วันในครั้งที่ 1 และ 30 วันในครั้งที่ 2 หลังจากนั้นทำการนับจำนวนกุ้งในแต่ละกลุ่มการทดลอง จำนวน 50 ตัว/โหล โดยกลุ่มการทดลองที่ 1-4 แช่ลงในน้ำเค็มที่มีเชื้อ *Vibrio vulnificus* มีค่า OD ประมาณ 0.3-0.4 ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร เป็นเวลา 3 นาที ส่วนกลุ่มการทดลองที่ 5 แช่ลงในน้ำเค็มที่ไม่มีเชื้อ *Vibrio vulnificus* เป็นเวลา 3 นาที

การบันทึกผลการทดลอง

ทำการบันทึกผลจำนวนกุ้งที่รอดชีวิตและเพาะเชื้อกุ้งที่ตาย ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน

3.2.2 การทดลองที่ 2 : ประสิทธิภาพของบัวบก ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

สัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไม ระยะตัวเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 10-15 กรัม มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยงในจังหวัดฉะเชิงเทรามาทำการตรวจสุขภาพเบื้องต้น คือ ความสมบูรณ์แข็งแรงของกุ้ง การดีดตัว อวัยวะทุกส่วนครบ ฯลฯ นำกุ้งมาเลี้ยงในตู้ขนาด 45x60x30 เซนติเมตร บรรจุน้ำ 60 ลิตร ความเค็ม 10 ppt เลี้ยงกุ้ง 18 ตัวต่อตู้ จำนวน 16 ตู้ เพื่อเป็นการปรับสภาพสัตว์ก่อนการทดลองเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ให้อาหารสูตรที่ 4 (สูตรควบคุม) วันละ 4 ครั้ง คือ 8.00 น. 12.00 น. 16.00 น. และ 21.00 น. ในปริมาณ 3% ของน้ำหนักตัว

การแบ่งกลุ่มการทดลอง

ทำการแบ่งกลุ่มการทดลอง โดยในแต่ละกลุ่มการทดลองจะแบ่ง ดังนี้

ตารางที่ 4 แบ่งกลุ่มการทดลองประสิทธิภาพของบัวบก ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

กลุ่มที่	สูตรอาหารที่ใช้	จำนวน
1	สูตรที่ 1 อาหารกุ้งผสม สารสกัดบัวบกอย่างหยาบ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	4 ตู้
2	สูตรที่ 2 อาหารกุ้งผสม สารสกัดบัวบกอย่างหยาบ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	4 ตู้
3	สูตรที่ 3 อาหารกุ้งผสม สารสกัดบัวบกอย่างหยาบ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	4 ตู้
4	สูตรที่ 4 อาหารกุ้งปกติไม่มีส่วนผสมของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ (กลุ่มควบคุม)	4 ตู้

การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์

ทำการสุ่มกุ้ง ในวันที่ 10, 20 และ 30 ของแต่ละชุดการทดลองจำนวน 4 ตัว ต่อกลุ่ม โดยเก็บเลือดกุ้งจากโคนขาเดินคู่ที่ 3 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร/ตัว ผสมกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร (อัตราส่วนเลือดกุ้งต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 1:1) หลังจากนั้นนำตัวอย่างเลือดที่ได้ไปทำการศึกษาดังนี้

- วิเคราะห์หาปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte count)
- วิเคราะห์หาความว่องไวของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนรวม (Total protein assay)
- วิเคราะห์หาความว่องไวในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity)

วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte count) ตามวิธีการของ Voigt (2000)

1. นำตัวอย่างเลือด (haemolymph) ที่เจาะได้จากกุ้ง ปริมาตร 20 µl
2. นับจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมดโดยใช้ Haemacytometer
3. คำนวณปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้ มีหน่วยเป็น เซลล์/มิลลิลิตร

2. วิธีการวิเคราะห์หาความว่องไวของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) และวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

<u>การเตรียมตัวอย่างและเตรียม Haemocyte Lysate (HLS)</u> ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก กิจการและสิทธิ (2538) และ Cheng และ Chen (2000)

1. นำตัวอย่างเลือดกุ้ง มาทำการหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อเป็นการแยกเม็ดเลือดกุ้ง และซีรั่มที่ผสมกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดออกจากกัน

2. ดูดเอาส่วนใสด้านบนไปใช้ในการศึกษา Bactericidal activity (ข้อ 3) แล้วเอาส่วนที่ตกตะกอนด้านล่างไว้ เติมสาร cacodylate-citrate buffer แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อเป็นการล้างเม็ดเลือดกุ้งออกจากสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

3. ดูดเอาส่วนใสด้านบนทิ้ง นำเอาส่วนที่ตกตะกอนด้านล่าง มาเติมสาร cacodylate buffer ปริมาตร 200 µl เพื่อเป็นการปรับสภาพและเจือจางเม็ดเลือด

4. นำสารละลาย จากข้อ 3 มาทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตก โดยใช้ hand homogenizer หลังจากนั้นเติมสาร cacodylate buffer ปริมาตร 300 µl

5. นำสารละลายที่ได้ จากข้อ 4 มาทำการหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 °C เพื่อแยกเอาส่วนใสซึ่งเรียกว่า Haemocyte Lysate (HLS) นำไปใช้ในขั้นตอนวิเคราะห์ความว่องไวของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

<u>การวิเคราะห์หาความว่องไวของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity)</u> ตามวิธีการที่ ดัดแปลงจากกิจการและสิทธิ (2538) และ Cheng และ Chen (2000)

1. นำ HLS ที่เตรียมไว้จากขั้นตอนการเตรียมในข้อ 5 ปริมาณ 200 µl ผสมรวมกับสารละลาย ทริปซิน (1% trypsin ใน cacodylate buffer) 200 µl หลังจากนั้นผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง (25-26 °C) เป็นเวลา 2 นาที เพื่อทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตกอย่างสมบูรณ์ และปลดปล่อย เอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส

2. นำสารละลายจากข้อ 1 มาเติมสาร L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ปริมาณ 200 µl (เพื่อทำให้เกิดสี โดยเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส จับกับ L-DOPA แล้วทำให้ L-DOPA เปลี่ยนเป็น dopamine เกิดสีขึ้น) ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง (25-26 ° C) เป็นเวลา 1 นาที นำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร แล้วทำการจดบันทึกค่าการเปลี่ยนแปลงทุก ๆ 1 นาที จนปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์

3. นำค่าที่ได้มาคำนวณเพื่อให้ทราบค่าหน่วยต่อนาที (unit/minute) ของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยกำหนดให้ 1 หน่วย คือความสามารถของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ที่สามารถเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็น dopamine ด้วยการดูดกลืนแสง 0.001 / นาที / มิลลิกรัมโปรตีนในสารละลาย

หมายเหตุ : สารละลายมาตรฐาน (Standard blank) เตรียมจาก cacodylate buffer ปริมาตร 200 µl สารละลายทริปซิน ปริมาตร 200 µl และ L-DOPA ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

<u>วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน</u> ตามวิธีการของ Brandford (1976)

1. เตรียมสารสี (Bio-Rad Protein assay Kit ll) ในอัตราสารสีต่อน้ำ คือ 1: 4 ส่วน แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman #1 (สารสีที่เจือจางแล้วจะเก็บไว้ได้ประมาณ 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง)

2. การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) (Bio-Rad Protein assay Kit ll)

2.1 ความเข้มข้นโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) ตั้งต้น ปริมาตร 1.4 มิลลิกรัมต่อ Deionized water ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการเจือจางโดยใช้ Deionized water ให้ได้ความเข้มข้นที่ ครอบคลุมช่วง 0.2-0.9 มิลลิลิกรัม/มิลลิลิตร

2.2 ดูดสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 100 µl ใส่ในหลอดทดลองที่เตรียมไว้

2.3 เติมสารสีที่ทำการเจือจางและกรองไว้จากข้อ 1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

2.4 นำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร จดบันทึกค่า OD ที่เกิดขึ้น นำไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) กับค่า OD

3. นำ HLS ที่เตรียมไว้จากขั้นตอนการเตรียมในข้อ 5 มาปริมาตร 100 µl ใส่ในหลอดทดลองที่เตรียมไว้

4. เติมสารสีที่ทำการเจือจางและกรองไว้จากข้อ 1 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

5. นำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร จดบันทึกนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟสารละลายโปรตีนมาตรฐาน จากข้อ 2.4 เพื่อหาปริมาณมิลลิกรัมโปรตีน

3. วิธีการวิเคราะห์ความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง (Bactericidal activity) ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก กิจการและคณะ (2543)

1. นำส่วนใส (ซีรั่มที่ผสมกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด) ที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและเตรียม HLS ในข้อ 2 มาทำการเจือจางโดยใช้ 2.6% NaCl ให้มีความเข้มข้นเป็น 1:2 , 1:4 , 1:8 , 1:16 และ 1:32 โดยปรับปริมาตรสุดท้ายของการเจือจางให้ได้ 0.5 มิลลิลิตร ส่วนชุดควบคุมคือ 2.6 % NaCl ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

2. นำเชื้อ *Vibrio vulnificus* ที่ทราบความเข้มข้น (10^7 CFU/มิลลิลิตร) มีค่า OD ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ประมาณ 0.1-0.15 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ให้ครบทุกหลอดจาก ข้อ 1 เขย่าให้เข้ากันอย่างเบา ๆ ทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง (บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง)

3. ดูดสารละลายจากข้อ 2 มา ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มี 1.5 % NaCl ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการเจือจาง ดังนี้ 10^{-1} ,10^{-2} และ 10^{-3} ในทุกอัตราส่วน

4. ดูดสารละลายจากข้อ 3 ปริมาตร 10 µl ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS) โดยวิธี drop plating บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

5. นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น บันทึกค่าการเจือจางซีรั่มที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50% ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง โดยเทียบจากจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อจากกลุ่มควบคุม

4. การศึกษาความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียนของกุ้งขาวแวนนาไม (Clearance ability of bacteria)

สัตว์ทดลอง

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ระยะตัวเต็มวัย ด้วยอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ จากการทดลองที่ 3.2.2 (ประสิทธิภาพของบัวบก ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม) จนครบ 30 วัน

การแบ่งกลุ่มการทดลอง

ทำการแบ่งกลุ่มการทดลองใหม่โดยในแต่ละกลุ่มการทดลองจะแบ่ง ดังนี้

ตารางที่ 5 แบ่งกลุ่มการทดลองความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียนของกุ้งขาวแวนนาไม

กลุ่มที่	สูตรอาหารที่ใช้	จำนวน (ตู้)	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม
1	สูตรที่ 1 อาหารกุ้งผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	4	จำนวน 4 ตัว/กลุ่ม	จำนวน 4 ตัว/กลุ่ม
2	สูตรที่ 2 อาหารกุ้งผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	4	จำนวน 4 ตัว/กลุ่ม	จำนวน 4 ตัว/กลุ่ม
3	สูตรที่ 3 อาหารกุ้งผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ 10 กรัม/อาหาร1 กิโลกรัม	4	จำนวน 4 ตัว/กลุ่ม	จำนวน 4 ตัว/กลุ่ม
4	สูตรที่ 4 อาหารกุ้งปกติไม่มีส่วนผสมของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ (กลุ่มควบคุม)	4	จำนวน 4 ตัว/กลุ่ม	จำนวน 4 ตัว/กลุ่ม

การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์หาความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียนของกุ้ง (Clearance ability of bacteria) ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก กิจการและคณะ (2543)

1. นำเชื้อ *Vibrio vulnificus* ที่ทราบความเข้มข้น (10^6 CFU/มิลลิลิตร) มีค่า OD ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ประมาณ 0.1-0.15 มาฉีดเข้ากุ้งในแต่ละชุดการทดลอง บริเวณกล้ามเนื้อปล้องที่ 6 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/ตัว โดยชุดควบคุมจะฉีดด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 1.5 % แทนเชื้อ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/ตัว

2. หลังจากนั้นปล่อยกุ้งไว้ในตู้เลี้ยงเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3. ทำการเจาะเลือดกุ้งในแต่ละชุดการทดลอง โดยเจาะเลือดกุ้งตัวละ 0.5 มิลลิลิตร

4. นำเลือดกุ้งที่ได้จากข้อ 3 มาทำการเจือจางโดย 1.5 % NaCl ให้มีความเข้มข้นเป็น 1:2 , 1:4 และ 1:8 นำมาเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS โดยวิธี drop plating ปริมาตร 10 µl ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

5. นับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเทียบกับชุดควบคุม

3.3 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ จะใช้พารามิเตอร์ดังนี้

1. อุณหภูมิ โดยการใช้เทอร์โมมิเตอร์

2. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยการใช้เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH-meter [Model No. IQ140])

3. ค่าการละลายออกซิเจนในน้ำ (DO) โดยการใช้เครื่อง Oxygenmeter (DO-meter [YSI Model 57])

4. ค่าความเป็นด่างของน้ำ (Alkalinity) โดยการใช้ชุดทดสอบความเป็นด่าง (Total Alkalinity test kit)

5. ค่าความกระด้าง (Total Hardness) โดยการใช้ชุดทดสอบความกระด้าง-F100 (Total Hardness-F100)

6. ค่าแอมโมเนีย (Ammonia) โดยการใช้ชุดทดสอบแอมโมเนีย (Ammonia test kit [NH_4^+])

7. ค่าไนไตร์ต (Nitrite) โดยการใช้ชุดทดสอบไนไตรต์ (Nitrite test kit)

8. ความเค็ม (Salinity) โดยการใช้เครื่องวัดความเค็ม (Salinometer [Model 80-2088-64])

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

- ข้อมูลที่ได้จะใช้ค่าทางสถิติในการวิเคราะห์โดยวิธี one-way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลภายในกลุ่มทดลอง

- นำข้อมูลที่ได้มาเขียนแผนภูมิเปรียบเทียบภายในกลุ่มทดลอง

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบ

4.1 ผลการวิเคราะห์อาหารที่ผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ

ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์อาหารที่ผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ

ลักษณะทางกายภาพ	**อาหารที่ผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ**			
	ท่อนทรงกระบอกสั้น เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.2 มิลลิเมตร สีครีมอ่อน กลิ่นหอม			
วิเคราะห์	**สูตรที่ 1 : 1 g/kg**	**สูตรที่ 2 : 5 g/kg**	**สูตรที่ 3 : 10 g/kg**	**สูตรที่ 4 : 0 g/kg**
ความชื้น (%)	10.50	10.11	11.35	9.36
โปรตีน (%)	44.07	44.47	44.02	44.46
ไขมัน (%)	6.30	5.97	5.92	6.13
เยื่อใย (%)	3.53	3.55	3.46	3.42
เถ้า (%)	10.80	11.01	11.01	11.18
แคลเซียม (%)	2.26	2.16	2.18	2.26
ฟอสฟอรัส (%)	1.13	1.12	1.13	1.15

ใช้วิธี Proximate Analysis (PMA) ในการวิเคราะห์อาหารที่ผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ คิดเป็นน้ำหนักแห้ง (%)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 ผลการทดลองที่ 1 ประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบด้านความคุ้มโรคต่อเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม

หลังจากกุ้งขาวแวนนาไมระยะ P15 ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ ปริมาณ 0, 1, 5 และ10 กรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 15 วัน ในครั้งที่ 1 และ 30 วัน ในครั้งที่ 2 และทดสอบความคุ้มโรคโดยใช้เชื้อ *Vibrio vulnificus* ที่เลี้ยงในอาหาร TSA + 1% NaCl ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่า OD ได้ 0.350 ในครั้งที่ 1 และ 0.427 ในครั้งที่ 2เมื่อทำการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA + 1% NaCl ได้ 1.19×10^{16} CFU/ml. ในครั้งที่ 1 และ 5.4×10^{21} CFU/ml. ในครั้งที่ 2 ทำการแช่กุ้งในเชื้อเป็นระยะเวลา 3 นาที บันทึกจำนวนกุ้งที่รอดชีวิตทุกวันหลังจากแช่เชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบในทุกความเข้มข้นเป็นระยะเวลา 15 วัน และ 30 วัน พบว่ามีอัตรารอดชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

โดยครั้งที่ 1 ในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบเป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่า <u>อัตรารอดชีวิตของกุ้งในวันที่ 1</u> โดยกลุ่มที่ 1 (1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) คือ 78.50±0.96, 3 (10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) คือ 78.50±0.96 และกลุ่มควบคุม คือ 86.20±1.92 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่พบว่า กลุ่มที่ 1, 3 และกลุ่มควบคุม แตกต่างจากกลุ่มที่ 2 (5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) คือ 95.00 ±0.58 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และพบว่า กลุ่มที่ 2 มีอัตรารอดชีวิตสูงที่สุด คือ 95.00±0.58 <u>อัตรารอดชีวิตของกุ้งในวันที่ 2 และ 3</u> โดยกลุ่มที่ 1 คือ 74.50±0.96 และ 70.50±1.50 ในวันที่ 2 และ 3 ตามลำดับ และกลุ่มที่ 3 คือ 72.50±0.96 และ 65.00±3.51 ในวันที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กลุ่มที่ 1 และ 3 แตกต่างจากกลุ่มควบคุม คือ 68.00±0.82 และ 57.00±2.38 ในวันที่ 2 และ 3 ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนกลุ่มที่ 2 คือ 88.50±0.96 และ 84.50±3.20 ในวันที่ 2 และ3 ตามลำดับ แตกต่างจากกลุ่มที่ 1, 3 และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) พบว่า กลุ่มที่ 2 มีอัตรารอดชีวิตของกุ้งสูงที่สุด คือ 88.50±0.96 และ 84.50±3.20 ในวันที่ 2 และ3 ตามลำดับ <u>อัตรารอดชีวิตของกุ้งในวันที่ 4, 5, 6 และ 7</u> โดยกลุ่มที่ 1 มีอัตรารอดชีวิต คือ 67.50±0.96, 60.50±0.96, 59.00±1.29 และ 57.00±2.08 ในวันที่ 4, 5, 6, และ 7 ตามลำดับ กลุ่มที่ 2 มีอัตรารอดชีวิต คือ 80.50±2.06, 77.00±3.00, 71.50±2.63 และ 68.50±2.63 ในวันที่ 4, 5, 6 และ 7 ตามลำดับ กลุ่มที่ 3 มีอัตราการรอดชีวิตคือ 58.50±0.96, 52.50±1.71, 49.50±2.06 และ49.00±2.08 ในวันที่ 4, 5, 6 และ 7 ตามลำดับ และกลุ่มควบคุมคือ 47.00±3.51, 44.00±2.94, 43.00±2.38 และ 42.00±2.31 ในวันที่ 4, 5, 6 และ 7 ตามลำดับ โดยกลุ่มที่ 1, 2 และ3 แตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กลุ่มที่ 1 แตกต่างจากกลุ่มที่ 2, 3 และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กลุ่มที่ 3 แตกต่าง

จากกลุ่มที่ 1, 2 และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนกลุ่มที่ 2 แตกต่างจากกลุ่มที่ 1, 3, กลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่พบว่า กลุ่มที่ 2 มีอัตรารอดชีวิตของกุ้งสูงที่สุดคือ 80.50±2.06, 77.00±3.00, 71.50±2.63 และ 68.50±2.63 ในวันที่ 4, 5, 6 และ 7 ตามลำดับ (ตารางที่ 7 และแผนภูมิแท่งที่ 1)

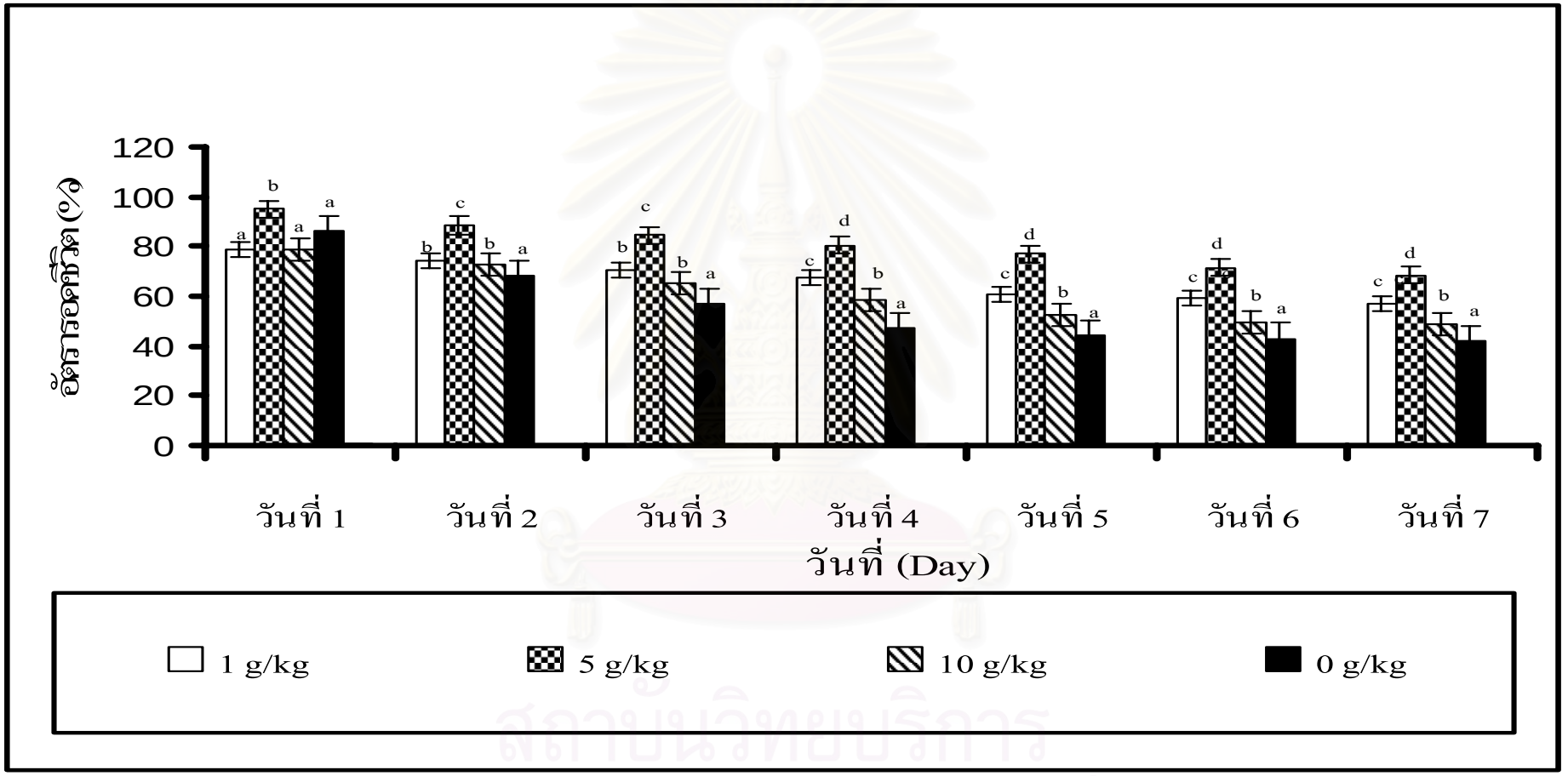
โดยครั้งที่ 2 ในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่า <u>อัตรารอดชีวิตของกุ้งในวันที่ 1 และ 2</u> โดยอัตรารอดชีวิตในวันที่ 1 และ 2 ของกุ้งกลุ่มที่ 1 คือ 78.50±0.96 และ 71.00±1.73 ตามลำดับ กลุ่มที่ 2 คือ 81.00±0.58 และ 78.00±1.15 ตามลำดับ กลุ่มที่ 3 คือ 77.00±0.58 และ 73.50±1.89 ตามลำดับ และกลุ่มควบคุม คือ 81.00±1.73 และ 72.00±5.77 ตามลำดับ โดยกลุ่มที่ 1, 2, 3, และกลุ่มควบคุม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) <u>อัตรารอดชีวิตของกุ้งในวันที่ 3</u> โดยกลุ่มที่ 1 คือ 65.50±1.89, กลุ่มที่ 3 คือ 66.00±3.56 และกลุ่มควบคุม คือ 68.00±3.46 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนกลุ่มที่ 2 คือ 77.00±0.58 แตกต่างจากกลุ่มที่ 1, 3 และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และพบว่า กลุ่มที่ 2 มีอัตรารอดชีวิตของกุ้งสูงที่สุด คือ 77.00±0.58 <u>อัตรารอดชีวิตของกุ้งในวันที่ 4</u> กลุ่มที่ 1 คือ 65.00±0.58 และกลุ่มควบคุม คือ 63.00±4.04 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กลุ่มที่ 2 คือ 72.00±1.15 แตกต่างจากกลุ่มที่ 1, กลุ่มที่ 3 คือ 56.50±0.96 และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) พบว่า กลุ่มที่ 2 มีอัตรารอดชีวิตของกุ้งสูงที่สุด คือ 72.00±1.15 <u>อัตรารอดชีวิตของกุ้งในวันที่ 5</u> โดยกลุ่มที่ 3 คือ 55.50±0.96 ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม คือ 53.00±4.04 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กลุ่มที่ 1 คือ 61.50±0.50 แตกต่างจากกลุ่มที่ 2 คือ 68.00±1.15, กลุ่มที่ 3 และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนกลุ่มที่ 2 แตกต่างจากกลุ่มที่ 1, 3 และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และพบว่า กลุ่มที่ 2 มีอัตรารอดชีวิตของกุ้งสูงที่สุด คือ 68.00±1.15 <u>อัตรารอดชีวิตของกุ้งในวันที่ 6</u> โดยกลุ่มที่ 1 คือ 60.50±0.96 และกลุ่มที่ 2 คือ 66.00±1.15 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนกลุ่มที่ 3 คือ 53.00±1.29 และกลุ่มควบคุม คือ 52.00±4.62 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กลุ่มที่ 1 และ 2 แตกต่างจากกลุ่มที่ 3 และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่พบว่า กลุ่มที่ 2 มีอัตรารอดชีวิตของกุ้งสูงที่สุด คือ 66.00±1.15 <u>อัตรารอดชีวิตของกุ้งในวันที่ 7</u> มีอัตรารอดชีวิตของกุ้งเท่ากับ 56.50±1.50, 55.00±4.04, 49.75±1.89 และ 42.00±4.62 ในกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ กลุ่มควบคุม ตามลำดับ โดยกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กลุ่มที่ 3 และกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($P>0.05$) กลุ่มที่ 1และ 2 แตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 8 และแผนภูมิแท่งที่ 2)

ตารางที่ 7 ผลของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่ออัตรารอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับการแช่เชื้อ *Vibrio vulnificus* ครั้งที่ 1 ค่าเฉลี่ย (Mean ± S.E.)

บัวบกผสมอาหาร	จำนวนกุ้ง (ตัว)	อัตรารอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากจุ่มเชื้อ (%)						
		วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	50	78.50±0.96[a]	74.50±0.96[b]	70.50±1.50[b]	67.50±0.96[c]	60.50±0.96[c]	59.00±1.29[c]	57.00±2.08[c]
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	50	95.00±0.58[b]	88.50±0.96[d]	84.50±3.20[c]	80.50±2.06[d]	77.00±3.00[d]	71.50±2.63[d]	68.50±2.63[d]
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	50	78.50±0.96[a]	72.50±0.96[b]	65.00±3.51[b]	58.50±0.96[b]	52.50±1.71[b]	49.50±2.06[b]	49.00±2.08[b]
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg	50	86.20±1.92[a]	68.00±0.82[a]	57.00±2.38[a]	47.00±3.51[a]	44.00±2.94[a]	43.00±2.38[a]	42.00±2.31[a]

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P<0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



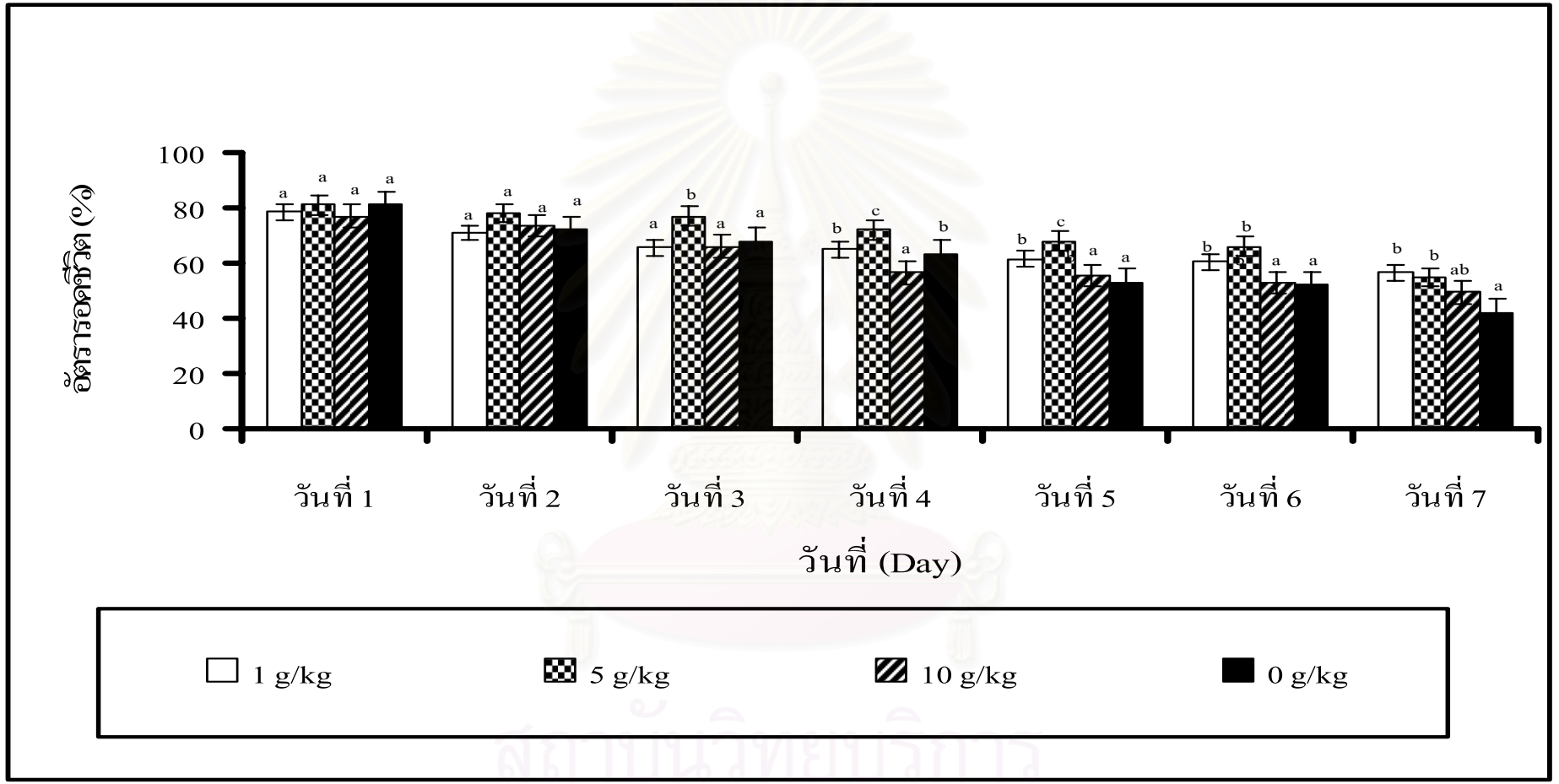
แผนภูมิแท่งที่ 1 อัตรารอดชีวิตที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น ต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 15 วัน หลังจากแช่เชื้อ *Vibrio vulnificus* ครั้งที่ 1 เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 8 ผลของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับการแช่เชื้อ *Vibrio vulnificus* ครั้งที่ 2 ค่าเฉลี่ย (Mean ± S.E.)

บัวบกผสมอาหาร	จำนวนกุ้ง (ตัว)	อัตรารอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากจุ่มเชื้อ (%)						
		วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	50	78.50±0.96^{a}	71.00±1.73^{a}	65.50±1.89^{a}	65.00±0.58^{b}	61.50±0.50^{b}	60.50±0.96^{b}	56.50±1.50^{b}
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	50	81.00±0.58^{a}	78.00±1.15^{a}	77.00±0.58^{b}	72.00±1.15^{c}	68.00±1.15^{c}	66.00±1.15^{b}	55.00±4.04^{b}
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	50	77.00±0.58^{a}	73.50±1.89^{a}	66.00±3.56^{a}	56.50±0.96^{a}	55.50±0.96^{a}	53.00±1.29^{a}	49.50±1.89^{ab}
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg	50	81.00±1.73^{a}	72.00±5.77^{a}	68.00±3.46^{a}	63.00±4.04^{b}	53.00±4.04^{a}	52.00±4.62^{a}	42.00±4.62^{a}

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P<0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภูมิแท่งที่ 2 อัตรารอดชีวิตที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น ต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน หลังจากแช่เชื้อ *Vibrio vulnificus* ครั้งที่ 2 เป็นเวลา 7 วัน

4.3 ผลการทดลองที่ 2 ประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว-แวนนาไม

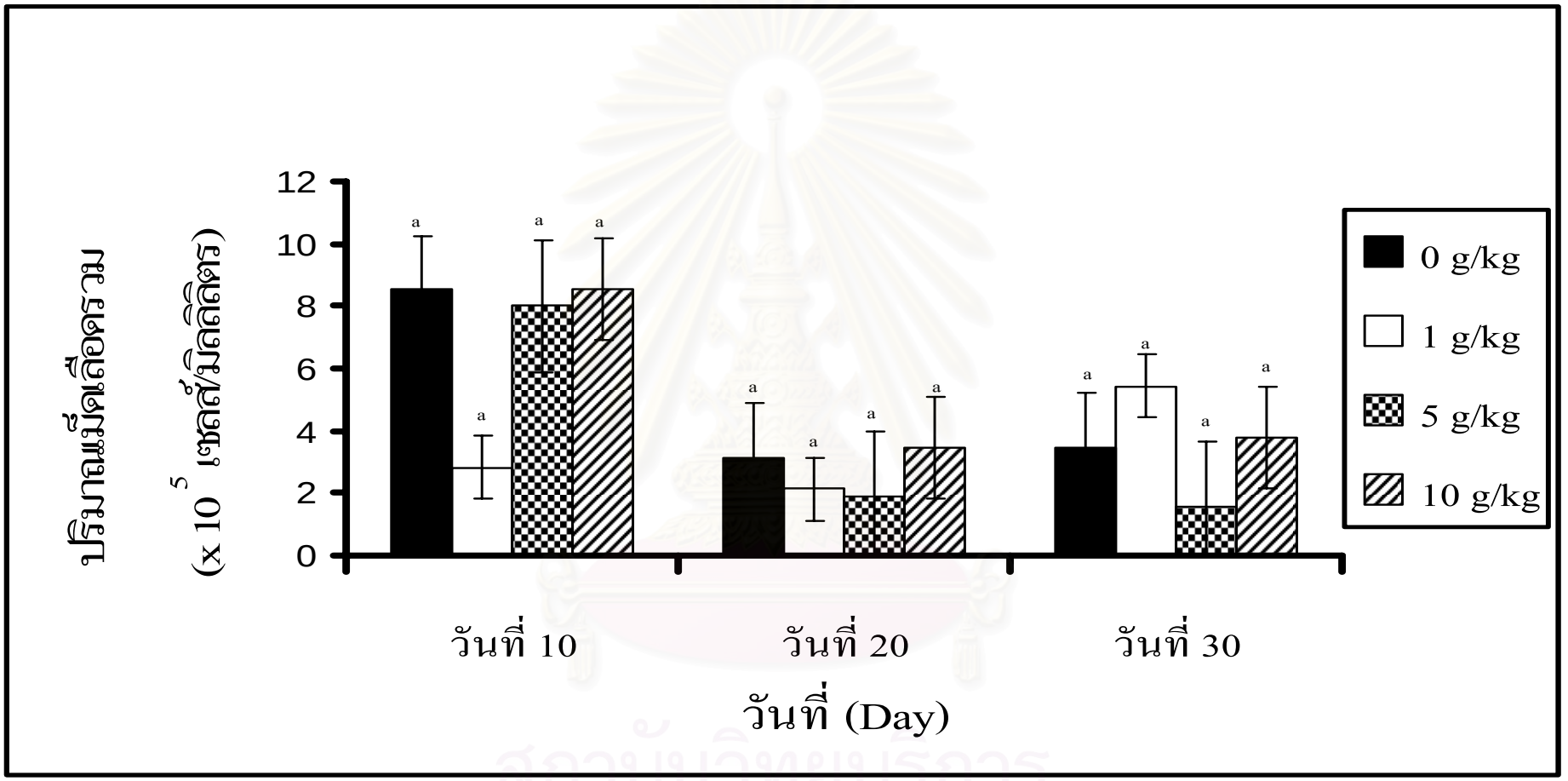
4.3.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte count)

การตรวจวัดปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ โดยทำการวัดทุก 10 วัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่า ในทุก ๆ ช่วงเวลาการเก็บตัวอย่าง ปริมาณเม็ดเลือดแดงรวมของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารสกัดบัวบกความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ในวันที่ 20 พบว่ากุ้งที่ได้รับสารสกัดบัวบกผสมอาหารความเข้มข้น 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเม็ดเลือดรวม $3.482 \pm 0.586 \times 10^5$ เซลล์/ มิลลิลิตร มากที่สุด ส่วนในวันที่ 30 พบว่ากุ้งที่ได้รับสารสกัดบัวบกผสมอาหารความเข้มข้น 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเม็ดเลือดรวม $5.445 \pm 1.129 \times 10^5$ เซลล์/ มิลลิลิตร มากที่สุด (ตารางที่ 9 และแผนภูมิแท่งที่ 3)

ตารางที่ 9 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (เซลล์/มิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน (Mean ± S.E.)

กลุ่มการทดลอง (บัวบกผสมอาหาร)	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10^5 เซลล์/ มิลลิลิตร)		
	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	4.171 ± 0.436^a	2.124 ± 0.292^a	5.445 ± 1.129^a
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	2.821 ± 0.773^a	1.882 ± 0.304^a	1.571 ± 0.115^a
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	7.990 ± 2.593^a	3.482 ± 0.586^a	3.784 ± 1.537^a
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg	8.519 ± 3.259^a	3.141 ± 0.810^a	3.453 ± 0.433^a

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันในระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P>0.05$)



แผนภูมิแท่งที่ 3 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (เซลล์/มิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน

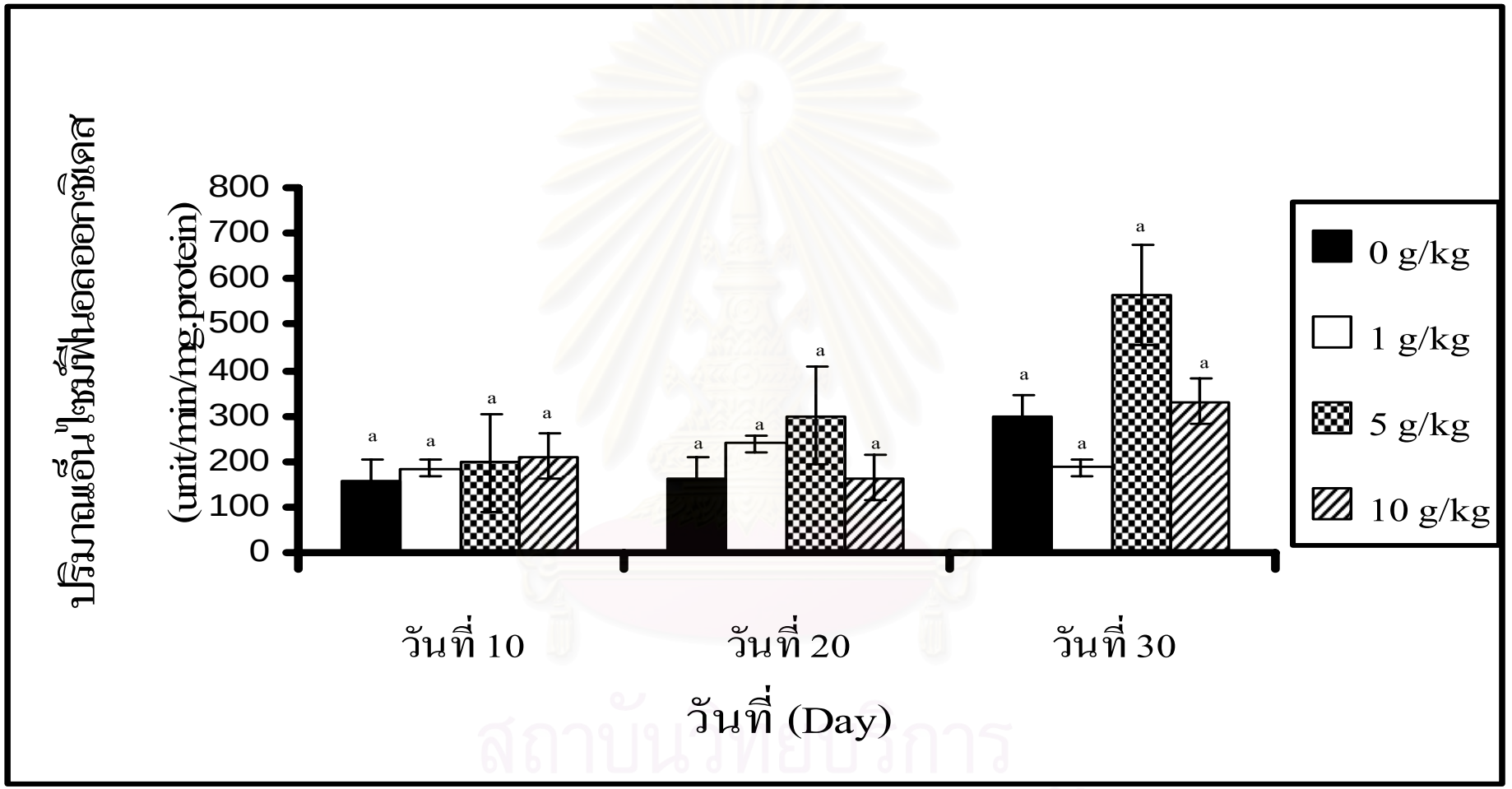
4.3.2 ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity)

การวิเคราะห์ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg.protein) พบว่า ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารสกัดบัวบกความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ในวันที่ 10 พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส 211.00 ± 32.75 unit/min/mg.protein สูงที่สุด ส่วนในวันที่ 20 และ 30 ของการวัดปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส 300.50 ± 48.22 และ 563.75 ± 147 unit/min/mg protein ตามลำดับ มีค่าสูงที่สุด (ตารางที่ 10 และแผนภูมิแท่งที่ 4)

ตารางที่ 10 ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg. protein) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน (Mean ± S.E.)

กลุ่มการทดลอง (บัวบกผสมอาหาร)	ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg. protein)		
	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	185.50 ± 61.941[a]	239.00 ± 53.92[a]	187.25 ± 59.51[a]
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	196.50 ± 28.79[a]	300.50 ± 48.22[a]	563.75 ± 147.88[a]
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	211.00 ± 32.75[a]	162.25 ± 17.19[a]	329.50 ± 91.09[a]
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg	155.75 ± 11.99[a]	162.50 ± 14.59[a]	298.75 ± 133.82[a]

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันในระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P>0.05)



แผนภูมิแท่งที่ 4 ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg. protein) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน

4.3.3 ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity)

เมื่อทำการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารผสมสารสกัดบัวบกความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0, 1, 5 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 1 เดือน โดยทำการเจาะเลือดกุ้งขาวแวนนาไมทุก ๆ 10 วัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วทำการแยกเม็ดเลือดออกจากน้ำเลือดกุ้ง หลังจากนั้นทำการเจือจางซีรั่มโดยใช้ NaCl 2.6 % ในอัตราส่วนต่าง ๆ ได้แก่ 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, และ 1:32 โดยให้ปริมาณซีรั่ม 0.5 มิลลิลิตร และใส่เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* ที่เลี้ยงในอาหาร TSA + 1% NaCl ที่อุณหภูมิ 30 ˚C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่า OD ได้ 0.165 ในวันที่ 10, 0.141 ในวันที่ 20 และ 0.101 ในวันที่ 30 เมื่อทำการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA + 1% NaCl ได้ 1.93×10^7 CFU/ml. ในวันที่ 10, 1.57×10^7 CFU/ml. ในวันที่ 20 และ 1.32×10^7 CFU/ml. ในวันที่ 30 โดยใส่เชื้อแบคทีเรียหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการนับเชื้อ *Vibrio vulnificus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS เพื่อหาปริมาณของซีรั่มที่สามารถทำให้เชื้อ *Vibrio vulnificus* ลดลงได้ 50 % โดยเทียบกับกับกลุ่มควบคุมซึ่งใช้น้ำเกลือ 1.5 % จำนวน 0.5 มิลลิลิตร แทนการใช้ซีรั่ม พบว่า ค่าการเจือจางต่ำสุดของซีรั่มที่ทำให้แบคทีเรียลดลง 50 % ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ในกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารสกัดบัวบกความเข้มข้นต่าง กับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 11) ส่วนจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 1, 5 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ในระหว่างกลุ่มด้วยกัน (ตารางที่ 12 และแผนภูมิแท่งที่ 5)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

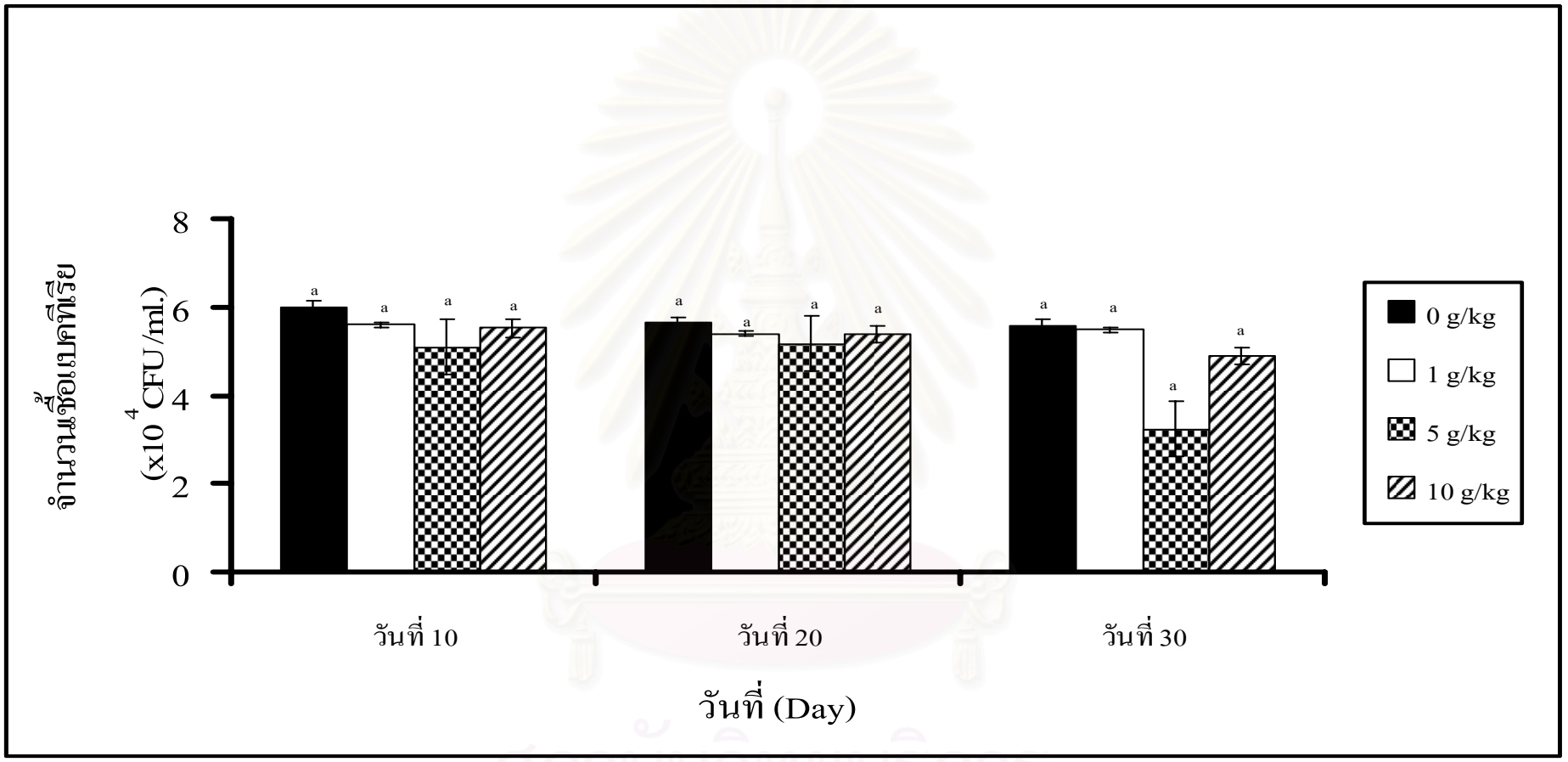
ตารางที่ 11 ค่าการเจือจางต่ำสุดของน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน ที่ทำให้แบคทีเรียลดลงร้อยละ 50

กลุ่มการทดลอง (บัวบกผสมอาหาร)	จำนวนเชื้อแบคทีเรีย (x 10^4 CFU/ml.)		
	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	1:32	1:32	1:32
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	1:32	1:32	1:32
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	1:32	1:32	1:32
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg	1:32	1:32	1:32

ตารางที่ 12 จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่พบเมื่อสิ้นสุดการหาค่าความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน (Mean ± S.E.)

กลุ่มการทดลอง (บัวบกผสมอาหาร)	จำนวนเชื้อแบคทีเรีย (x 10^4 CFU/ml.)		
	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	5.5978 ± 0.8327[a]	5.4014 ± 0.4294[a]	5.4937 ± 0.9835[a]
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	5.0992 ± 0.6955[a]	5.1734 ± 0.2328[a]	3.2345 ± 0.7573[a]
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	5.5169 ± 0.9419[a]	5.3978 ± 0.3256[a]	4.8900 ± 0.6178[a]
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg	6.0003 ± 0.3388[a]	5.6504 ± 0.3620[a]	5.5884 ± 0.5770[a]

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันในระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P>0.05)



แผนภูมิแท่งที่ 5 จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่พบเมื่อสิ้นสุดการหาค่าความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น ต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน

4.3.4 ผลการเปรียบเทียบ ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte count), ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) และ ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) ในวันที่ 10 ของการให้อาหารที่ผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เมื่อนำพารามิเตอร์การวัดระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ ในวันที่ 10 มาเปรียบเทียบกัน พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบในกลุ่มที่ 4 (0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) มีปริมาณเม็ดเลือดรวมมากที่สุด คือ 8.519 ± 3.259 รองลงมา คือ กลุ่มที่ 3 (10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) 7.990 ± 2.593, กลุ่มที่ 1 (1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) 4.171 ± 0.436 และกลุ่มที่ 2 (5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) 2.821 ± 0.773 x 10^5 เซลล์/ มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบในกลุ่มที่ 3 มีปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส สูงที่สุด คือ 211.00 ± 32.75 รองลงมาคือ กลุ่มที่ 2 196.50 ± 28.79, กลุ่มที่ 1 185.50 ± 61.941 และกลุ่มที่ 4 155.75 ± 11.99 unit/min/mg. protein ตามลำดับ ส่วนจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่พบเมื่อสิ้นสุดการหาค่าความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) ของกุ้งที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ พบว่า กลุ่มที่ 2 มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดน้อยที่สุดคือ 5.0992 ± 0.6955 รองลงมาคือ กลุ่มที่ 3 5.5169 ± 0.9419, กลุ่มที่ 1 5.5978 ± 0.8327 และกลุ่มที่ 4 6.0003 ± 0.3388 x 10^4CFU/ml. ตามลำดับ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (เซลล์/มิลลิลิตร),ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg. protein) และจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่พบเมื่อสิ้นสุดการหาค่าความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10 วัน (Mean ± S.E.)

	Total haemocyte count (x 10^5 เซลล์/ มิลลิลิตร)	**Phenoloxidase activity (unit/min/mg. protein)**	**จำนวนเชื้อแบคทีเรีย (x 10^4CFU/ml.)**
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	4.171 ± 0.436[a]	185.50 ± 61.941[a]	5.5978 ± 0.8327[a]
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	2.821 ± 0.773[a]	196.50 ± 28.79[a]	5.0992 ± 0.6955[a]
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	7.990 ± 2.593[a]	211.00 ± 32.75[a]	5.5169 ± 0.9419[a]
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg	8.519 ± 3.259[a]	155.75 ± 11.99[a]	6.0003 ± 0.3388[a]

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันในระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P>0.05)

4.3.5 ผลการเปรียบเทียบ ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte count), ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) และ ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) ในวันที่ 20 ของการให้อาหารที่ผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เมื่อนำพารามิเตอร์การวัดระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ ในวันที่ 20 มาเปรียบเทียบกัน พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบในกลุ่มที่ 3 (10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) มีปริมาณเม็ดเลือดรวมมากที่สุด คือ 3.482 ± 0.586 รองลงมาคือ กลุ่มที่4 (0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) 3.141 ± 0.810, กลุ่มที่ 1 (1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) 2.124 ± 0.292 และกลุ่มที่ 2 (5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) 1.882 ± 0.304 x10^5เซลล์/ มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบในกลุ่มที่ 2 มีปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส สูงที่สุด คือ 300.50 ± 48.22 รองลงมาคือ กลุ่มที่ 1 239.00 ± 53.92 , กลุ่มที่ 4 162.50 ± 14.59 และกลุ่มที่ 3 162.25 ± 17.19 unit/min/mg.protein ตามลำดับ ส่วนจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่พบเมื่อสิ้นสุดการหาค่าความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) ของกุ้งที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ พบว่า กลุ่มที่ 2 มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดน้อยที่สุดคือ 5.1734 ± 0.2328 รองลงมาคือ กลุ่มที่ 3 5.3978 ± 0.3256 , กลุ่มที่ 1 5.4014 ± 0.4294 และกลุ่มที่ 4 5.6504 ± 0.3620 x10^4 CFU/ml.ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (เซลล์/มิลลิลิตร),ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg. protein) และจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่พบเมื่อสิ้นสุดการหาค่าความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 20 วัน (Mean ± S.E.)

	Total haemocyte count (x 10^5 เซลล์/ มิลลิลิตร)	**Phenoloxidase activity (unit/min/mg. protein)**	**จำนวนเชื้อแบคทีเรีย (x 10^4CFU/ml.)**
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	2.124 ± 0.292 [a]	239.00 ± 53.92 [a]	5.4014 ± 0.4294 [a]
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	1.882 ± 0.304 [a]	300.50 ± 48.22 [a]	5.1734 ± 0.2328 [a]
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	3.482 ± 0.586 [a]	162.25 ± 17.19 [a]	5.3978 ± 0.3256 [a]
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg	3.141 ± 0.810 [a]	162.50 ± 14.59 [a]	5.6504 ± 0.3620 [a]

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันในระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P>0.05)

4.3.6 ผลการเปรียบเทียบ ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte count), ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) และ ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) ในวันที่ 30 ของการให้อาหารที่ผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เมื่อนำพารามิเตอร์การวัดระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ ในวันที่ 30 มาเปรียบเทียบกัน พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบในกลุ่มที่ 1 (1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) มีปริมาณเม็ดเลือดรวมมากที่สุด คือ 5.445 ± 1.129 รองลงมาคือ 3 (10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) 3.784 ± 1.537, กลุ่มที่4 (0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) 3.453 ± 0.433 และกลุ่มที่ 2 (5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) 1.571 ± 0.115 x10^5 เซลล์/ มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบในกลุ่มที่ 2 มีปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส สูงที่สุด คือ 563.75 ± 147.88 รองลงมาคือ กลุ่มที่ 3 329.50 ± 91.09, กลุ่มที่ 4 298.75 ± 133.82 และกลุ่มที่ 1 187.25 ± 59.51 unit/min/mg.protein ตามลำดับ ส่วนจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่พบ เมื่อสิ้นสุดการหาค่าความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) ของกุ้งที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ พบว่า กลุ่มที่ 2 มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดน้อยที่สุดคือ 3.2345 ± 0.7573 รองลงมาคือ กลุ่มที่ 3 4.8900 ± 0.6178, กลุ่มที่ 1 5.4937 ± 0.9835 และกลุ่มที่ 4 5.5884 ± 0.5770 x10^4 CFU/ml.ตามลำดับ (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (เซลล์/มิลลิลิตร),ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg. protein) และจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่พบเมื่อสิ้นสุดการหาค่าความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน (Mean ± S.E.)

	Total haemocyte count (x 10^5 เซลล์/ มิลลิลิตร)	**Phenoloxidase activity (unit/min/mg. protein)**	**จำนวนเชื้อแบคทีเรีย (x 10^4CFU/ml.)**
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	5.445 ± 1.129 [a]	187.25 ± 59.51 [a]	5.4937 ± 0.9835 [a]
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	1.571 ± 0.115 [a]	563.75 ± 147.88 [a]	3.2345 ± 0.7573 [a]
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	3.784 ± 1.537 [a]	329.50 ± 91.09 [a]	4.8900 ± 0.6178 [a]
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg	3.453 ± 0.433 [a]	298.75 ± 133.82 [a]	5.5884 ± 0.5770 [a]

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันในระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P>0.05)

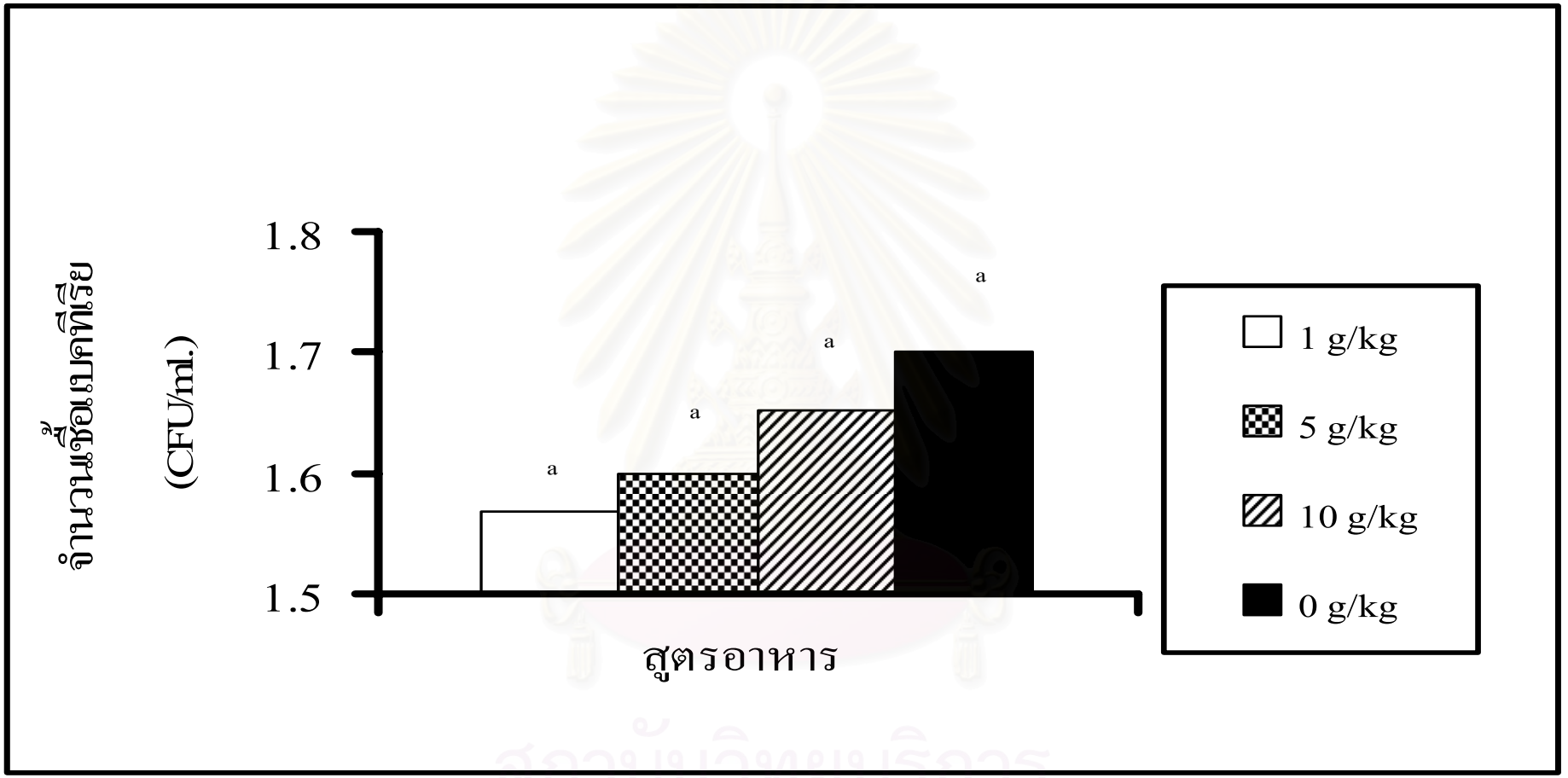
4.3.7 ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียนของกุ้งขาวแวนนาไม (Clearance ability of bacteria)

หลังจากกุ้งขาวแวนนาไม น้ำหนัก 15-20 กรัมได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน จะทำการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียน (Clearance ability of bacteria) ของกุ้งขาวแวนนาไมโดยใช้เชื้อ *Vibrio vulnificus* ที่เลี้ยงในอาหาร TSA + 1% NaCl ที่อุณหภูมิ 30 ˚C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่า OD ได้ 0.111 เมื่อทำการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA + 1% NaCl ได้ 7.5 x 10^6 CFU/ml. ฉีดเข้ากุ้งตัวละ 0.1 มิลลิลิตร บริเวณกล้ามเนื้อลำตัวปล้องที่ 6 เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง โดยแต่ละกลุ่มทดลองจะมีกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือแทนเชื้อปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการเจาะเลือดกุ้งในแต่ละกลุ่มมาเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS พบว่าเมื่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบในทุกๆ ความเข้มข้น กุ้งมีความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียน ไม่แตกต่างกันกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียสูงสุดตามลำดับ โดยพบว่ามีจำนวนเชื้อแบคทีเรียในเลือด ดังนี้ 1.5680 ± 0.01985, 1.6000 ± 0.05874, 1.6520 ± 0.02956 และ 1.7000 ± 0.01817CFU/ml. (ตารางที่ 16 และแผนภูมิแท่งที่ 6)

ตารางที่ 16 ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียน (Clearance ability of bacteria) ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง (Mean ± S.E.)

กลุ่มการทดลอง (บัวบกผสมอาหาร)	จำนวนเชื้อแบคทีเรีย (CFU/ml.)
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	1.5680 ± 0.01985[a]
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	1.6000 ± 0.05874[a]
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	1.6520 ± 0.02956[a]
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg	1.7000 ± 0.01817[a]

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันในระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P>0.05$)



แผนภูมิแท่งที่ 6 ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียน (Clearance ability of bacteria) ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

4.3.8 การรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม

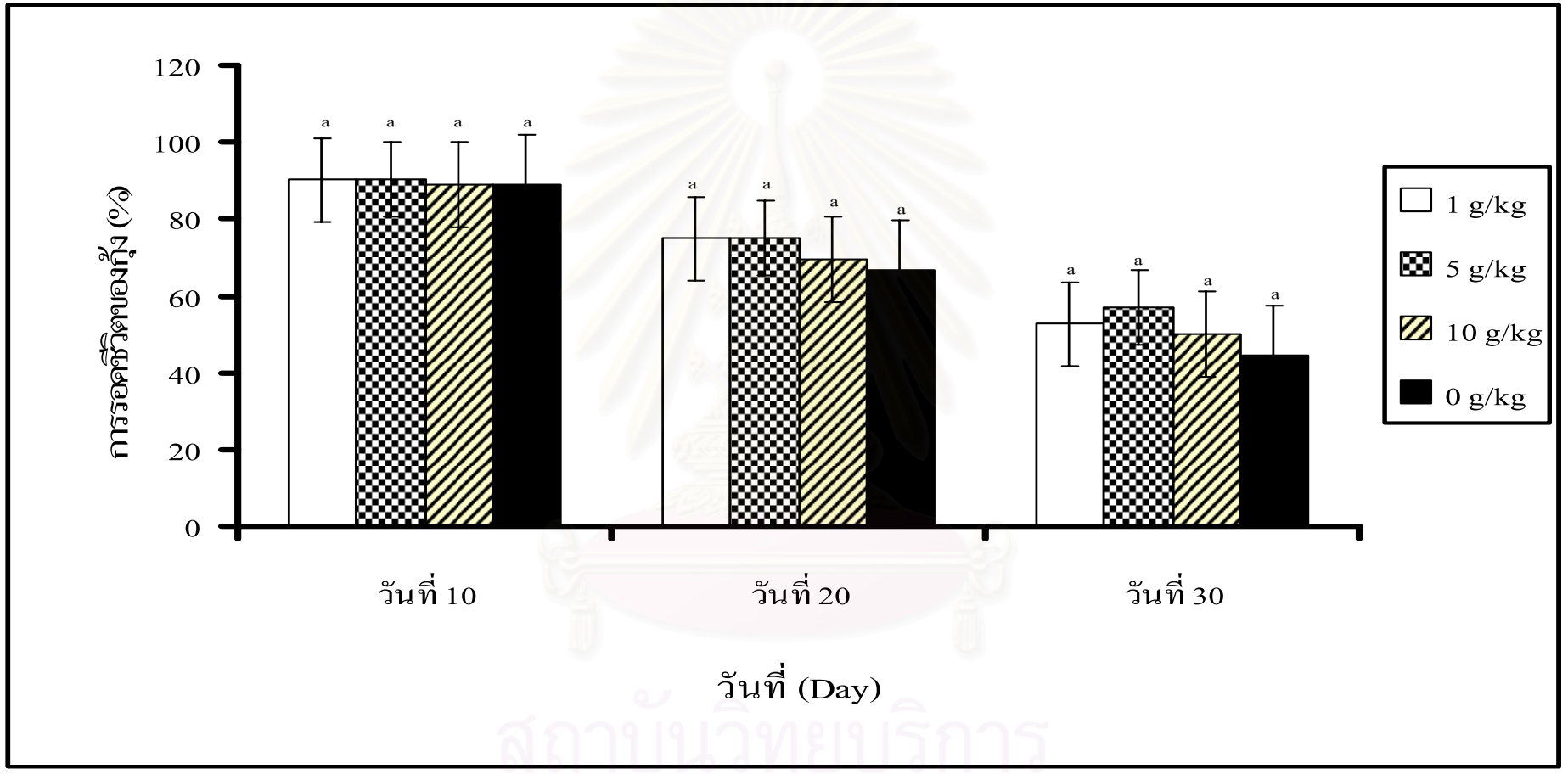
การรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารสกัดบัวบกความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ในวันที่ 10 พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 1 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม การรอดชีวิตของกุ้งมากที่สุด คือ 90.27 ± 2.66 % ในวันที่ 20 พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 1 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีการรอดชีวิตของกุ้ง 74.99 ± 3.59 % มากที่สุด ส่วนในวันที่ 30 พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีการรอดชีวิตของกุ้ง 56.94 ± 4.17 % มากที่สุด (ตารางที่ 17 และแผนภูมิแท่งที่ 7)

ตารางที่ 17 การรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน (Mean ± S.E.)

กลุ่มการทดลอง (บัวบกผสมอาหาร)	การรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม (%)		
	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	90.27 ± 2.66[a]	74.99 ± 3.59[a]	52.78 ± 3.59[a]
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	90.27 ± 2.66[a]	74.99 ± 3.59[a]	56.94 ± 4.17[a]
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	88.88 ± 2.27[a]	69.44 ± 1.61[a]	50.00 ± 2.27[a]
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg	88.88 ± 2.27[a]	66.66 ± 2.27[a]	44.44 ± 2.27[a]

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันในระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P>0.05)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภูมิแท่งที่ 7 การรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบด้านความคุ้มโรคต่อเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL15 โดยใช้สารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 0, 1, 5 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยในครั้งที่ 1 ให้ลูกกุ้งกินอาหารที่ผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบเป็นระยะเวลา 15 วัน และในครั้งที่ 2 ให้ลูกกุ้งกินอาหารที่ผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่า อัตรารอดชีวิตของกุ้งในแต่ละความเข้มข้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยอัตรารอดชีวิตของกุ้งหลังจากจุ่มเชื้อ *Vibrio vulnificus* ครั้งที่ 1 ในวันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 พบว่า กุ้งในกลุ่มที่ 2 คือ กุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ ความเข้มข้น 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตรารอดชีวิตของกุ้งสูงที่สุด ส่วนอัตรารอดชีวิตของกุ้ง หลังจากแช่ชื้อ *Vibrio vulnificus* ครั้งที่ 2 ในวันที่ 1 และวันที่ 2 พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในแต่ละกลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) วันที่ 3, 4, 5 และ 6 พบว่า กุ้งในกลุ่มที่ 2 มีอัตรารอดชีวิตของกุ้งสูงที่สุด วันที่ 7 พบว่ากุ้งในกลุ่มที่ 1 คือ กุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ ความเข้มข้น 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตรารอดชีวิตของกุ้งสูงที่สุด

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้พารามิเตอร์ในการวัดคือ ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte) พบว่าปริมาณเม็ดเลือดแดงรวมของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารสกัดบัวบกความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ในวันที่ 20 พบว่ากุ้งที่ได้รับสารสกัดบัวบกผสมอาหารความเข้มข้น 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเม็ดเลือดรวมมากที่สุด รองลงมาคือ 0, 1 และ 5 ตามลำดับ ส่วนในวันที่ 30 พบว่ากุ้งที่ได้รับสารสกัดบัวบกผสมอาหารความเข้มข้น 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเม็ดเลือดมากที่สุด รองลงมาคือ 10, 0 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้พารามิเตอร์ในการวัดคือ ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) พบว่า ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารสกัดบัวบกความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ในวันที่ 10 ของการวัดปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุด รองลงมาคือ 5, 1 และ 0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ส่วนในวันที่ 20 และ 30 ของการวัดปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส มีค่าสูงที่สุด ตามลำดับ

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้พารามิเตอร์ในการวัดคือ ความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity)พบว่าค่าการเจือจางต่ำสุดของน้ำเลือดที่ทำให้แบคทีเรียลดลง 50 % ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) ในกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารสกัดบัวบกความเข้มข้นต่าง ๆ กับกลุ่มควบคุม ส่วนจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่พบเมื่อสิ้นสุดการหาค่าความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 1, 5 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) แต่พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดเมื่อสิ้นสุดการหาค่าความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมน้อยที่สุด หลังจากได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบเป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบ ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมระยะตัวเต็มวัย โดยใช้พารามิเตอร์ในการวัดคือ ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียน (Clearance ability of bacteria) พบว่าเมื่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบในทุกๆ ความเข้มข้น กุ้งมีความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียน ไม่แตกต่างกันกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกความเข้มข้น 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 5, 10 และ 0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ตามลำดับ

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte), ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity), ความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) และความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียน (Clearance ability of bacteria) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารสกัดบัวบกความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กิจการและคณะ (2543) ได้ทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 0.6, 1.5 และ 6.5 กรัม ด้วยอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (β-glucans:MacroGard® ได้จาก *Saccharomyces cerevisiae*) 4 ระดับ คือ 0, 0.25, 0.50 และ1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม พบว่าเมื่อกุ้งได้รับสารเบต้ากลูแคน 1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตรารอดชีวิต ปริมาณเม็ดเลือดรวม การผลิต Superoxide anion และความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดได้ดี หลังจากได้รับอาหารผสมสารเบต้ากลูแคนเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ในขณะที่กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารเบต้ากลูแคนชุดการทดลองอื่น ๆ มีค่าใกล้เคียง กับชุดควบคุม แต่เมื่อได้รับสารเบต้ากลูแคนเป็นระยะเวลา 11 สัปดาห์ กุ้งที่ได้รับสารเบต้ากลูแคนทุกชุดการทดลองจะมีค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดสูงกว่ากุ้งในชุดควบคุม ซึ่งการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นที่เหมาะสม ต้องขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ใช้สารเหล่านั้น ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบที่น้อยที่สุดที่เลือกใช้ คิดเป็น 10 เท่าของค่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio vulnificus* ที่ใช้ในการทดลอง จากการศึกษาของ นนทวิทย์และคณะ (2547) ซึ่งได้ทดลองใช้สารเบต้ากลูแคน และเปปติโดกลัยแคนในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อศึกษาองค์ประกอบด้านภูมิคุ้มกันเกี่ยวกับปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส, Superoxide anion, ความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด และความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียนของกุ้งกุลาดำ พบว่า ความเข้มข้นของสารเบต้ากลูแคนที่เหมาะสมที่สุดคือ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยความเข้มข้นดังกล่าวสามารถที่จะเพิ่มปริมาณเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส, Superoxide anion, ความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด และความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียนของกุ้งกุลาดำได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากชุดทดลองที่ใช้เบต้ากลูแคน 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าความสัมพันธ์ของปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte) กับปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) มีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้าม กล่าวคือ ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีค่าสูง ในขณะที่เมื่อทำการนับปริมาณเม็ดเลือดรวมพบว่ามีจำนวนเม็ดเลือดรวมลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Le Moullac และคณะ (1998)

โดยทำการศึกษาในกุ้ง *Penaeus stylirostris* พบว่า ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดสจะสูงขึ้นในขณะที่ปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลง ดังเช่นการศึกษาในปู *Carcinus maenas* (Hauton และคณะ, 1995) และกุ้ง *Cragon crangon* (Smith และ Johnston, 1992)

การศึกษาปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มว่าเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดสในกลุ่มทดลองจะสูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยการเกิดเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดสจะเกิดขึ้นได้จากขบวนการ proPO activating system สามารถกระตุ้นได้จากส่วนประกอบของจุลินทรีย์ เช่น lipopolysaccharides (LPS) หรือ peptidoglycans และ β-1,3-glucans นอกจากนี้ขบวนการ proPO activating system สามารถกระตุ้นได้จากเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการทำลายและเก็บกินสิ่งแปลกปลอม (Cheng และ Chen, 2002) และพบว่ากลุ่มสารประกอบคาร์โบไฮเดรต และสารพิษชนิดต่าง ๆ ก็สามารถกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดสได้ (Soderhall และ Cerenius, 1992) ซึ่งบัวบกประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดที่สำคัญคือ Saponin glycosides ที่มีชื่อว่า Asiaticoside และ Madecassoside พบว่า Glycoside ทั้งสองชนิดนี้เมื่อผ่านขบวนการ hydrolysis จะได้น้ำตาล Glucose 2 โมเลกุล น้ำตาล Rhamnose 1 โมเลกุล (สรศักดิ์, 2539) อาจมีผลต่อปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส จึงทำให้จากการทดลองพบว่า เอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดสในกลุ่มการทดลองมีแนวโน้มที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม และสามารถพบเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดสในส่วนของน้ำเลือด 10 % (Parrazzolo และ Barracco, 1997) ดังนั้นจากการศึกษาความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดของกุ้งที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ($P>0.05$) แต่พบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียสุดท้ายที่พบในน้ำเลือดเมื่อสิ้นสุดการทดสอบความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มทดลองมีแนวโน้มพบเชื้อได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุม

ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียน (Clearance ability of bacteria) พบว่า เมื่อเลี้ยง กุ้งขาวแวนนาไม ด้วยอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบในทุกๆ ความเข้มข้น กุ้งมีความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียน ไม่แตกต่างกันกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกความเข้มข้น 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 5, 10 และ 0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ตามลำดับ โดยจากการศึกษาของ Fontaine และ Lightner (1974) เกี่ยวกับการฉีดสีคาร์มีนเข้าสู่ตัวกุ้งขาว (*Penaeus setiferus*) จะถูกเม็ดเลือดเข้ามาจับกินและเกาะกลุ่มกันภายใน 1 ชั่วโมง หลังฉีด ซึ่งเป็นขบวนการ

ตอบสนองที่ว่องไว และพบว่าเม็ดเลือดจะมีบทบาทมากในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย โดยแบคทีเรียที่เข้าสู่ร่างกายกุ้งจะถูกกำจัดอย่างรวดเร็วพร้อม ๆ กับปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนที่ลดลงอย่างรวดเร็ว (Martin และ คณะ, 1993)

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า การรอดชีวิตของกุ้งในแต่ละกลุ่มการทดลองที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ และกลุ่มควบคุม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แสดงว่าสารสกัดบัวบกอย่างหยาบไม่มีผลข้างเคียง เมื่อเปรียบเทียบอัตรารอดชีวิตของกุ้งขาว-แวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 0, 1, 5 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ตลอดระยะเวลาทดลอง 30 วัน และจากการศึกษาของ Farnsworth และ Bunyapraphatsara (1992) เกี่ยวกับความเป็นพิษเฉียบพลันของหนู (mouse) ไม่แสดงอาการเมื่อใช้ความเข้มข้นสารสกัดบัวบกที่สกัดด้วย 50% เอทานอล 1 กรัม/กิโลกรัม และในกรณีที่ใช้สารสกัดบัวบกความเข้มข้น 40-50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ฉีดเข้ากล้ามเนื้อของหนู (mice) และกระต่าย พบว่าความเข้มข้นที่ใช้มีความเป็นพิษต่อสัตว์ และความเข้มข้นของสารสกัดบัวบกที่สามารถใช้ในหนู (mice) ได้สูงสุด คือ 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (Brinkhaus และคณะ, 2000) จากการศึกษาของ Francis และคณะ (2002) เมื่อใช้สาร *Quillaja* saponin ผสมอาหารความเข้มข้น 150 และ 300 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงปลาคาร์พ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักตัวของปลาคาร์พในกลุ่มที่ได้รับสาร *Quillaja* saponin ผสมอาหารความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มที่ได้รับสาร *Quillaja* saponin ผสมอาหารความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุม ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งแสดงว่าสาร *Quillaja* saponin ที่ผสมอาหารไม่มีความเป็นพิษต่อตัวปลาถ้าให้ในขนาดปริมาณที่เหมาะสม และพบว่าบัวบกประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดที่สำคัญคือ Saponin glycosides (สรศักดิ์, 2539) ซึ่งเป็นสารกลุ่ม Saponin เดียวกันกับ *Quillaja* saponin ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า บัวบกไม่มีความเป็นพิษต่อตัวกุ้ง ถ้าให้ในขนาดปริมาณและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อตัวกุ้ง

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบด้านความคุ้มโรคเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ P15 โดยใช้สารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 0, 1, 5 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ในครั้งที่ 1 จะให้ลูกกุ้งกินอาหารที่ผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 15 วัน และ ครั้งที่ 2 จะให้ลูกกุ้งกินอาหารที่ผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่า อัตรารอดชีวิตของกุ้งในแต่ละความเข้มข้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ากลุ่มทดลองที่ให้อาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มี

อัตรารอดชีวิตของกุ้งมากกว่ากลุ่มทดลองอื่น ๆ ในขณะที่กลุ่มทดลองที่ให้อาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตรารอดชีวิตของกุ้งน้อยกว่ากลุ่มทดลองอื่น ๆ อาจเนื่องมาจากในอาหารที่ผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบในระดับที่สูงน่าจะมีผลให้กลิ่น รส และเนื้อสัมผัสของอาหารเสียไป (มะลิ และคณะ, 2547) จึงทำให้กุ้งมีการกินอาหารลดลง ร่างกายอ่อนแอ ส่งผลให้ภาวะภูมิคุ้มกันของร่างกายไม่สามารถตอบสนองในการป้องกันตัวเพื่อต่อสู้กับเชื้อ *Vibrio vulnificus* ได้ เป็นผลให้มีการตายที่มากขึ้น คล้ายคลึงกับการศึกษาของ มะลิ และคณะ (2547) พบว่า เมื่อต้องการให้กุ้งกุลาดำได้รับสารสำคัญขมิ้นชันเพิ่มสูงขึ้นอาจมีสารบางชนิดในสารขมิ้นชันในปริมาณที่มากเกินไปจนมีผลไปกดระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำหรือมีผลทำลายเซลล์เนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ เกิดความอ่อนแอเมื่อได้รับเชื้อก่อโรคจะทำให้ติดเชื้อและตายง่ายขึ้น

การศึกษาครั้งนี้พบว่า ผลของการศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte), ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity), ความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) และความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียน (Clearance ability of bacteria) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารสกัดบัวบกความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ผลของการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบด้านความคุ้มโรคต่อเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL15 พบว่า อัตรารอดชีวิตของกุ้งในแต่ละความเข้มข้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมระยะตัวเต็มวัยที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ไม่มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ดังนั้นสารสกัดบัวบกอย่างหยาบน่าจะมีผลเกี่ยวข้องกับการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity) ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Kim และคณะ (1999) โดยทำการศึกษาความต้านทานของเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ใน juvenile rock-fish (*Sebastes schlegeli*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมว่านหางจระเข้ความเข้มข้น 1 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ค่าซีรั่มไลโซไซม์ (serum lysozyme activity) ไม่มีความแตกต่างกัน แต่พบว่าปลากลุ่มที่ได้รับอาหารผสมว่านหางจระเข้ความเข้มข้น 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราตายน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมว่านหางจระเข้ความเข้มข้น 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และพบว่าปลาทุกตัวที่ตายจะติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* จากการศึกษานี้พบว่า การให้อาหารที่ผสมว่านหางจระเข้ในขนาดปานกลางจะช่วยควบคุมเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ใน juvenile rock-fish ได้ ซึ่งเช่นเดียวกับการศึกษาในบัวบกครั้งนี้ พบว่า สารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม

มีอัตราตายของกุ้งน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดบัวบกอย่างหยาบความเข้มข้น 0, 1 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ดังนั้น การให้อาหารที่ผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบในขนาดปานกลาง (5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) จะช่วยในการควบคุมการติดเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไมได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ในการใช้สารสกัดบัวบกอย่างหยาบกระตุ้นภูมิคุ้มกันควรใช้ในปริมาณที่เหมาะสม ถ้าความเข้มข้นที่ใช้มากเกินไปอาจส่งผลกระทบต่อการกินอาหาร และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

5.3.2 ควรศึกษาผลกระทบของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่ออวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันทางลักษณะทางจุลกายวิภาคของกุ้งขาวแวนนาไม

5.3.3 ควรมีการศึกษาทดลองประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกกับสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ

5.3.4 ควรมีการควบคุมปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ ที่จะส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อลดปัญหาความผันแปรและความคลาดเคลื่อนในการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กมลศิริ พันธนียะ. 2546. “กุ้งขาวลิโทพีเนียส แวนนาไม” [Online].Available from : http://www.nicaonline.com /articles2/ site/view_article.asp?darticle=125

กิจการ ศุภมาตย์, อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์, Itami, T. และ จิราพร เกษรจันทร์. 2543. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. ว.สงขลานครินทร์ วทท 22 (ฉบับพิเศษ):568-579.

กิจการ ศุภมาตย์ และ สิทธิ บุณยรัตผลิน. 2538. การศึกษาภูมิคุ้มกันโรคและแนวทางการใช้วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ :1-17.

ขุนพล พงษ์มณี, กฤษ อังคนาพร และ สุวรรณา กิจภากรณ์. 2547. ผลของบัวบกต่อคุณลักษณะการเจริญเติบโต ปริมาณเอนไซม์จากเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็ก. การประชุมสมุนไพรไทยโอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : ตีรณสาร, 188-193.

ชัยวัฒน์ สุวรรณทัต, สุวรรณา กิจภากรณ์, กฤษ อังคนาพร, พิภพ สดสี และ นันทวัน บุณยะประภัศร. 2547. การใช้ขมิ้นชันเป็นสารต้านอ๊อกซิเดชั่นต่อสถานภาพภูมิคุ้มกันและสมรรถภาพการเจริญเติบโตของไก่เนื้อซึ่งอยู่ในภาวะเครียด. การประชุมสมุนไพรไทยโอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์. ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : ตีรณสาร, 181-187.

ถนอมศรี วงศ์รัตนาสถิตย์. 2538. เอกลักษณ์สมุนไพร. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 48-53.

บงกช นพผล, เสรี แข็งแอ, วสันต์ จันทรสนิท และ พิทักษ์ น้อยเมล์. 2547. ผลของข่าผลต่อระดับภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิลในไก่เนื้อ. การประชุมสมุนไพรไทยโอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์. ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : ตีรณสาร, 20-23.

ประจวบ หลำอุบล. 2543. เสวนาวิชาเรื่องกุ้ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 1-7.

ประภัสรา กันภัย, วรศักดิ์ ปัจฉิมะศิริ, สุนทรานี ทองใหญ่, อรุณี อิงคากุล และ ชนินทร์ ติรวัฒนวานิช. 2547. ผลของกวาวเครือขาวต่อระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงและผลผลิตไข่ในไก่ไข่. การประชุมสมุนไพรไทยโอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์. ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : ตีรณสาร, 1-7.

พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ. 2534. คู่มือการใช้สมุนไพร. ครั้งที่ 5. กรุงเทพมหานคร : เมดีคัล มีเดีย, 102-322.

นนทวิทย์ อารีย์ชน, วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล, องอาจ เลาหวินิจ และจิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. 2547. การใช้สารเบต้ากลูแคนและเปปติโดกลัยแคนในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. การสัมมนาเผยแพร่ผลงานวิจัย เพื่อแก้ปัญหาอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร : เฟื่องฟ้า, 218-232.

มะลิ บุณยรัตผลิน, นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, กิจการ ศุภมาตย์, ธนาวุฒิ กล่าวเกลี้ยง และ ฐานันดร์ ทัตตานนท์. 2547. ผลของสมุนไพรไทย 3 ชนิดต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค การเจริญเติบโต อัตรารอดชีวิต สุขภาพกุ้ง และความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ. การสัมมนาเผยแพร่ผลงานวิจัย เพื่อแก้ปัญหาอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร : เฟื่องฟ้า, 127-142.

ยอดยิ่ง เทพธรานนท์. 2540. วัคซีนสำหรับกุ้งกุลาดำและกุ้งสกุลอื่น ๆ ในสกุล Penaeus : หลักการรายละเอียดของวัคซีนที่มีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันและกำจัดโรคและผลของการใช้วัคซีนกับกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*, Fobricus). กรุงเทพมหานคร : บางแคการพิมพ์, 127-147.

ศิริพร โอโกโนกิ, กฤษฎากรณ์ พริ้งเพราะ และ จิราภารณ์ เลิศโภคานนท์. 2547. ฤทธิ์ของข่าต่อการยับยั้งเชื้อโรคจากทางเดินอาหารของสุกร. การประชุมสมุนไพรไทยโอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์. ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : ตีรณสาร, 106-111.

สรศักดิ์ เหลี่ยวไชยพันธุ์. 2529. ตำราเภสัชเวท. เล่ม 1. เรื่องพฤษธาตุ : กลัยโคไซด์. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 88-91.

สาโรช ค้าเจริญ, บังอร ศรีพานิชกุลชัย, เยาวมาลย์ ค้าเจริญ, คมกริช พิมพ์ภักดี และ พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา. 2547. การศึกษาและพัฒนาการผลิตและการใช้สมุนไพรกระเทียม ฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันทดแทนสารต้านจุลชีพและสารสังเคราะห์เติมอาหารไก่และสุกร. การประชุมสมุนไพรไทยโอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์. ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : ตีรณสาร, 145-162.

สุชาดา ประเสริฐวิทยาการ และ ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ. 2541. รายงานผลการวิจัยเจลบัวบกยึดติดเยื่อบุเมือกในช่องปาก. กรุงเทพมหานคร : คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 6-11.

สุดสรร ศิริไวทยพงศ์. 2547. คู่มือสมุนไพรในการผลิตสัตว์ 2 : การวิจัยสมุนไพรในสัตว์เลี้ยง. กรุงเทพมหานคร : ตีรณสาร, 44-46.

เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. 2518. ไม้เทศเมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์เกษมบรรณากิจ.

อรทัย ไตรวุฒานนท์, อรรถวุฒิ พลายบุญ, อรประพันธ์ ส่งเสริม และ สุชาติ สงวนพันธุ์. 2547. การใช้สมุนไพรแทนนินสูง (ใบชา) ต่อสมรรถภาพการผลิตไข่ของนกกระทาญี่ปุ่น. การประชุมสมุนไพรไทยโอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์. ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : ตีรณสาร, 81-85.

อาทินันท์ ประสมพงศ์. 2546. “เทคนิคการเลี้ยงกุ้งขาวลิโทพีเนียสแวนนาไม.” [Online]. Available from : http://www.nicaonline.com/ articles2/ site/view_article.asp?darticle=135

ภาษาอังกฤษ

Arms, K. and Camp, P.S. 1991. Biology : A Journey Into Life. 2nd ed. Philadelphia:W.B. Saunders, 399-403.

Babu, T.D., Kuttan, G. and Padikkala, J. 1995. Cytotoxic and anti-tumour properties of certain taxa of Umbelliferae with special reference to *Centella asiatica* (L.) Urban. Journal of Ethnopharmacology 48:53-57.

Barnes, J., Anderson, L.A. and Phillipson, J.D. 1996. Herbal medicines:A guide for healthcare professionals. London:Pharmaceutical Press, 303-305.

Boiteau, P.and Ratsimamanga, A.R. 1956. Asiaticoside extracted from *Centella asiatica*, its therapeutic uses in the healing of experimental or refractory wounds, leprosy, skin turberculosis and lupus. Therapie 11:125-149.

Brandford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.

Brinkhaus, B., Lindner, M., Schuppan, D. and Hahn, G. 2000. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. Phytomedicine 7 (5):427-448.

Brivio, M.F., Pagani, M. and Scari, G. 1992. Biochemical evidence of phenoloxidase activity (pro-PO) system in larvae of *Allogamus auricollis* (Insecta, Trichoptera). Comparative Biochemistry and Physiology 102B:867-871.

Bodihipaksha, N. 1994. Effects of methyl parathion on the cellular immune responses in giant black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Degree of Doctor of Philosophy. The faculty of the school of Marine Science. The college of William and Mary in Virginia. 23-30.

Cheng, W. and Chen, J.C. 2001. Effect of intrinsic and extrinsic factors on the haemocyte profile of the prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). Fish and Shellfish Immunology 11:53-63.

Cheng, W. and Chen, J.C. 2002. The virulence of *Enterococcus* to freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its immune resistance under ammonia stress. Fish and Shellfish Immunology 12:97-109.

Cheng, C.L. and Koo, M.W.L. 2000. Effects of *Centella asiatica* on ethanol induced gastic mucosal lesions in rats. Life Sciences 67:2647-2653.

Cornick, J.W. and Stewart, J.E. 1968. Interaction of the pathogen, *Gaffkya homari* with natural defense mechanisms of *Homarus americanus*. Journal of Invertebrate Pathology 25:695-709.

Evans, E.E., Painter, B., Evans, M.L., Weinheimer, P. and Acton, R.T. 1968. An induced bactericidin in spiny lobster, *Penulirus argus*. Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine 128:394-398.

Farnsworth, N.R. and Bunyapraphatsara, N. 1992. Thai medicinal plants. Bangkok:Prachachon. 111-114.

Francis, G., Makkar, H.P.S. and Becker, K. 2002. Dietary supplementation with a *Quillaja* saponin mixture improves growth performance and metabolic efficiency in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Aquaculture 203:311-320.

Fontaine, C.T. and Lightner, D.V. 1974. Observations on the phagocytosis and elimination of carmine particles injected into the abdominal musculature of the white shrimp (*Penaeus setiferus*). Journal of Invertebrate Pathology 24:141-148.

Gollas-Galvan, T., Hernandez-Lopez, J. and Vargas-Albores, F. 1997. Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*). Comparative Biochemistry and Physiology 117A:419-425.

Hauton, C., Hawkins, L.E. and Williams, J.A. 1995. Circatidal rhythmicity in the activity of phenoloxidase enzyme in the common shore crab (*Carcinus maenas*). Comparative Biochemistry and Physiology 111B:374-352.

Hernandez-Lopez, J., Gollas-Galvan, T., Gomez-Jimenez, S., Portillo-Clark, G. and Vargas-Albores, F. 2003. In the spiny lobster (*Panulirus interruptus*) the prophenoloxidase in located in plasma not in haemocytes. Fish and Shellfish Immunology 14:105-114.

Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K. and Soderhall, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture 1991:45-52.

Kim, K.H., Hwang, Y.J. and Bai, S.C. 1999. Resistance to *Vibrio alginolyticus* in jumenile rockfish (*Sebastes schlegeli*) fed diets containing different doses of aloe. Aquaculture 180:13-21.

Lee, S.Y. and Soderhall, K. 2002. Early events in crustacean innate immunity. Fish and Shellfish Immunology :421-437.

Le Moullac, G., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S. and Levy, P. 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle:protection against vibriosis. Fish and Shellfish Immunology 7:227-234.

Le Moullac, G., Soyez, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J.C. and Levy, P. 1998. Effect of hypoxia stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. Fish and shellfish immunology 8:621-629.

Martin, G.G., Poole, D. Poole, Christie, Hose, J.E., Arias, M., Reynolds, L., Makrell, N. and Whang, A. 1993. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the penaeid shrimp (*Sicyonia ingentis*). Journal of Invertebrate Pathology 62:308-315.

Narain, A.S. and Srivastava, P.N. 1979. Pollution-related changes in blood cell counts and blood cell clumping of the freshwater crab, *Paratelphusa spinigera*. Indian Journal of Experimental Biology 17:971-973.

Parrazzolo, L.M. and Barracco, M.A. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. Dev. Comp. Immunol 21(5):385-395.

Poizot, A. and Dumez, D. 1978. Modification of the healing kinetics after iterative exeresis in the rat. Action of titrated extract of *Centella asiatica* (TECA) on duration of healing. C R Hebd Seances Acad Sci. [D]. 286:789-792.

Ratanapo, S. and Chulavatnatol, M. 1990. Monodin a new sialic acid-specific lectin from black tiger prawn (*Penaeus monodon*). Comparative Biochemistry Physiology 97B:515-520.

Shukla, A., Rasik, A.M., Jain, G.K., Shankar, R., Kulshrestha, D.K. and Dhawan, B.N. 1999. Journal of Ethnopharmacology 65:1-11.

Smith, V.J. and Chisholm, J.R.S. 1992. Non-cellular immunity in crustacean : Review article. Fish and Shellfish Immunology 2:1-3.

Smith, V.J. and Johnston, P.A. 1992. Differential haemotoxic effect of PCB congeners in the common shrimp *Crangon crangon*. Comparative Biochemistry and Physiology 101C:641-649.

Soderhall, K. and Cerenius. 1992. Crustacean immunity. Annual Review of fish diseases 2:3-23.

Stewart, J.E. and Zwicker, B.M. 1972. Natural and induced bactericidal activities in the haemolymph of the lopster, *Homarus americanus*. Products haemocyte-plasma interaction. Canadian Journal of Microbiology 18:1499-1509.

Tyler, V.E. 1993. The honest herbal a sensible guide to the use of herbs and related remedies. New York : Pharmaceutical Products Press, 163-164.

Unestam, T. and Soderhall, K. 1977. Soluble fragments from fungal cell walls elicit defence reactions in crayfish. Nature 267:45-46.

Voigt, G.L. 2000. Hematology techniques and concepts for veterinary technicians. Ames:Iowa State University, 49-55.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์หาความว่องไวของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Cheng และ Chen (2000)

1. Cacodylate buffer ประกอบด้วย

- Sodium cacodylate 0.01 M
- Sodium chloride 0.45 M
- Calcium chloride 0.01 M
- Magnesium chloride 0.26 M

<u>วิธีการคำนวณ</u>

1.1 Sodium cacodylate ($C_2H_2AsO_2Na•3H_2O$) MW = 214 w/w

ตัวอย่างการคำนวณ ใช้ Sodium cacodylate 0.01 M เตรียม 1 ลิตร

สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$$0.01 = \frac{\text{ปริมาณ Sodium cacodylate / 214 กรัม}}{1 \text{ ลิตร}}$$

ปริมาณ Sodium cacodylate = 0.01 x 214

ปริมาณ Sodium cacodylate = 2.14 กรัม/ลิตร

ดังนั้น ต้องใช้ Sodium cacodylate ปริมาณ 2.14 กรัม ต่อน้ำ Deionized 1 ลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.01 M

1.2 Sodium chloride (NaCl) MW = 58.443 w/w

ตัวอย่างการคำนวณ ใช้ Sodium chloride 0.45 M เตรียม 1 ลิตร

สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$$0.45 = \frac{\text{ปริมาณ Sodium chloride / 58.433 กรัม}}{1 \text{ ลิตร}}$$

ปริมาณ Sodium chloride = 0.45 x 58.433

ปริมาณ Sodium chloride = 26.299 กรัม/ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดังนั้น ต้องใช้ Sodium chloride ปริมาณ 26.299 กรัม ต่อน้ำ Deionized 1 ลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.45 M

1.3 Calcium chloride ($CaCl_2$) MW = 111 w/w

ตัวอย่างการคำนวณ ใช้ Calcium chloride 0.01 M เตรียม 1 ลิตร

สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$$0.01 = \frac{\text{ปริมาณ Calcium chloride / 111}}{1 \text{ ลิตร}} \text{ กรัม}$$

ปริมาณ Calcium chloride = 0.01 x 111

ปริมาณ Calcium chloride = 1.11 กรัม/ลิตร

ดังนั้น ต้องใช้ Calcium chloride ปริมาณ 111 กรัม ต่อน้ำ Deionized 1 ลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.01 M

1.4 Magnesium chloride ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) MW = 203.31 w/w

ตัวอย่างการคำนวณ ใช้ Magnesium chloride 0.26 M เตรียม 1 ลิตร

สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$$0.26 = \frac{\text{ปริมาณ Magnesium chloride / 203.31}}{1 \text{ ลิตร}} \text{ กรัม}$$

ปริมาณ Magnesium chloride = 0.26 x 203.31

ปริมาณ Magnesium chloride = 52.861 กรัม/ลิตร

ดังนั้น ต้องใช้ Magnesium chloride ปริมาณ 52.861 กรัม ต่อน้ำ Deionized 1 ลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.26 M

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. Cacodylate – citrate buffer ประกอบด้วย

- Sodium cacodylate 0.01 M
- Sodium chloride 0.45 M
- Trisodium citrate 0.10 M

<u>วิธีการคำนวณ</u>

2.1 Sodium cacodylate ($C_2H_2AsO_2Na•3H_2O$) MW = 214 w/w

ตัวอย่างการคำนวณ ใช้ Sodium cacodylate 0.01 M เตรียม 1 ลิตร

สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$$0.01 = \frac{\text{ปริมาณ Sodium cacodylate / 214}}{1 \text{ ลิตร}} \text{ กรัม}$$

ปริมาณ Sodium cacodylate = 0.01 x 214

ปริมาณ Sodium cacodylate = 2.14 กรัม/ลิตร

ดังนั้น ต้องใช้ Sodium cacodylate ปริมาณ 2.14 กรัม ต่อน้ำ Deionized 1 ลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.01 M

2.2 Sodium chloride (NaCl) MW = 58.443 w/w

ตัวอย่างการคำนวณ ใช้ Sodium chloride 0.45 M เตรียม 1 ลิตร

สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$$0.45 = \frac{\text{ปริมาณ Sodium chloride / 58.433}}{1 \text{ ลิตร}} \text{ กรัม}$$

ปริมาณ Sodium chloride = 0.45 x 58.433

ปริมาณ Sodium chloride = 26.299 กรัม/ลิตร

ดังนั้น ต้องใช้ Sodium chloride ปริมาณ 26.299 กรัม ต่อน้ำ Deionized 1 ลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.45 M

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 Trisodium citrate ($Na_3C_6H_6O•2H_2O$) MW = 294.10 w/w

ตัวอย่างการคำนวณ ใช้ Trisodium citrate 0.10 M เตรียม 1 ลิตร

สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$$0.10 = \frac{\text{ปริมาณ Trisodium citrate / 294.10}}{1 \text{ ลิตร}} \text{ กรัม}$$

ปริมาณ Trisodium citrate = 0.10 x 294.10

ปริมาณ Trisodium citrate = 29.41 กรัม/ลิตร

ดังนั้น ต้องใช้ Trisodium citrate ปริมาณ 29.41 กรัม ต่อน้ำ Deionized 1 ลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.10 M

3. L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ($C_9H_{11}NO_4$) MW = 197.19 w/w

ใช้ L-DOPA 4 มิลลิกรัม ต่อ น้ำ Deionized 1 มิลลิลิตร

4. Trypsin

ใช้ Trypsin 1 มิลลิกรัม ต่อสารละลาย Cacodylate buffer 1 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 2 การเตรียมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant)

สูตรที่ 1 (Le Moullac และคณะ, 1998) ประกอบด้วย

- Trisodium citrate 30 mM
- Sodium chloride 338 mM
- Glucose 115 mM
- EDTA 10 mM

ปรับ pH = 7 ค่า Osmolarity = 833 mOsm/kg

1.1 Trisodium citrate ($Na_3C_6H_6O•2H_2O$) MW = 294.10 w/w

ตัวอย่างการคำนวณ ใช้ Trisodium citrate 30 mM เตรียม 1 ลิตร

สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$$30 \text{ mM} = \frac{\text{ปริมาณ Trisodium citrate / 294.10 กรัม}}{1 \text{ ลิตร}}$$

$$\frac{30}{1000} \text{M} = \frac{\text{ปริมาณ Trisodium citrate / 294.10 กรัม}}{1 \text{ ลิตร}}$$

ปริมาณ Trisodium citrate = 0.03 x 294.10

ปริมาณ Trisodium citrate = 8.823 กรัม/ลิตร

ดังนั้น ต้องใช้ Trisodium citrate ปริมาณ 8.823 กรัม ต่อน้ำ Deionized 1 ลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 30 mM

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 Sodium chloride (NaCl) MW = 58.443 w/w

ตัวอย่างการคำนวณ ใช้ Sodium chloride 338 mM เตรียม 1 ลิตร

สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$$338 \text{ mM} = \frac{\text{ปริมาณ Sodium chloride / 58.433 กรัม}}{1 \text{ ลิตร}}$$

$$\frac{338}{1000} \text{ M} = \frac{\text{ปริมาณ Sodium chloride / 58.433 กรัม}}{1 \text{ ลิตร}}$$

ปริมาณ Sodium chloride = 0.388 x 58.433

ปริมาณ Sodium chloride = 19.75 กรัม/ลิตร

ดังนั้น ต้องใช้ Sodium chloride ปริมาณ 19.75 กรัม ต่อน้ำ Deionized 1 ลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 338 mM

1.3 Glucose ($CH_2OHCH(CHOH)_4O{\bullet}H_2O$) MW = 198.17

ตัวอย่างการคำนวณ ใช้ Glucose 115 mM เตรียม 1 ลิตร

สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$$115 \text{ mM} = \frac{\text{ปริมาณ Glucose / 198.17 กรัม}}{1 \text{ ลิตร}}$$

$$\frac{115}{1000} \text{ M} = \frac{\text{ปริมาณ Glucose / 198.17 กรัม}}{1 \text{ ลิตร}}$$

ปริมาณ Sodium chloride = 0.115 x 198.17

ปริมาณ Sodium chloride = 22.7896 กรัม/ลิตร

ดังนั้น ต้องใช้ Sodium chloride ปริมาณ 22.7896 กรัม ต่อน้ำ Deionized 1 ลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 115 mM

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4 EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot H_2O$) MW = 372.24

ตัวอย่างการคำนวณ ใช้ EDTA 10 mM เตรียม 1 ลิตร

สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$$10 \text{ mM} = \frac{\text{ปริมาณ EDTA / 372.24 กรัม}}{1 \text{ ลิตร}}$$

$$\frac{10}{1000} \text{ M} = \frac{\text{ปริมาณ EDTA / 372.24 กรัม}}{1 \text{ ลิตร}}$$

ปริมาณ Sodium chloride = 0.01 x 372.24

ปริมาณ Sodium chloride = 3.7224 กรัม/ลิตร

ดังนั้น ต้องใช้ Sodium chloride ปริมาณ กรัม ต่อน้ำ Deionized 1 ลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 10 mM

สูตรที่ 2 (Cheng และ Chen, 2000) ประกอบด้วย

- Trisodium citrate 30 mM
- Sodium chloride 338 mM

ปรับ pH = 7.45 ค่า Osmolarity = 490 mOsm/kg

2.1 Trisodium citrate ($Na_3C_6H_6O \cdot 2H_2O$) MW = 294.10 w/w

ตัวอย่างการคำนวณ ใช้ Trisodium citrate 0.114 M เตรียม 1 ลิตร

สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$$0.114 \text{ M} = \frac{\text{ปริมาณ Trisodium citrate / 294.10 กรัม}}{1 \text{ ลิตร}}$$

ปริมาณ Trisodium citrate = 0.114 x 294.10

ปริมาณ Trisodium citrate = 33.5274 กรัม/ลิตร

ดังนั้น ต้องใช้ Trisodium citrate ปริมาณ 33.5274 กรัม ต่อน้ำ Deionized 1 ลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.114 M

2.2 Sodium chloride (NaCl) MW = 58.443 w/w

ตัวอย่างการคำนวณ ใช้ Sodium chloride 0.1 M เตรียม 1 ลิตร

สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$$0.1\ M = \frac{\text{ปริมาณ Sodium chloride / 58.433 กรัม}}{1\ \text{ลิตร}}$$

ปริมาณ Sodium chloride = 0.1 x 58.433

ปริมาณ Sodium chloride = 5.8433 กรัม/ลิตร

ดังนั้น ต้องใช้ Sodium chloride ปริมาณ 5.8433 กรัม ต่อน้ำ Deionized 1 ลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.1 M

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 3 การปรับค่า Osmolarity โดยการใช้ Sodium chloride

ตารางภาคผนวกที่ 1 โดยการใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดกุ้ง ดังสูตรที่ 1

Sodium chloride (NaCl)		ค่า Osmolarity (mOsm/kg)
ความเข้มข้น (mM)	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)	
100	5.8443	415
150	8.7665	504
200	11.6886	595
250	14.6108	683
275	16.0691	724

ตารางภาคผนวกที่ 2 โดยการใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดกุ้ง ดังสูตรที่ 2

Sodium chloride (NaCl)		ค่า Osmolarity (mOsm/kg)
ความเข้มข้น (mM)	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)	
150	8.7665	580
200	11.6886	668
250	14.6108	761
300	17.5329	844
350	20.4551	937
400	23.3772	1027

หมายเหตุ : เมื่อทำการวัดค่า Osmolarity ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในความเค็ม 10 ppt คือ 694 mOsm/kg ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดกุ้งตามสูตรที่ 1 และใช้ Sodium chloride (NaCl) 250 mM เนื่องจากมีค่า Osmolarity ใกล้เคียงกับของเลือดกุ้งมากที่สุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 4 บันทึกผลการตรวจคุณภาพน้ำตลอดการทดลองเกี่ยวกับผลของบัวบก (*Centella asiatica*) ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) โดยทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเป็นระยะเวลาทุก ๆ 3 วัน

4.1 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบด้านความคุ้มโรคต่อเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม

ครั้งที่	Temperature (^{o}C)	pH	DO (mg/l)	Alkalinity (mg/l)	Hardness (mg/l)	Ammonia (mg/l)	Nitrite (mg/l)	Salinity (ppt)
1	29-30	7.51-7.82	5.0-6.5	60-80	1,200-1,400	0.00-0.25	5	10
2	29-30	7.20-7.59	4.5-5.5	70-80	1,100-1,400	0.25-0.50	5	10
3	29-30	7.73-7.86	6.0-6.5	70-80	1,100-1,300	0.00-0.25	3	10
4	29-30	7.55-7.77	5.2-6.2	60-80	1,100-1,200	0.25-0.5	5	10
5	29-30	7.41-7.79	4.5-6.2	60-70	1,100-1,200	0.00-0.25	5	10
6	29-30	7.49-7.88	5.8-6.8	60-70	1,100-1,500	0.25-0.50	3	10
7	29-30	7.69-7.94	5.2-6.2	70-80	1,100-1,400	0.25-0.50	0.25	10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

ครั้งที่	Temperature (^{0}C)	pH	DO (mg/l)	Alkalinity (mg/l)	Hardness (mg/l)	Ammonia (mg/l)	Nitrite (mg/l)	Salinity (ppt)
1	29-30	7.62-7.75	5.5-6.4	80-100	1,200-1,500	0.30-0.50	5	10
2	29-30	7.46-7.63	4.5-6.2	90-140	1,500-2,000	3.00-5.00	5	10
3	29-30	7.28-7.45	5.4-6.0	90-130	2,100-2,500	0.50-1.00	5	10
4	28-29	7.63-7.88	4.8-5.9	100-120	1,800-2,200	0.50-1.00	3	10
5	27-28	7.53-7.63	5.3-6.5	70-80	1,900-2,300	1.00-2.00	5	10
6	28-29	7.39-7.74	5.6-6.6	60-80	1,500-1,800	0.25-0.50	3	10
7	26-27	7.69-7.93	5.2-6.8	60-80	1,600-1,800	0.25-0.50	5	10
8	26-27	7.95-8.03	4.6-6.0	80-100	1,600-2,100	0.00-0.25	0.5-2	10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 5 บันทึกผลการนับจำนวนกุ้งที่รอดชีวิต

5.1 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบด้านความคุ้มโรคต่อเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม หลังได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบเป็นระยะเวลา 15 วัน

บัวบกผสมอาหาร	ชุดทดลอง	จำนวนกุ้งเริ่มต้น (ตัว)	จำนวนกุ้งที่รอดชีวิตหลังจากแช่เชื้อ (ตัว)						
			วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
1 g/kg	ตู้ที่ 1	50	38	36	34	33	30	29	26
	ตู้ที่ 2	50	40	38	37	35	31	30	29
	ตู้ที่ 3	50	39	37	36	34	29	28	28
	ตู้ที่ 4	50	40	38	34	33	31	31	31
5 g/kg	ตู้ที่ 1	50	47	43	39	38	35	33	32
	ตู้ที่ 2	50	48	45	45	42	41	38	33
	ตู้ที่ 3	50	47	44	45	42	41	38	38
	ตู้ที่ 4	50	48	45	40	39	37	34	34

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัวบกผสมอาหาร	ชุดทดลอง	จำนวนกุ้งเริ่มต้น (ตัว)	จำนวนกุ้งที่รอดชีวิตหลังจากแช่เชื้อ (ตัว)						
			วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
10 g/kg	ตู้ที่ 1	50	38	35	29	28	27	25	24
	ตู้ที่ 2	50	40	37	35	30	24	22	22
	ตู้ที่ 3	50	39	37	30	29	26	25	25
	ตู้ที่ 4	50	40	36	36	30	28	27	27
0 g/kg (Positive control)	ตู้ที่ 1	50	42	34	26	20	20	20	19
	ตู้ที่ 2	50	43	33	30	26	24	24	23
	ตู้ที่ 3	50	39	35	31	21	19	19	19
	ตู้ที่ 4	50	39	34	27	27	25	23	23
0 g/kg (Negative control)	ตู้ที่ 1	50	50	38	35	30	28	26	25
	ตู้ที่ 2	50	45	42	36	32	30	26	22
	ตู้ที่ 3	50	50	43	34	29	27	27	27
	ตู้ที่ 4	50	46	39	37	33	30	27	27

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบด้านความคุ้มโรคต่อเชื้อ *Vibrio vulnificus* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม หลังได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบเป็นระยะเวลา 30 วัน

บัวบกผสมอาหาร	ชุดทดลอง	จำนวนกุ้งเริ่มต้น (ตัว)	จำนวนกุ้งที่รอดชีวิตหลังจากแช่เชื้อ (ตัว)						
			วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
1 g/kg	ตู้ที่ 1	50	40	38	34	33	30	29	26
	ตู้ที่ 2	50	40	35	30	32	31	30	29
	ตู้ที่ 3	50	38	34	33	33	31	31	29
	ตู้ที่ 4	50	39	35	34	32	31	31	29
5 g/kg	ตู้ที่ 1	50	40	38	38	35	33	32	31
	ตู้ที่ 2	50	41	40	39	37	35	34	24
	ตู้ที่ 3	50	40	38	38	35	33	32	31
	ตู้ที่ 4	50	41	40	39	37	35	34	24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัวบกผสมอาหาร	ชุดทดลอง	จำนวนกุ้งเริ่มต้น (ตัว)	จำนวนกุ้งที่รอดชีวิตหลังจากแช่เชื้อ (ตัว)						
			วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
10 g/kg	ตู้ที่ 1	50	38	34	28	27	27	25	26
	ตู้ที่ 2	50	38	37	35	28	27	26	22
	ตู้ที่ 3	50	39	38	33	29	29	27	26
	ตู้ที่ 4	50	39	38	36	29	28	28	25
0 g/kg	ตู้ที่ 1	50	36	31	31	28	23	22	17
(Positive	ตู้ที่ 2	50	47	41	37	35	31	30	25
control)	ตู้ที่ 3	50	36	31	30	29	24	23	19
	ตู้ที่ 4	50	47	41	38	36	30	29	23
0 g/kg	ตู้ที่ 1	50	42	41	39	35	33	31	31
(Negative	ตู้ที่ 2	50	39	36	35	35	34	34	32
control)	ตู้ที่ 3	50	40	39	39	35	33	32	31
	ตู้ที่ 4	50	41	38	35	35	34	33	32

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 6 บันทึกผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

6.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte count)

บัวบกผสมอาหาร	ชุดทดลอง	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10^5 เซลล์/ มิลลิลิตร)		
		วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	ตู้ที่ 1	5.285	1.820	8.720
	ตู้ที่ 2	3.720	3.000	4.110
	ตู้ที่ 3	4.400	1.890	5.150
	ตู้ที่ 4	3.280	1.788	3.800
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	ตู้ที่ 1	1.980	1.180	1.840
	ตู้ที่ 2	5.069	2.660	1.530
	ตู้ที่ 3	1.650	1.910	1.630
	ตู้ที่ 4	2.587	1.780	1.286
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	ตู้ที่ 1	14.979	2.180	3.320
	ตู้ที่ 2	2.857	4.480	1.160
	ตู้ที่ 3	8.438	2.800	8.200
	ตู้ที่ 4	5.687	4.468	2.456
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg	ตู้ที่ 1	8.348	5.481	4.750
(Control)	ตู้ที่ 2	17.775	1.900	2.950
	ตู้ที่ 3	4.500	2.950	3.120
	ตู้ที่ 4	3.456	2.234	2.995

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.2 ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity)

บัวบกผสมอาหาร	ชุดทดลอง	ปริมาณเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg. protein)		
		วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	ตู้ที่ 1	368	357	58
	ตู้ที่ 2	137	97	329
	ตู้ที่ 3	92	267	234
	ตู้ที่ 4	145	235	128
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	ตู้ที่ 1	232	237	278
	ตู้ที่ 2	117	443	758
	ตู้ที่ 3	192	276	873
	ตู้ที่ 4	245	246	346
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	ตู้ที่ 1	215	184	142
	ตู้ที่ 2	169	142	565
	ตู้ที่ 3	302	198	368
	ตู้ที่ 4	158	125	243
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg	ตู้ที่ 1	135	167	341
(Control)	ตู้ที่ 2	189	121	91
	ตู้ที่ 3	157	173	661
	ตู้ที่ 4	142	189	102

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.3 จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่พบเมื่อสิ้นสุดการหาค่าความว่องไวในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity)

บัวบกผสมอาหาร	ชุดทดลอง	จำนวนเชื้อแบคทีเรีย ($x\ 10^4$ CFU/ml.)		
		วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	ตู้ที่ 1	5.1810	4.3560	7.6230
	ตู้ที่ 2	8.0190	6.4350	3.2340
	ตู้ที่ 3	4.2240	5.2470	4.5690
	ตู้ที่ 4	4.9672	5.5678	6.5489
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	ตู้ที่ 1	4.1910	4.6860	5.0490
	ตู้ที่ 2	6.9630	4.8840	1.6830
	ตู้ที่ 3	5.3460	5.4450	3.8610
	ตู้ที่ 4	3.8970	5.6789	2.3451
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	ตู้ที่ 1	6.1180	4.6538	6.0390
	ตู้ที่ 2	7.8870	5.0497	4.6200
	ตู้ที่ 3	4.3890	5.9176	3.2670
	ตู้ที่ 4	3.6739	5.9702	5.6341
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg	ตู้ที่ 1	5.5370	6.0062	4.5540
(Control)	ตู้ที่ 2	6.5040	5.8413	6.8840
	ตู้ที่ 3	5.3060	6.1712	6.2370
	ตู้ที่ 4	6.6542	4.5832	4.6789

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.4 ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียนของกุ้ง (Clearance ability of bacteria)

บัวบกผสมอาหาร	ชุดทดลอง	จำนวนเชื้อแบคทีเรีย (CFU/ml.)	
		ฉีดเชื้อ *Vibrio vulnificus*	ฉีด 1.5 % NaCl
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	1	1.60	0
	2	1.61	0
	3	1.50	0
	4	1.55	0
	5	1.58	0
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	1	1.76	0
	2	1.54	0
	3	1.43	0
	4	1.70	0
	5	1.57	0
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	1	1.67	0
	2	1.76	0
	3	1.62	0
	4	1.60	0
	5	1.61	0
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg	1	1.76	0
(Control)	2	1.72	0
	3	1.67	0
	4	1.66	0
	5	1.69	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 7 บันทึกลักษณะกุ้งในการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

7.1 ลักษณะกุ้งในการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม หลังได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบเป็นระยะเวลา 10 วัน

บัวบกผสมอาหาร	ชุดทดลอง	ลักษณะกุ้ง		
		น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	เพศ
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	ตู้ที่ 1	10.30	11.40	เมีย
	ตู้ที่ 2	10.30	11.40	เมีย
	ตู้ที่ 3	10.00	10.90	เมีย
	ตู้ที่ 4	10.20	11.00	เมีย
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	ตู้ที่ 1	10.10	11.10	เมีย
	ตู้ที่ 2	10.20	11.30	เมีย
	ตู้ที่ 3	10.10	11.00	เมีย
	ตู้ที่ 4	10.20	11.40	เมีย
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	ตู้ที่ 1	10.20	11.20	ผู้
	ตู้ที่ 2	10.30	11.40	เมีย
	ตู้ที่ 3	10.10	11.10	ผู้
	ตู้ที่ 4	10.20	11.30	เมีย
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg (Control)	ตู้ที่ 1	10.10	11.00	ผู้
	ตู้ที่ 2	10.20	11.10	ผู้
	ตู้ที่ 3	10.20	11.30	เมีย
	ตู้ที่ 4	10.30	11.40	เมีย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.2 ลักษณะกุ้งในการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม หลังได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบเป็นระยะเวลา 20 วัน

บัวบกผสมอาหาร	ชุดทดลอง	ลักษณะกุ้ง		
		น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	เพศ
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	ตู้ที่ 1	11.30	11.40	เมีย
	ตู้ที่ 2	11.30	11.80	เมีย
	ตู้ที่ 3	11.00	10.90	ผู้
	ตู้ที่ 4	11.20	12.00	เมีย
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	ตู้ที่ 1	11.10	10.90	เมีย
	ตู้ที่ 2	11.20	11.30	ผู้
	ตู้ที่ 3	11.10	12.00	เมีย
	ตู้ที่ 4	11.20	12.20	เมีย
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	ตู้ที่ 1	11.20	12.20	ผู้
	ตู้ที่ 2	11.30	11.80	เมีย
	ตู้ที่ 3	11.10	11.40	ผู้
	ตู้ที่ 4	11.20	12.00	เมีย
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg (Control)	ตู้ที่ 1	11.10	11.00	ผู้
	ตู้ที่ 2	11.20	11.10	ผู้
	ตู้ที่ 3	11.20	11.30	เมีย
	ตู้ที่ 4	11.30	11.40	เมีย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.3 ลักษณะกุ้งในการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม หลังได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบเป็นระยะเวลา 30 วัน

บัวบกผสมอาหาร	ชุดทดลอง	ลักษณะกุ้ง		
		น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	เพศ
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	ตู้ที่ 1	12.00	12.90	เมีย
	ตู้ที่ 2	12.20	13.00	เมีย
	ตู้ที่ 3	12.30	13.20	เมีย
	ตู้ที่ 4	12.30	13.10	เมีย
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	ตู้ที่ 1	12.10	13.00	เมีย
	ตู้ที่ 2	12.20	13.20	เมีย
	ตู้ที่ 3	12.10	13.10	เมีย
	ตู้ที่ 4	12.20	13.30	เมีย
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	ตู้ที่ 1	12.10	13.00	เมีย
	ตู้ที่ 2	12.20	13.20	เมีย
	ตู้ที่ 3	12.30	13.20	เมีย
	ตู้ที่ 4	12.20	13.10	เมีย
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg	ตู้ที่ 1	12.10	13.00	ผู้
(Control)	ตู้ที่ 2	12.20	13.20	เมีย
	ตู้ที่ 3	12.20	13.10	ผู้
	ตู้ที่ 4	12.30	13.20	เมีย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.4 การศึกษาความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียนของกุ้งขาวแวนนาไม หลังได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบเป็นระยะเวลา 30 วัน

บัวบกผสมอาหาร	ชุดทดลอง	ลักษณะกุ้ง กลุ่มฉีดเชื้อ *Vibrio vulnificus*		
		น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	เพศ
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	ตู้ที่ 1	13.30	13.20	เมีย
	ตู้ที่ 2	12.30	13.00	เมีย
	ตู้ที่ 3	13.00	12.90	เมีย
	ตู้ที่ 4	13.20	13.20	เมีย
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	ตู้ที่ 1	13.10	13.20	เมีย
	ตู้ที่ 2	12.80	12.90	เมีย
	ตู้ที่ 3	13.00	12.90	เมีย
	ตู้ที่ 4	12.90	13.10	เมีย
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	ตู้ที่ 1	13.20	12.20	เมีย
	ตู้ที่ 2	13.30	12.40	เมีย
	ตู้ที่ 3	12.90	12.10	เมีย
	ตู้ที่ 4	12.80	13.00	เมีย
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg (Control)	ตู้ที่ 1	13.10	12.20	เมีย
	ตู้ที่ 2	12.80	11.80	เมีย
	ตู้ที่ 3	13.20	12.30	เมีย
	ตู้ที่ 4	13.00	12.00	เมีย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.5 การศึกษาความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียนของกุ้งขาวแวนนาไม หลังได้รับอาหารผสมสารสกัดบัวบกอย่างหยาบเป็นระยะเวลา 30 วัน

บัวบกผสมอาหาร	ชุดทดลอง	ลักษณะกุ้ง กลุ่มฉีด 1.5 % NaCl		
		น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	เพศ
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	ตู้ที่ 1	13.00	12.90	เมีย
	ตู้ที่ 2	13.20	13.20	เมีย
	ตู้ที่ 3	13.30	13.20	เมีย
	ตู้ที่ 4	12.30	13.00	เมีย
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	ตู้ที่ 1	13.00	12.90	เมีย
	ตู้ที่ 2	12.90	13.10	เมีย
	ตู้ที่ 3	13.10	13.20	เมีย
	ตู้ที่ 4	12.80	12.90	เมีย
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	ตู้ที่ 1	12.90	12.10	เมีย
	ตู้ที่ 2	13.20	12.20	เมีย
	ตู้ที่ 3	13.30	12.40	เมีย
	ตู้ที่ 4	12.80	13.00	เมีย
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg (Control)	ตู้ที่ 1	13.20	12.30	เมีย
	ตู้ที่ 2	13.00	12.00	เมีย
	ตู้ที่ 3	13.10	12.20	เมีย
	ตู้ที่ 4	12.80	11.80	เมีย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 8 บันทึกจำนวนกุ้งรอดชีวิตในการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดบัวบกอย่างหยาบต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

บัวบกผสมอาหาร	ชุดทดลอง	จำนวนกุ้ง (ตัว)	ชุดทดลอง	จำนวนกุ้งรอดชีวิต (ตัว)		
				วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30
กลุ่มที่ 1 : 1 g/kg	ตู้ที่ 1	18	ตู้ที่ 1	17	14	10
	ตู้ที่ 2	18	ตู้ที่ 2	17	15	11
	ตู้ที่ 3	18	ตู้ที่ 3	15	12	8
	ตู้ที่ 4	18	ตู้ที่ 4	16	13	9
กลุ่มที่ 2 : 5 g/kg	ตู้ที่ 1	18	ตู้ที่ 1	17	15	12
	ตู้ที่ 2	18	ตู้ที่ 2	16	14	11
	ตู้ที่ 3	18	ตู้ที่ 3	17	13	9
	ตู้ที่ 4	18	ตู้ที่ 4	15	12	9
กลุ่มที่ 3 : 10 g/kg	ตู้ที่ 1	18	ตู้ที่ 1	16	13	9
	ตู้ที่ 2	18	ตู้ที่ 2	15	12	9
	ตู้ที่ 3	18	ตู้ที่ 3	17	13	10
	ตู้ที่ 4	18	ตู้ที่ 4	16	12	8
กลุ่มที่ 4 : 0 g/kg	ตู้ที่ 1	18	ตู้ที่ 1	16	12	8
(Control)	ตู้ที่ 2	18	ตู้ที่ 2	17	13	9
	ตู้ที่ 3	18	ตู้ที่ 3	15	12	8
	ตู้ที่ 4	18	ตู้ที่ 4	16	11	7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววรรณา ศิริมานะพงษ์ เกิดเมื่อวันที่ 27 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2520 ที่กรุงเทพมหานคร จบการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา พ.ศ. 2544 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาอายุรศาสตร์ สาขาโรคสัตว์น้ำ ปีการศึกษา พ.ศ. 2545

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย