จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2540

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบมะม่วงต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง และเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

The Virucidal of *Mangifera indica* Linn. Extracts against Yellow- Head Virus and Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus on Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius)

โดย

ชลิดา ชมานนท์
ส่มภพ รุ่งสุภา
วีณา เลยพุดซา

639.543
ช251ก
ฉ.2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2540

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบมะม่วงต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง และเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

The Virucidal of *Mangifera indica* Linn. Extracts against Yellow- Head Virus and Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus on Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius)

โดย

ชลิดา ชมานนท์

สมภพ รุ่งสุภา

วีณา เคยพุดซา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

27 ต.ค. 2541

I18374037

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบมะม่วงต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

ชลิดา ชมานนท์ [1] สมภพ รุ่งสุภา [2] และ วีณา เดชพุดซา [3]

1. สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี
3. ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 18, 30 และ 42 โดยใช้วิธีชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง ได้ค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 2,200 (1,966.04-2,461.80), 2,750 (2,387.15-3,168) และ 2,900 (2,495.69-3,369.80) มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีค่าฟังก์ชันความลาดเอียงที่ช่วงเชื่อมั่น 95 % เท่ากับ 1.505 (1.393-1.625), 1.753 (1.506-2.040) และ 1.602 (1.392-1.844) ตามลำดับ คุณสมบัติต่าง ๆของน้ำระหว่างการทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย พบว่า ไม่มีผลต่ออุณหภูมิของน้ำ และความเค็ม แต่มีผลให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเป็นกรดเป็นด่าง และความเป็นด่างทั้งหมดลดลง ส่วนปริมาณแอมโมเนียทั้งหมดเพิ่มขึ้น ซึ่งยังอยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อลูกกุ้งกุลาดำ

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำโดยผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ละลายใน K-199 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10,000, 7,500, 5,000, 2,500, 1,000, 100, 10 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรกับเชื้อไวรัสหัว-เหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เจือจาง 1:1,000,000 และ 1:100,000 ตามลำดับ จากนั้นนำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนัก 7.09-15.68 กรัม แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 7 วัน พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด โดยกุ้งมีอัตรารอด 50 % ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด โดยกุ้งมีอัตรารอด 100 เปอร์เซ็นต์ คือ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ยังพบว่า การให้กุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 14.60 กรัมได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้น 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป วันละ 2 ครั้ง นาน 7 วัน สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งโดยให้ค่า phenoloxidase activity ในน้ำเลือดเพิ่มมากกว่าในกุ้งชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

The Virucidal of *Mangifera indica* Linn. Extracts against Yellow-Head Virus and Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus on Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius)

Chalida Chamanon[1] Sompop Rungsupa[2] and Weena Koeypudsa[3]

1. Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University.
2. Sichang Marine Science and Research Training Station, Sichang Island, Chonburi.
3. Veterinary Medical Aquatic Animal Research Center, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University.

Abstract

Acute toxicity test of crude extract isolated from mango leaves (*Mangifera indica* L. c.v. Khiew Sawoey) on *Penaeus monodon* postlarvae (PL) 18, 30 and 42 stages was carried out using static bioassay system. The results indicated that the LC_{50} at 24 hr was 2,200 (1,966.04-2,461.80), 2,750 (2,387.15-3,168) and 2,900 (2,495.69-3,369.80) ppm for PL18, 30 and 42, respectively. The slope function at 95 % confident limit was 1.505 (1.393-1.625), 1.753 (1.506-2.040) and 1.602 (1.392-1.844) for such larval stages. Standard water quality parameters were analysed before the experiment, at 6 hr after the treatment and at the end of the experiment. While water temperature and salinity were not changed by crude extract, pH, dissolved oxygen and total alkalinity were decreased. Total ammonia nitrogen were elevated. Nevertheless, all changes in such water parameters were still be in safety limit and should not affect the mortality of the experimental *Penaeus monodon* larvae.

A study on inhibiting effects of crude extract isolated from mango leaves (*Mangifera indica* L. c.v. Khiew Sawoey) against yellow head virus (YHV) and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV), on *Penaeus monodon* was carried out. The concentrated crude extract was diluted in medium K-199 to be 10,000, 7,500, 5,000, 2,500, 1,000, 100, 10 and 1 ppm and mixed with viral solutions diluted from our stock to the concentration of 1×10^{-6} and 1×10^{-5} for YHV and SEMBV, respectively. The resulting solution was singly intramuscular injecteded into *P. monodon* individual which are about 7.09-15.68 gm in weight. The experimental *P. monodon* was carried on culture for another week. It was found that the diluted crude extract at the concentration of 100 ppm can inhibit the mortality effects resulted from these viruses. The survival rate of *P.*

monodon in this treatment was 50 % which was not satistically significant from that of the 1 ppm diluted extract. On the basis of results from this experiments, the concentration of crude extract the completely inhibit the mortality effect of these viruses was 10,000 ppm.

More importantly, it was found that feeding of *P. monodon* (14.60 gm in weight) with diet including the crude extract at the concentration of at least 2,500 ppm twice daily for seven days can stimulate their the cellular immunity. This indicated by a significant elevation in phenoloxidase activity in the haemolymph of the treated *P. monodon* in comparision of that of the control ($p<0.01$).

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำนิยม

โครงการวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2540 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศ.ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ รศ.น.สพ.ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และผศ.ดร.พิพัฒน์ พัฒนผลไพบูลย์ ที่ให้การสนับสนุน คำปรึกษา แนะนำ ตลอดจนความช่วยเหลือต่าง ๆ จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.กมลพร ทองอุไทย ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อไวรัสเพื่อใช้ในงานวิจัย ดร.สุปราณี ชินบุตร ดร.พรเลิศ จันทร์รัชชกูล และคุณนพดล ศุกระกาญจน์ สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ที่ให้การอบรมการเตรียมเชื้อไวรัส และการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ ตลอดจนคำปรึกษา และแนะนำเป็นอย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณ คุณพิชิต ศรีมุกดา ผู้อำนวยการศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งฉะเชิงเทรา กรมประมง ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้ห้องปฏิบัติการหน่วยตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบอาหารสัตว์ ขอขอบพระคุณ หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา และหัวหน้าภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่องมือในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.พิกุล จิรวาณิชไพศาส ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ด้านพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้ง เป็นอย่างดี และดร.ศิราวุธ กลิ่นบุหงา ที่ช่วยตรวจแก้ไขบทความบางส่วน

ขอขอบคุณ คุณสุภา กลมกลึง ที่ช่วยทำงานทดลองในห้องปฏิบัติการ คุณปารุส สังข์มณี และคุณคมกริช เอี่ยมละออ ที่ช่วยจัดเตรียมอุปกรณ์การทดลองมาโดยตลอด ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล และศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง ชลบุรี ผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ในที่นี้ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

กณะผู้วิจัย

ตุลาคม 2540

สารบาญ

	หน้า
สารบาญ	(1)
สารบาญตาราง	(2)
สารบาญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
อุปกรณ์และวิธีการ	4
ผลการทดลอง	17
วิจารณ์	33
สรุปผล	42
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก	49

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบาญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. น้ำหนักแห้ง (เปอร์เซ็นต์) ของสารสกัดหยาบต่อน้ำหนักของใบมะม่วงเขียวเสวยอบแห้งก่อนการสกัด 5

2. เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 18, 30 และ 42 เมื่อสัมผัสกับสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง 20

3. ค่า LC_{50} และค่าฟังก์ชั่นความลาดเอียงที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 24 ชั่วโมงของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 18, 30 และ 42 19

4. คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยระหว่างการทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 18 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง 21

5. คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยระหว่างการทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 30 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง 22

6. คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยระหว่างการทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 42 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง 23

สารบาญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

7. อัตรารอดเฉลี่ย (%) ของกุ้งกุลาดำหลังการฉีดด้วยสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาว 25

8. คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยตลอดการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ 29

9. คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยตลอดการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ 30

10. อัตรารอดเฉลี่ย (%) ของกุ้งกุลาดำหลังการได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกัน นาน 7 วัน 31

11. ค่า phenoloxidase activity เฉลี่ยของกุ้งกุลาดำหลังการได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกัน นาน 7 วัน 31

12. คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยตลอดการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ 32

ตารางผนวกที่

1. จำนวนลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 18, 30 และ 42 ตายสะสมในการทดลองหาค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 50

2 อัตรารอดเฉลี่ย (%) ของกุ้งกุลาดำหลังการฉีดด้วยสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง 57

สารบาญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ หน้า

3. คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยตลอดการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ 59

4. อัตรารอดเฉลี่ย (%) ของกุ้งกุลาดำหลังการฉีดด้วยสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว 62

5. คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยตลอดการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ 64

6. การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังการฉีดสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองความเข้มข้น 1:1,000,000 67

7. การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังการฉีดสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น 1:100,000 67

8. ค่า phenoloxidase activity ของกุ้งกุลาดำหลังการได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกัน นาน 7 วัน 68

9. อัตรารอด (%) ของกุ้งกุลาดำหลังการได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกัน นาน 7 วัน 68

10. การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังการได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกัน นาน 7 วัน 69

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบาญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ หน้า

11. การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า phenoloxidase activity ของกุ้งกุลาดำ หลังการได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกัน 69

สารบาญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. ใบมะม่วงเขียวเสวย 6

2. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 6

3. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยความเข้มข้นต่าง ๆ กันผสมกับสารละลายไวรัสที่ความเข้มข้น 10^{-6} หรือ 10^{-5} สำหรับสารละลายไวรัสหัวเหลืองหรือไวรัสตัวแดงดวงขาว ตามลำดับ ในอัตราส่วน 1:1 ดังนี้ 11

1. ชุดควบคุม (K-199)
2. ชุดควบคุมไวรัสหัวเหลืองหรือไวรัสตัวแดงดวงขาว
3. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 1 ppm + ไวรัส
4. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 10 ppm + ไวรัส
5. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 100 ppm + ไวรัส
6. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 1,000 ppm + ไวรัส
7. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 2,500 ppm + ไวรัส
8. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 5,000 ppm + ไวรัส
9. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 7,500 ppm + ไวรัส
10. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 10,000 ppm + ไวรัส

สารบาญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.	อาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกัน	14
5.	การหาค่า phenoloxidase activity ในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ ก. การ sonicate ด้วยเครื่อง sonicator ข. การวัดค่า absorbance ที่ 490 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer	15
6.	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยกับอัตราการตายสะสมของลูกกุ้งกุลาดำ ในเวลา 24 ชั่วโมง	18
7.	เนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง พบการตายของนิวเคลียสในเซลล์ (pyknotic nuclei) (ศรชี้สีเข้ม) เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ (ศรชี้) (X 400) ก. เหงือก ข. อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (haemopoietic tissue)	26
8.	เนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบการบวมพองและการขยายใหญ่ของนิวเคลียสของเซลล์ (hypertrophic nuclei) (ศรชี้สีเข้ม) เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ (ศรชี้) (X 400) ก. antennal gland ข. เหงือก	27

คำนำ

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เป็นอาชีพหนึ่งที่ให้ผลตอบแทนสูงเมื่อเทียบกับอาชีพเกษตรกรอื่น ๆ และสามารถนำเงินเข้าประเทศได้ปีละหลายหมื่นล้านบาท ในปี 2538 ประเทศไทยส่งออกกุ้งกุลาดำเป็นอันดับหนึ่งของโลกในปริมาณ 168,946 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 49,827.52 ล้านบาท แต่ในช่วง 5 เดือนแรกของปี 2539 การส่งออกกุ้งกุลาดำมีมูลค่า 16,010.4 ล้านบาท ลดลงจากช่วงเดียวกันของปีที่แล้วถึงร้อยละ 14.2 เนื่องจากปัญหาราคาอาหารที่สูงขึ้น การกีดกันการนำเข้าของสหรัฐอเมริกา การลดการนำเข้าของญี่ปุ่น และปัญหาโรคระบาด โดยเฉพาะปัญหาเรื่องการระบาดอย่างรุนแรงของโรคติดเชื้อไวรัสในกุ้งในช่วงปลายปี 2538 และต้นปี 2539 ได้แก่ ไวรัสหัวเหลือง (yellow-head virus) และไวรัสตัวแดงดวงขาว (systemic ectodermal and mesodermal baculovirus) (ศิริพงษ์ และยุพินท์, 2539; คมสัน, 2539)

โรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอ (RNA) คล้ายกับพวก rhabdovirus ของ caranovirus มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40-50 นาโนเมตร ยาว 150-170 นาโนเมตร (Wongteerasupaya และคณะ, 1995) พบมากในกุ้งอายุระหว่าง 20-35 วัน และ 50-70 วัน ลักษณะกุ้งที่เป็นโรค คือ ลำตัวซีด บริเวณส่วนหัวและเหงือกมีสีเหลือง กุ้งจะตายอย่างรวดเร็วภายในเวลา 2-3 วัน (ชลอ, 2534) สำหรับโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดดีเอ็นเอ (DNA) ในกลุ่ม baculovirus มีรูปร่างเป็นแท่ง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 70 นาโนเมตร ขนาดความยาว 250-280 นาโนเมตร พบมากในกุ้งอายุประมาณ 45-70 วัน ลักษณะอาการภายนอกของกุ้งที่เป็นโรค คือ ลำตัวแดง และมีดวงขาวตามเปลือกทั้งบริเวณส่วนหัวและลำตัวร่วมอยู่ด้วย บางครั้งอาจพบแต่อาการตัวแดงไม่มีดวงขาว กุ้งที่มีอาการจะทยอยตาย และจะตายหมดภายในเวลา 5-7 วัน (จิราพร และคณะ, 2537) ปัจจุบันโรคไวรัสดังกล่าวยังคงสร้างความเสียหายในแถบทุกพื้นที่ที่มีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ทั้งนี้เพราะยังไม่มีสารเคมีและยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคนี้ได้ เป็นเหตุให้เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำมีความวิตกกังวลว่าจะเลี้ยงรอดหรือไม่

การใช้สมุนไพรเพื่อป้องกันโรคไวรัสในกุ้งนับเป็นทางออกที่ดีทางหนึ่ง เนื่องจากสมุนไพรเป็นสารจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัยสูง อีกทั้งช่วยแก้ปัญหาความปลอดภัยของผู้บริโภค เนื่องจาก การตกค้างของยาปฏิชีวนะ และเป็นการช่วยลดการขาดดุลทางการค้ากับต่างประเทศในการนำยาปฏิชีวนะและสารเคมี ซึ่งยังเป็นการช่วยลดต้นทุนในการผลิตของเกษตรกรด้วย อีกทั้งในปัจจุบันมีรายงานการศึกษาหลายฉบับที่มาสนับสนุนเกี่ยวกับสมุนไพรหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคในกุ้งกุลาดำได้ เช่น จากการศึกษาของสถาพร และคณะ (2535) และสถาพร และคณะ (2539) พบว่า กะเพรา (*Ocimum sanctum*),ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata*), บอระเพ็ด

(*Tinospora crispa*), มะยม (*Phyllanthus acidus*), สารภีทะเล (*Calophyllum inphyllum*) และ พญายอ (*Clinacanthus nutans*) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยกุ้งมีอัตรารอดตาย 100 % ส่วนชิงช้าชาลี (*Tinospora cordifolia*) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสหัวเหลืองเพียง 80 % สำหรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่า หญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus* urinaria) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ดีที่สุด โดยทำให้กุ้งมีอัตรารอดตาย 100 % ขณะที่ใบฝรั่ง (*Psidium guajava*), ก้างปลาเครือ (*Phyllanthus reticulatus*), มะยม (*P. acidus*), พญายอ (*C. nutans*), ธรณีสาร (*Phyllanthus pulcher*) และลูกใต้ใบ 2 ชนิด ได้แก่ *Phyllanthus debelis* และ *P. amarus* มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ต่ำกว่า โดยทำให้กุ้งมีอัตรารอดตายอยู่ระหว่าง 58-85 % (สถาพร และคณะ, 2540) อีกทั้งสารสกัดของสมุนไพรไทยยังมีความปลอดภัยสูงต่อกุ้งกุลาดำ (สถาพร และคณะ, 2539)

มะม่วง (*Mangifera indica* L.) เป็นไม้ต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ใบมะม่วงเมื่อนำมาตากแห้งบดเป็นผงใช้เป็นยารักษาโรคท้องร่วงและโรคเบาหวาน เมื่อปรุงเป็นยาต้มใช้บรรเทาอาการไอ โรคหืดและโรคเกี่ยวกับทรวงอก (บุศบรรณ, 2525) ใบมะม่วงมีสารสำคัญคือ mangiferin และ isomangiferin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อ Herpes simplex virus ได้ดี (Anon, 1989) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารประกอบพวก triterpenoids ด้วย (Anjaneyulu และคณะ, 1982) โดยเฉพาะ methylchinomin และ quercetin ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Zhongyi และคณะ, 1982) และจากการศึกษาของชุตินันท์ (2534) พบว่า ใบมะม่วงเขียวเสวยชนิดสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการทำลายไวรัส Herpes simplex virus type-1 และ type- 2 ก่อนไวรัสเข้าสู่เซลล์ และมีผลยับยั้งการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสทั้ง 2 types ภายในเซลล์ หลังจากที่ไวรัสเข้าสู่เซลล์แล้ว ดังนั้น สารสกัดจากใบมะม่วงเขียวเสวยน่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งได้เช่นเดียวกับใบพญายอ (*C. nutans*) (สถาพร และคณะ, 2535) อีกทั้งน่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งซึ่งเป็นไวรัสชนิด DNA (จิราพร และคณะ, 2538) เช่นเดียวกับไวรัส Herpes simplex virus

ดังนั้น จึงน่าสนใจที่จะนำเอามะม่วงเขียวเสวย ซึ่งเป็นพืชที่หาได้ง่ายภายในประเทศ นิยมปลูกกันแพร่หลายเพื่อรับประทานเป็นผลไม้ ใบมะม่วงไม่นิยมนำมารับประทาน จึงสามารถหาได้ในปริมาณมาก ๆ โดยไม่ต้องซื้อหรือซื้อได้ในราคาถูก มาใช้ในการป้องโรคไวรัสในกุ้งกุลาดำ แต่การศึกษาถึงระดับพิษของสารสกัดจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อลูกกุ้งกุลาดำ และการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติบางประการของน้ำหลังการได้รับสารสกัดดังกล่าว รวมถึงประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวของสารสกัดจากใบมะม่วงเขียวเสวย ตลอดจนผลของสารสกัดจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ ยังไม่มีผู้ศึกษา เพื่อให้บรรลุถึง

วัตถุประสงค์ จึงได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งจะเป็นแนวทางในการพัฒนาสารสกัดจากใบมะม่วงเขียวเสวยเพื่อใช้ในการป้องโรคไวรัสในกุ้งกุลาดำในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อลูกกุ้งกุลาดำที่ 24 ชั่วโมง (LC_{50}) และศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของน้ำภายหลังได้รับสารสกัด

2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสหัว-เหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

3. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำโดยประเมินจากค่า phenoloxidase activity ในน้ำเลือดกุ้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อลูกกุ้งกุลาดำ

ดำเนินการทดลองหาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (median lethal concentration : LC_{50}) โดยใช้วิธีชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง (static bioassay) ตามวิธีของ APHA และคณะ (1992)

1.1 การเตรียมน้ำทดลอง

ใช้น้ำทะเลที่ผ่านการกรองด้วยเครื่องกรองขนาดไส้กรอง 1 ไมครอน คุณสมบัติของน้ำทะเลก่อนการทดลอง มีความเค็ม 32.00-35.00 ส่วนในพัน ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 6.40-6.52 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นกรดเป็นด่าง 8.33-8.50 อุณหภูมิน้ำ 28.00-29.60 องศาเซลเซียส ความเป็นด่างทั้งหมด 151.50 -156.38 มิลลิกรัมต่อลิตรของ $CaCO_3$ และปริมาณแอมโมเนียทั้งหมด 0.014-0.128 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 13 จำนวน 4,000 ตัว มาอนุบาลในตู้กระจกขนาด 45 X 60 X 45 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุน้ำทะเลที่เตรียมไว้ 40 ลิตร จำนวน 4 ตู้ ตู้ละ 1,000 ตัว เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน เพื่อปรับให้เคยชินกับสภาพการทดลอง (acclimated) โดยลูกกุ้งต้องอยู่ในระยะโพสต์ลาวา 18, 30 และ 42 ขณะเริ่มการทดลอง ให้อาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.) เป็นอาหารวันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) ให้อากาศโดยใช้เครื่องพ่นอากาศ (air pump) ตลอดเวลา และมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน

1.3 การสกัดสารจากใบมะม่วงเขียวเสวย

นำใบมะม่วงเขียวเสวยที่ไม่อ่อนและไม่แก่จนเกินไป มาล้างน้ำให้สะอาด (ภาพที่ 1) ผึ่งแดดให้แห้ง และนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักแล้วบดเป็นผงละเอียด นำใบมะม่วงที่บดแล้วมาห่อด้วยผ้าขาวบางหนา 2 ชั้น ใส่ลงในหม้อดิน เพื่อนำไปต้มสกัด การต้มสกัดครั้งที่ 1 จะเติมน้ำกรอง (deionized water) โดยใช้อัตราส่วนน้ำหนักใบมะม่วงบด 500 กรัมต่อปริมาตรน้ำกรอง 3 ลิตร ต้มด้วยไฟปานกลางจนเดือด และ

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทิ้งให้เดือดด้วยไฟอ่อนนาน 1 ชั่วโมง และเอาสารละลายสีน้ำตาลจากการต้มสกัดครั้งที่ 1 เก็บไว้ จากนั้นนำใบมะม่วงที่บดแล้วซึ่งห่อด้วยผ้าขาวจากการต้มสกัดครั้งแรก ไปต้มสกัดครั้งที่ 2 ต่อโดยใช้ปริมาตรน้ำกรอง 2 ลิตร ต้มด้วยไฟปานกลางจนเดือด และทิ้งให้เดือดด้วยไฟอ่อนนาน 30 นาที นำสารละลายที่ได้มารวมกับครั้งแรกแล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไประเหยต่อในเครื่องระเหย (rotary evaporator) โดยใช้อุณหภูมิ water bath และ cooler เท่ากับ 50 และ 10 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ที่ความดัน 200 mbar ให้เหลือปริมาตร 1 ใน 3 ของปริมาตรเดิม จะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) สีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 2) ดูดความชื้นง่าย เก็บสารสกัดนี้ไว้ในขวดสีชาปิดฝาให้สนิท เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น และเมื่อต้องการใช้จึงนำมาหาความเข้มข้นที่แน่นอนโดยการหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งตาม A.O.A.C. (1990)

จากการสกัดสารจากใบมะม่วงเขียวเสวยโดยวิธีนี้ สรุปได้ว่า เมื่อนำใบมะม่วงเขียวเสวยอบแห้งบดละเอียดน้ำหนัก 1 กิโลกรัม มาต้มสกัดจะได้สารละลายสีน้ำตาลประมาณ 5 ลิตร และเมื่อนำไประเหยต่อในเครื่องระเหยจะได้สารสกัดหยาบ สีน้ำตาลเข้ม ประมาณ 1.5-1.7 ลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งเฉลี่ย 8.235 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 น้ำหนักแห้ง (เปอร์เซ็นต์) ของสารสกัดหยาบต่อน้ำหนักของใบมะม่วงเขียวเสวยอบแห้งก่อนการสกัด

ครั้งที่	น้ำหนักของใบมะม่วงเขียวเสวยอบแห้ง (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (เปอร์เซ็นต์)
1	1,000	7.92
2	1,000	8.38
3	1,000	8.73
4	1,000	7.91
เฉลี่ย	1,000	8.235

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 1 ใบมะม่วงเขียวเสวย

ภาพที่ 2 สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย

1.4 <u>การดำเนินการทดลอง</u> ทดลองในถังพลาสติกขนาดความจุ 15 ลิตร บรรจุน้ำทะเลที่เตรียมไว้ 5 ลิตร สำหรับลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 18, 30 และ 42 ตลอดการทดลองจะให้อากาศโดยใช้เครื่องพ่นอากาศ และอาร์ทีเมียเป็นอาหาร วันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) เพื่อป้องกันกุ้งทำอันตรายกันเองถ้าขาดอาหาร และตายถ้าปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

1.4.1 การทดลองขั้นต้น (preliminary test) เพื่อหาระดับความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ไม่ทำให้กุ้งทดลองตายเลย และความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้กุ้งทดลองตาย 100 % ที่เวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปจัดระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองขั้นต่อไป

1.4.2 การทดลองขั้นละเอียด (full scale test) เป็นการทดลองเพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ทำให้กุ้งทดลองตาย 50 % ในเวลา 24 ชั่วโมง โดยแบ่งความเข้มข้นที่หาได้ในการทดลองขั้นต้น ออกเป็น 5 ระดับในลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์-ลาวา 18 และ 6 ระดับในลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 30 และ 42 โดยใช้สัดส่วนล็อกการิทึมของความเข้มข้นซึ่งอยู่ระหว่างช่วงความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ไม่ทำให้กุ้งทดลองตาย และความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้กุ้งทดลองตาย 100 % ที่เวลา 24 ชั่วโมง พร้อมกับมีกลุ่มควบคุม ระดับละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 18, 30 และ 42 ถังละ 50, 40 และ 25 ตัว ตามลำดับ

สังเกตลักษณะอาการ รวมทั้งพฤติกรรมของกุ้งเมื่อสัมผัสสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย และบันทึกจำนวนการตายของกุ้งทดลอง ในแต่ละระดับความเข้มข้น เมื่อทำการทดลองครบ 24 ชั่วโมง โดยถือว่ากุ้งที่ตายคือ กุ้งที่มีอาการสงบนิ่ง หยุดการเคลื่อนไหว และไม่ตอบสนองเมื่อใช้ช้อนพลาสติกขนาดเล็กสัมผัส แล้วนำเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งทดลองไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ทำให้กุ้งทดลองตาย 50 % ในเวลา 24 ชั่วโมง (LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง)

การวิเคราะห์ค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง และค่าฟังก์ชั่นความลาดเอียง (slope function) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธีของ Litchfield และ Wilcoxon (1949)

1.5 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำก่อนการเติมสาร หลังการเติมสารที่ 6 ชั่วโมง และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่อาจจะเกิดขึ้น เนื่องจากการใส่สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยลงไป ตามวิธีของ APHA และคณะ (1992) โดยวิเคราะห์หาความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ (pH) โดยใช้เครื่องวัด pH ของ Henna, อุณหภูมิน้ำโดยใช้ Thermometer, ความเค็มของน้ำโดยใช้ salinity hand refractometer, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำโดยใช้ Oxygen meter, ปริมาณแอมโมเนียทั้งหมดในน้ำ (total ammonia) ด้วยวิธี Phenate Method และความเป็นด่างทั้งหมดของน้ำ (total alkalinity) ด้วยวิธี Titration Method

2. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

2.1 การเตรียมน้ำทดลอง

ใช้น้ำทะเลที่ผ่านการกรองด้วยเครื่องกรองขนาดไส้กรอง 1.0 ไมครอน คุณสมบัติของน้ำทะเลก่อนการทดลอง มีความเค็ม เท่ากับ 28.00-33.00 และ 31.00-32.00 ส่วนในพันปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ เท่ากับ 5.90-6.60 และ 4.80-6.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นกรดเป็นด่าง เท่ากับ 7.80-8.20 และ 7.30-8.20 อุณหภูมิน้ำ เท่ากับ 28.00-30.10 และ 29.80-30.90 องศาเซลเซียส ความเป็นด่างทั้งหมด เท่ากับ 150.50-167.50 และ 127.00-150.00 มิลลิกรัมต่อลิตรของ $CaCo_3$ และปริมาณแอมโมเนียทั้งหมด เท่ากับ 0.026-0.031 และ 0-0.278 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนัก 7-15 กรัม จำนวน 2,500 ตัว จากฟาร์มกุ้งในจังหวัดฉะเชิงเทรา เป็นกุ้งที่สมบรูณ์ แข็งแรง ไม่มีประวัติการเป็นโรคมาก่อน มาพักไว้ในบ่อซีเมนต์ที่บรรจุน้ำทะเลที่เตรียมไว้ 5 ตัน ซึ่งมีระบบน้ำทะเลไหลเวียนตลอดเวลา เป็นเวลาอย่างน้อย 5 วัน มีการให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปคุณภาพดี วันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) ให้อากาศโดยใช้เครื่องพ่นอากาศ (air pump) ตลอดเวลา จากนั้นจึงเริ่มทดลองโดยในการทดสอบแต่ละเชื้อไวรัสจะนำกุ้งปกติมาเลี้ยงในถังพลาสติก ซึ่งบรรจุน้ำ 50 ลิตร ถังละ 8 ตัว จำนวน 30 ถัง ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปคุณภาพ

ดีวันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) ให้อากาศโดยใช้เครื่องพ่นอากาศตลอดเวลา และมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันในช่วงเช้า ประมาณวันละ 40-50 % เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน เพื่อปรับให้เคยชินกับสภาพการทดลอง

2.3 สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย

ใช้ stock solution ของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย ซึ่งได้จากวิธีการเตรียมในข้อ 1.3 ในการทดสอบกับเชื้อไวรัสหัวเหลือง และไวรัสตัวแดงดวงขาว

2.4 การเตรียมเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาว

นำ stock เชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวจากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำไปฉีดเข้ากุ้งกุลาดำปกติทางกล้ามเนื้อปล้องที่ 6 จำนวนเชื้อละ 10 ตัว ตัวละ 0.05 มิลลิลิตร กรณีเชื้อไวรัสหัวเหลืองจะรวบรวม hepatopancreas จากกุ้งที่แสดงอาการหัวเหลืองใกล้ตายหรือตายใหม่ๆ สำหรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะรวบรวมเหงือกจากกุ้งที่แสดงอาการตัวแดงดวงขาวใกล้ตายหรือตายใหม่ๆ จำนวนเชื้อละ 1 กรัมมาบดในสารละลาย K-199 pH 7.3 ซึ่งผสม fetal calf serum 2.5 % ในอัตราส่วน 1 : 9 ด้วยโกร่งบดจนละเอียด แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปั่นด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นแยกเฉพาะส่วนของเหลวใสที่ลอยอยู่ส่วนบนชั้นตะกอน (supernatant) ไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อแยกแบคทีเรียออก แบ่งสารละลายไวรัสแต่ละชนิดที่กรองได้หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บแช่แข็งไว้ที่ -75 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

2.5 การดำเนินการทดลอง

นำสารละลายไวรัสหัวเหลืองหรือไวรัสตัวแดงดวงขาวที่กรองได้ตามวิธีในข้อ 2.4 มาเจือจางด้วยสารละลาย K-199 pH 7.3 ผสม fetal calf serum 2.5 % ให้ได้ความเข้มข้นของแต่ละเชื้อลดลงคราวละ 10 เท่า (ten fold dilution) คือ ความเข้มข้นที่ 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} แล้วมาฉีดเข้ากุ้งกุลาดำทดลองทางกล้ามเนื้อปล้องที่ 6 ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำต่อเชื้อ แต่ละซ้ำใช้กุ้งจำนวน 8 ตัว ฉีดตัวละ 0.05 มิลลิลิตร สำหรับชุดควบคุมฉีดสารละลาย K-199 pH 7.3 ผสม fetal calf serum 2.5 % ที่ไม่มีสารละลายไวรัส จากนั้นบันทึกอัตราการตายหลังฉีดทุกวัน นาน 7

วัน เพื่อหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายไวรัสที่ทำให้กุ้งทดลองตาย 100 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่า ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ทำให้กุ้งทดลองตาย 100 เปอร์เซ็นต์ คือ ความเข้มข้นที่ 10^{-6} และ 10^{-5} ตามลำดับ

จากนั้นนำสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยมาเจือจางด้วยสารละลาย K-199 pH 7.3 ผสม fetal calf serum 2.5 % ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 8 ระดับ คือ 1, 10, 100, 1,000, 2,500, 5,000, 7,500 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำมาผสมกับสารละลายไวรัสที่ความเข้มข้น 10^{-6} หรือ 10^{-5} สำหรับสารละลายไวรัสหัวเหลืองหรือไวรัสตัวแดงดวงขาว ตามลำดับ ในอัตราส่วน 1:1 (ภาพที่ 3) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยออกฤทธิ์ นำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อปล้องที่ 6 ในกุ้งขนาดน้ำหนัก 7.21-14.19 กรัม (เฉลี่ย 10.26 กรัม) ยาว 9.20-11.50 เซนติเมตร (เฉลี่ย 10.40 เซนติเมตร) สำหรับสารละลายไวรัสหัว-เหลือง และขนาดน้ำหนัก 7.09-15.68 กรัม (เฉลี่ย 10.59 กรัม) ยาว 8.90-11.70 เซนติเมตร (เฉลี่ย 10.34 เซนติเมตร) สำหรับสารละลายไวรัสตัวแดงดวงขาว ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำต่อเชื้อ แต่ละซ้ำใช้กุ้งจำนวน 8 ตัว ฉีดตัวละ 0.05 มิลลิลิตร สำหรับชุดควบคุมที่ 1 ฉีดสารละลาย K-199 pH 7.3 ผสม fetal calf serum 2.5 % ที่ไม่มีสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย และชุดควบคุมที่ 2 ฉีดสารละลายไวรัสที่ความเข้มข้น 10^{-6} หรือ 10^{-5} สำหรับสารละลายไวรัสหัวเหลืองหรือไวรัสตัว-แดงดวงขาว ตามลำดับ กุ้งทดลองทั้ง 10 ชุดการทดลองต่อเชื้อ ถูกเลี้ยงในถังพลาสติก ซึ่งบรรจุน้ำ 50 ลิตร และบันทึกอัตรารอดของกุ้งทุกวันหลังจากการฉีดเชื้อ นาน 7 วัน ระหว่างการทดลองมีการให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปคุณภาพดีวันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) ให้อากาศโดยใช้เครื่องพ่นอากาศตลอดเวลา มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำในช่วงเช้าทุกวัน ประมาณวันละ 40-50 % และทำการตรวจยืนยันว่ากุ้งทดลองที่แสดงอาการของโรคใกล้ตายหรือตายใหม่ๆ หลังฉีดเชื้อว่ามีเชื้อไวรัสหรือไม่ โดยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อส่วนหัว โดยนำมาดองในน้ำยา Davidson's fixative และผ่านขบวนการทำเป็นสไลด์ถาวร ย้อมด้วยสี Hematoxylin - Eosin (H&E) เพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง ตามวิธีของ Bell และ Lighter (1988)

2.6 <u>การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ</u>

ทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำก่อนการเปลี่ยนถ่ายน้ำในช่วงเช้าทุกวันตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง ตามวิธีของ APHA และคณะ (1992) โดยวิเคราะห์หาความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ (pH) โดยใช้เครื่องวัด pH ของ Henna, อุณหภูมิน้ำโดยใช้ Thermometer, ความเค็มของน้ำโดยใช้

ภาพที่ 3 สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยความเข้มข้นต่าง ๆ กันผสมกับสารละลายไวรัสที่ความเข้มข้น 10^{-2} หรือ 10^{-3} สำหรับสารละลายไวรัสหัวเหลืองหรือไวรัสตัวแดงดวงขาว ตามอำดับ ในอัตราส่วน 1:1 ดังนี้

1. ชุดควบคุม (K-199)
2. ชุดควบคุมไวรัสหัวเหลืองหรือไวรัสตัวแดงดวงขาว
3. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 1 ppm + ไวรัส
4. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 10 ppm + ไวรัส
5. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 100 ppm + ไวรัส
6. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 1,000 ppm + ไวรัส
7. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 2,500 ppm + ไวรัส
8. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 5,000 ppm + ไวรัส
9. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 7,500 ppm + ไวรัส
10. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 10,000 ppm + ไวรัส

Salinity hand refractometer, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำโดยใช้ Oxygen meter, ปริมาณแอมโมเนียทั้งหมดในน้ำ (total ammonia) ด้วยวิธี Phenate Method และความเป็นด่างทั้งหมดของน้ำ (alkalinity) ด้วยวิธี Titration Method

2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ ทดสอบความแตกต่างโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan 's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเปอร์เซ็นต์อัตรารอดของกุ้ง

3. การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ

3.1 การเตรียมน้ำทดลอง

ใช้น้ำทะเลที่ผ่านการกรองด้วยเครื่องกรองขนาดไส้กรอง 1.0 ไมครอน คุณสมบัติของน้ำทะเลก่อนการทดลอง มีความเค็ม เท่ากับ 31.00 ส่วนในพัน ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำอยู่ในช่วง 7.20-7.37 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นกรดเป็นด่าง อยู่ในช่วง 8.03-8.10 อุณหภูมิน้ำอยู่ในช่วง 24.40-27.70 องศาเซลเซียส ความเป็นด่างทั้งหมดอยู่ในช่วง 113.00-113.33 มิลลิกรัมต่อลิตรของ $CaCo_3$ และปริมาณแอมโมเนียทั้งหมด อยู่ในช่วง 0.042-0.101 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนัก 9.04-20.65 กรัม ความยาว 10.50-13.50 เซนติเมตร จำนวน 200 ตัว จากฟาร์มกุ้งในจังหวัดฉะเชิงเทรา เป็นกุ้งที่สมบรูณ์ แข็งแรง ไม่มีประวัติการเป็นโรคมาก่อน มาพักไว้ในถังไฟเบอร์กลาสที่บรรจุน้ำทะเลที่เตรียมไว้ 500 ลิตร ซึ่งมีระบบน้ำทะเลไหลเวียนตลอดเวลา เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน มีการให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปคุณภาพดี วันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) ให้อากาศโดยใช้เครื่องพ่นอากาศ (air pump) ตลอดเวลา จากนั้นจึงเริ่มทดลองโดยนำกุ้งปกติมาเลี้ยงในถังพลาสติก ซึ่งบรรจุน้ำ 50 ลิตร ถังละ 12 ตัว จำนวน 12 ถัง ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปคุณภาพดีวันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) ให้อากาศโดยใช้เครื่องพ่นอากาศตลอดเวลา และมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันในช่วงเช้า ประมาณวันละ 40-50 % เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน เพื่อปรับให้เคยชินกับสภาพการทดลอง

3.3 การเตรียมอาหารเม็ดผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย

นำ stock solution ของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยในรูปสารละลายสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งได้จากวิธีการเตรียมในข้อ 1.3 มาละลายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับ 1,000, 2,500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมา spray บนอาหารเม็ดสำเร็จรูปคุณภาพดีจนทั่ว โดยใช้สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่ออาหารเม็ดในอัตราส่วน 2:3 คือ การสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยในแต่ละระดับความเข้มข้น 100 มิลลิลิตรต่ออาหารเม็ด 150 กรัม จากนั้นนำไปผึ่งลมจนแห้ง และเก็บไว้ในภาชนะที่สะอาดในตู้เย็น จนกว่าจะใช้ (ภาพที่ 4)

3.4 การดำเนินการทดลอง

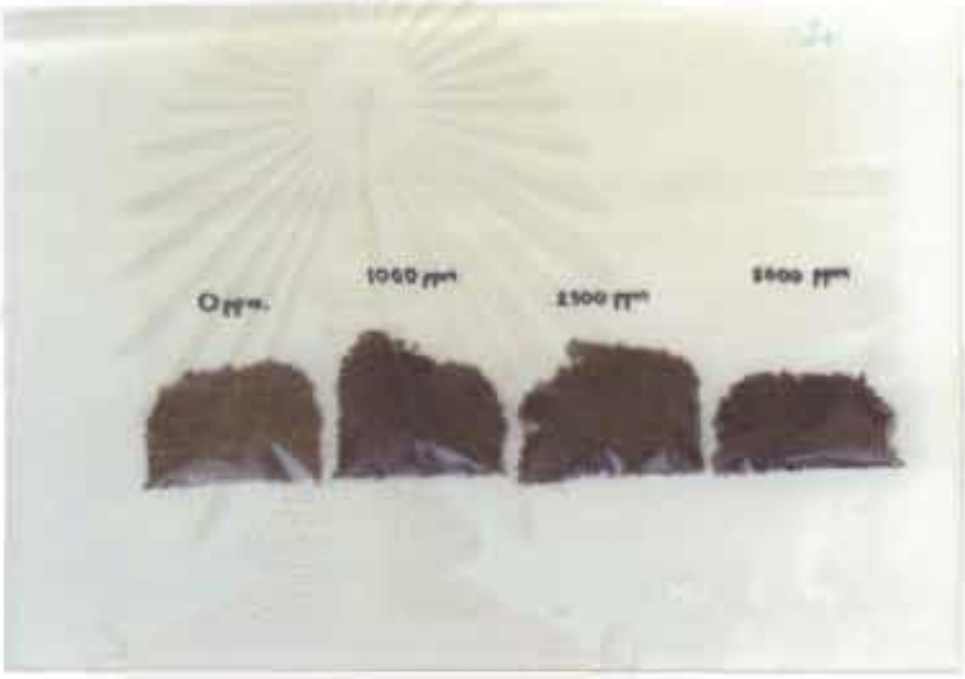
แบ่งกุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 14.60 กรัม ความยาวเฉลี่ย 12.15 เซนติเมตร ออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้กุ้งจำนวน 12 ตัว ให้กุ้งกินอาหารเม็ดผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับ 0, 1,000, 2,500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอัตรา 3.5 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน วันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) นาน 7 วัน โดยกุ้งทดลองทั้ง 4 ชุดการทดลอง ถูกเลี้ยงในถังพลาสติก ซึ่งบรรจุน้ำ 50 ลิตร ให้อากาศโดยใช้เครื่องพ่นอากาศตลอดเวลา มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำในช่วงเช้าทุกวัน ประมาณวันละ 40-50 % จากนั้นบันทึกอัตรารอดของกุ้ง และหาค่า phenoloxidase activity ในน้ำเลือดกุ้งทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

3.5 การหาค่า phenoloxidase activity ในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ

3.5.1 ดูดน้ำเลือดจากกุ้ง จำนวน 2-3 ตัวในแต่ละซ้ำของชุดการทดลองให้มีปริมาตรรวม 0.4 มิลลิลิตร (แต่ละซ้ำของชุดการทดลองจะทำ 2 ซ้ำ) จากนั้นนำน้ำเลือดกุ้งมา sonicate ด้วยเครื่อง sonicator นาน 10 นาที (ภาพที่ 5 ก.)

3.5.2 ดูดน้ำเลือดกุ้งมา 90 ไมโครลิตร และเติม Tris-buffered saline (TBS) pH 7.3, สารละลาย L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenyl alanine) และ TBS pH 7.3 ปริมาตร 90, 180 และ 600 ไมโครลิตร ตามลำดับ

3.5.3 นำสารละลายในข้อ 3.5.2 มาวัดค่า absorbance ที่ 490 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ทันที ที่เวลา 0, 1, 2 และ 3 นาที โดยเทียบกับสารละลาย blank (ภาพที่ 5 ข.)



ภาพที่ 4 อาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก

ข

ภาพที่ 5 การหาค่า phenoloxidase activity ในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ

ก. การ sonicate ด้วยเครื่อง sonicator

ข. การวัดค่า absorbance ที่ 490 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer

3.5.4 คำนวณค่า 1 unit phenoloxidase activity = ค่า absorbance ที่เปลี่ยนแปลงไป 0.001 ใน 1 นาที จากสูตร

$$\text{หน่วยที่เปลี่ยนแปลงไปใน 3 นาที} = \frac{\text{ค่า absorbance ที่เวลา 0 นาที - ค่า absorbance ที่เวลา 3 นาที}}{0.001}$$

$$\text{หน่วยที่เปลี่ยนแปลงไปใน 1 นาที} = \frac{\text{หน่วยที่เปลี่ยนแปลงไปใน 3 นาที}}{3}$$

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ ทดสอบความแตกต่างโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan 's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเปอร์เซ็นต์อัตรารอดของกุ้ง และค่า 1 unit phenoloxidase activity

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

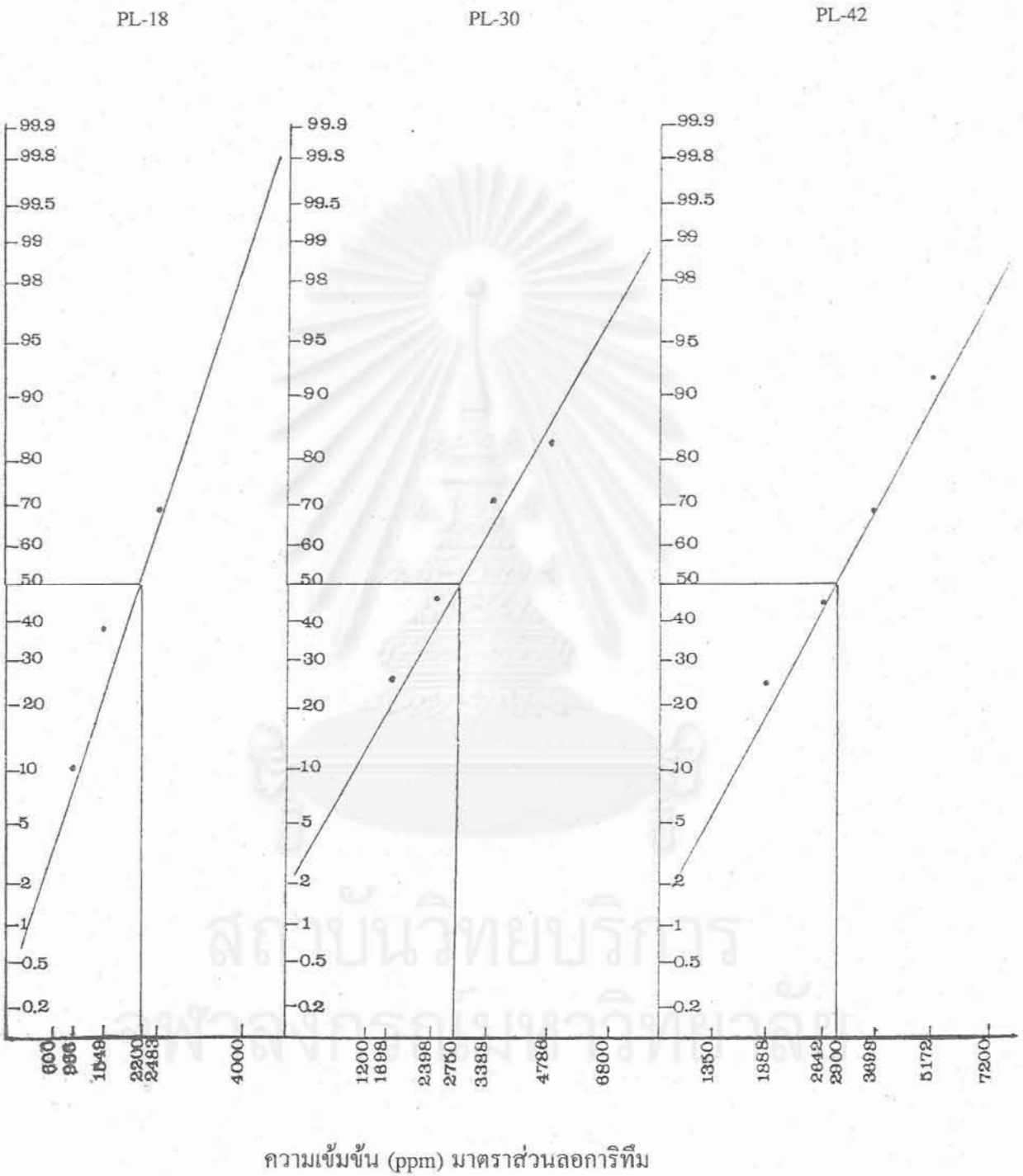
ผลการทดลอง

1. การศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อลูกกุ้งกุลาดำ

เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวาที่ 18, 30 และ 42 แสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 6 เมื่อนำเปอร์เซ็นต์การตายสะสมมาคำนวณค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ทำให้กุ้งทดลองตาย 50 % ในเวลา 24 ชั่วโมง (LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง) พบว่า ค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงสำหรับลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวาที่ 18, 30 และ 42 มีค่าเท่ากับ 2,200 (1,966.04-2,461.80), 2,750 (2,387.15-3,168.00) และ 2,900 (2,495.69-3,369.80) มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) ตามลำดับ และมีค่าฟังก์ชันความลาดเอียง (slope function) ที่ช่วงเชื่อมั่น 95 % เท่ากับ 1.505 (1.393-1.625), 1.753 (1.506-2.040) และ 1.602 (1.392-1.844) ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

จากการทดลองหลังจากที่ลูกกุ้งสัมผัสกับสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย จะมีการตอบสนองทันที โดยเฉพาะลูกกุ้งที่ได้รับสารที่มีความเข้มข้นสูงสุด คือ 4,000, 6,800 และ 7,200 ppm ในลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวาที่ 18, 30 และ 42 ตามลำดับ มีการดีดตัวขึ้นมาเหนือน้ำและว่ายน้ำไปมาอย่างรวดเร็วหลังจากนั้นจะว่ายน้ำอยู่ที่ผิวน้ำ ในเวลาต่อมาลูกกุ้งบางตัวจะเริ่มว่ายน้ำควงสว่าน ไม่มีทิศทางแน่นอน และตายในที่สุด กุ้งที่ตายจะมีสีลำตัวและบริเวณเหงือกเป็นสีน้ำตาลเข้มมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัด สำหรับลูกกุ้งที่ได้รับสารในระดับต่ำลงมา ในช่วงระยะเวลา 15 นาทีแรกจะว่ายน้ำขึ้นมาอยู่ที่ผิวน้ำ เมื่อเวลาผ่านไปลูกกุ้งบางส่วนจะเริ่มจมลงก้นถัง และทยอยตายในที่สุด และบางส่วนจะเป็นปกติ

คุณภาพน้ำก่อนการทดลองตลอดจนสิ้นสุดการทดลองในลูกกุ้งกุลาดำ แสดงในตารางที่ 4, 5 และ 6 จากการตรวจวัดคุณภาพน้ำก่อนใส่สารในลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 18, 30 และ 42 พบว่า อุณหภูมิของน้ำ เท่ากับ 28.00, 28.00 และ 28.50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ค่าความเค็มเท่ากับ 32.00, 32.00 และ 35.00 ส่วนในพัน ตามลำดับ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง เท่ากับ 8.33, 8.50 และ 8.50 ตามลำดับ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ เท่ากับ 6.50, 6.40 และ 6.52 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าความเป็นด่างทั้งหมด เท่ากับ 153.00, 156.38 และ 151.50 มิลลิกรัมต่อลิตรของ $CaCo_3$ ตามลำดับ และปริมาณแอมโมเนียทั้งหมด เท่ากับ 0.014, 0.027 และ 0.128 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ หลังจากเติมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ 6 ชั่วโมงในลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 18, 30 และ 42 พบว่า น้ำจะมีสีน้ำตาลเข้มขึ้นและมีฟองอยู่บริเวณผิวน้ำมากตามปริมาณสารที่เพิ่มขึ้น สำหรับอุณหภูมิของน้ำและค่าความเค็มไม่แตกต่างไปจากก่อนการทดลอง สำหรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณ



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยกับอัตราการตายสะสมของลูกกุ้งกุลาดำ ในเวลา 24 ชั่วโมง

ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และค่าความเป็นด่างทั้งหมดลดลงตามปริมาณสารที่เพิ่มขึ้น และปริมาณแอมโมเนียทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณสารที่เพิ่มขึ้น เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่เวลา 24 ชั่วโมงในลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 18, 30 และ 42 พบว่า น้ำจะมีสีน้ำตาลจางลงแต่ยังคงมีฟองอยู่บริเวณผิวน้ำค่อนข้างมากไม่แตกต่างจากหลังเติมสารที่ 6 ชั่วโมง อุณหภูมิของน้ำ และค่าความเค็ม ไม่แตกต่างไปจากก่อนการทดลอง สำหรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และค่าความเป็นด่างทั้งหมดก็ยังคงลดลงตามปริมาณสารที่เพิ่มขึ้น และปริมาณแอมโมเนียทั้งหมดยังคงเพิ่มขึ้นตามปริมาณสารที่เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 3 ค่า LC_{50} และค่าฟังก์ชั่นความลาดเอียงที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 24 ชั่วโมงของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 18, 30 และ 42

ขนาดกุ้งกุลาดำ	ค่า 24 hr-LC_{50} (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าฟังก์ชั่นความเอียง (slope function)
PL-18	2,200 (1,966.04-2,461.80)	1.505 (1.393-1.625)
PL-30	2,750 (2,387.15-3,168.00)	1.753 (1.506-2.040)
PL-42	2,900 (2,495.69-3,369.80)	1.602 (1.392-1.844)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 18, 30 และ 42 เมื่อสัมผัสกับสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

ขนาดกุ้งกุลาดำ	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การตายสะสมในเวลา 24 ชั่วโมง
PL-18	กลุ่มควบคุม	0
	600	0
	966	10.66
	1,549	37.32
	2,483	68.66
	4,000	100
PL-30	กลุ่มควบคุม	0
(นน.เฉลี่ย 0.024 กรัม/ตัว)	1,200	0.83
(ยาวเฉลี่ย 1.7 ซม./ตัว)	1,698	25
	2,398	45.83
	3,388	70.83
	4,786	82.50
	6,800	100
PL42	กลุ่มควบคุม	0
(นน.เฉลี่ย 0.063 กรัม/ตัว)	1,350	1.32
(ยาวเฉลี่ย 2.3 ซม./ตัว)	1,888	24
	2,642	44
	3,698	68
	5,176	93.32
	7,200	100

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ของสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยระหว่างการทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย ต่อลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 18 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

ขนาดกุ้งกุลาดำ	ระดับความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Temp. (^{0}C)	ความเค็ม (ppt)	pH	DO (ppm)	Total Alk ppm as $CaCO_3$	Total NH_3 (ppm)
PL-18	0 ก่อนการทดลอง	28.00	32.00	8.33	6.50	153.00	0.014
	หลังเติมสาร 6 ชม.	28.50	32.00	8.25	6.20	150.00	0.123
	หลังเติมสาร 24 ชม.	28.00	32.50	8.00	6.10	139.50	0.232
	600 ก่อนการทดลอง	28.00	32.00	8.33	6.50	153.00	0.014
	หลังเติมสาร 6 ชม.	28.50	32.00	8.00	6.00	139.33	0.214
	หลังเติมสาร 24 ชม.	28.00	32.00	8.00	5.90	134.00	0.244
	966 ก่อนการทดลอง	28.00	32.00	8.33	6.50	153.00	0.014
	หลังเติมสาร 6 ชม.	29.00	32.00	7.50	6.00	130.50	0.220
	หลังเติมสาร 24 ชม.	28.00	32.50	7.50	5.75	127.25	0.310
	1,549 ก่อนการทดลอง	28.00	32.00	8.33	6.50	153.00	0.014
	หลังเติมสาร 6 ชม.	29.50	32.00	7.50	5.90	135.33	0.226
	หลังเติมสาร 24 ชม.	28.00	33.00	7.00	5.60	125.50	0.382
	2,483 ก่อนการทดลอง	28.00	32.00	8.33	6.50	153.00	0.014
	หลังเติมสาร 6 ชม.	28.50	32.00	7.00	5.85	129.52	0.321
	หลังเติมสาร 24 ชม.	28.00	33.00	6.50	5.73	122.00	0.501
	4,000 ก่อนการทดลอง	28.00	32.00	8.33	6.50	153.00	0.014
	หลังเติมสาร 6 ชม.	29.00	32.00	6.50	5.73	121.00	0.414
	หลังเติมสาร 24 ชม.	28.00	32.50	6.00	5.53	118.00	0.717

ตารางที่ 5 คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยระหว่างการทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 30 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

ขนาดกุ้งกุลาดำ	ระดับความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Temp. (^{0}C)	ความเค็ม (ppt)	pH	DO (ppm)	Total Alk ppm as $CaCO_3$	Total NH_3 (ppm)
PL-30	0 ก่อนการทดลอง	28.00	32.00	8.50	6.40	156.38	0.027
	หลังเติมสาร 6 ชม.	30.05	33.00	8.50	6.35	154.75	0.213
	หลังเติมสาร 24 ชม.	28.00	33.00	8.50	6.15	154.50	0.342
	1,200 ก่อนการทดลอง	28.00	32.00	8.50	6.40	156.38	0.027
	หลังเติมสาร 6 ชม.	29.90	33.00	7.50	6.25	153.50	0.389
	หลังเติมสาร 24 ชม.	28.00	33.50	7.50	6.30	154.00	0.394
	1,698 ก่อนการทดลอง	28.00	32.00	8.50	6.40	156.38	0.027
	หลังเติมสาร 6 ชม.	29.80	33.00	7.50	5.75	153.50	0.459
	หลังเติมสาร 24 ชม.	28.00	34.00	6.50	5.60	123.00	0.695
	2,398 ก่อนการทดลอง	28.00	32.00	8.50	6.40	156.38	0.027
	หลังเติมสาร 6 ชม.	29.70	34.00	7.50	4.80	146.00	0.618
	หลังเติมสาร 24 ชม.	28.05	35.00	6.50	5.55	113.50	0.878
	3,388 ก่อนการทดลอง	28.00	32.00	8.50	6.40	156.38	0.027
	หลังเติมสาร 6 ชม.	29.65	34.50	7.00	4.80	142.50	0.843
	หลังเติมสาร 24 ชม.	28.30	35.50	6.00	4.40	117.00	0.953
	4,786 ก่อนการทดลอง	28.00	32.00	8.50	6.40	156.38	0.027
	หลังเติมสาร 6 ชม.	29.75	35.00	7.00	5.10	135.00	0.958
	หลังเติมสาร 24 ชม.	28.30	35.50	6.00	4.50	109.50	1.013
	6,800 ก่อนการทดลอง	28.00	32.00	8.50	6.40	156.38	0.027
	หลังเติมสาร 6 ชม.	29.55	34.00	6.50	4.90	121.00	1.031
	หลังเติมสาร 24 ชม.	28.25	34.00	6.00	4.80	110.66	1.147

ตารางที่ 6 คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยระหว่างการทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 42 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

ขนาดกุ้งกุลาดำ	ระดับความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		Temp. (^{0}C)	ความเค็ม (ppt)	pH	DO (ppm)	Total Alk ppm as $CaCO_3$	Total NH_3 (ppm)
PL-42	0	ก่อนการทดลอง	28.50	35.00	8.50	6.52	151.50	0.128
		หลังเติมสาร 6 ชม.	29.60	34.00	8.50	6.40	150.50	0.357
		หลังเติมสาร 24 ชม.	28.20	34.00	8.50	6.70	152.50	0.489
	1,350	ก่อนการทดลอง	28.50	35.00	8.50	6.52	151.50	0.128
		หลังเติมสาร 6 ชม.	29.30	33.50	7.80	5.65	145.00	0.487
		หลังเติมสาร 24 ชม.	28.50	34.50	7.30	5.75	140.00	0.659
	1,888	ก่อนการทดลอง	28.50	35.00	8.50	6.52	151.50	0.128
		หลังเติมสาร 6 ชม.	29.20	34.00	7.50	5.90	141.66	0.675
		หลังเติมสาร 24 ชม.	28.50	33.60	7.00	5.86	135.00	0.819
	2,642	ก่อนการทดลอง	28.50	35.00	8.50	6.52	151.50	0.128
		หลังเติมสาร 6 ชม.	29.20	34.60	7.00	5.57	145.00	0.748
		หลังเติมสาร 24 ชม.	28.60	35.00	7.00	5.73	140.00	0.989
	3,698	ก่อนการทดลอง	28.50	35.00	8.50	6.52	151.50	0.128
		หลังเติมสาร 6 ชม.	29.05	35.00	6.80	5.85	135.00	0.862
		หลังเติมสาร 24 ชม.	28.80	35.00	7.00	4.70	139.00	1.002
	5,176	ก่อนการทดลอง	28.50	35.00	8.50	6.52	151.50	0.128
		หลังเติมสาร 6 ชม.	28.75	36.00	6.00	6.10	125.00	0.977
		หลังเติมสาร 24 ชม.	28.70	35.50	6.80	4.95	132.00	1.033
	7,200	ก่อนการทดลอง	28.50	35.00	8.50	6.52	151.50	0.128
		หลังเติมสาร 6 ชม.	28.65	36.00	5.50	6.00	120.00	1.124
		หลังเติมสาร 24 ชม.	28.80	37.00	6.00	4.50	125.00	1.157

2. <u>การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ</u>

จากตารางที่ 7 พบว่า สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยกุ้งจะไม่แสดงอาการของโรคและไม่มีการตายเกิดขึ้น ตลอดช่วงการทดลอง 7 วัน ขณะที่สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100, 1,000, 2,500, 5,000 และ 7,500 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสหัวเหลืองกับไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ต่ำกว่า โดยกุ้งมีอัตรารอดเท่ากับ 41.67 กับ 45.83, 45.83 กับ 45.83, 50.00 กับ 50.00, 54.17 กับ 54.17, 66.67 กับ 58.33, 66.67 กับ 83.33 และ 70.83 กับ 87.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) สำหรับกุ้งกุลาดำในชุดควบคุมที่ได้รับเฉพาะเชื้อไวรัสหัวเหลืองหรือไวรัสตัวแดงดวงขาวเพียงอย่างเดียว จะแสดงอาการของโรคและเริ่มทยอยตายจนหมด โดยพบว่าอัตราการตายจะสูงมากภายในระยะเวลา 2-3 และ 3-4 วันหลังฉีดเชื้อ ตามลำดับ สำหรับกุ้งกุลาดำในชุดควบคุมซึ่งฉีดสารละลาย K-199 pH 7.3 ผสม fetal calf serum 2.5 % ที่ไม่มีสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย กุ้งจะมีอัตรารอด เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

จากตารางที่ 7 เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน พบว่า สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm จะสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ดีกว่าเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยกุ้งจะมีอัตรารอดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ขณะที่สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100, 1,000, 2,500, 7,500 และ 10,000 ppm จะสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดได้ใกล้เคียงกัน โดยกุ้งมีอัตรารอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)

ผลการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง พบว่า มีการตายของนิวเคลียสในเซลล์ (pyknotic nuclei) ของหลาย ๆอัวยวะ เช่น ซี่เหงือก ต่อมน้ำเหลือง และกระเพาะอาหาร เป็นต้น (ภาพที่ 7 ก และ ข) สำหรับผลการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่า มีการบวมพองและการขยายใหญ่ของนิวเคลียสของเซลล์ (hypertrophic nuclei) บริเวณเนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก (subcuticular epidermal) และหลาย ๆอวัยวะ เช่นซี่เหงือก กระเพาะอาหาร และ antennal gland เป็นต้น (ภาพที่ 8 ก และ ข)

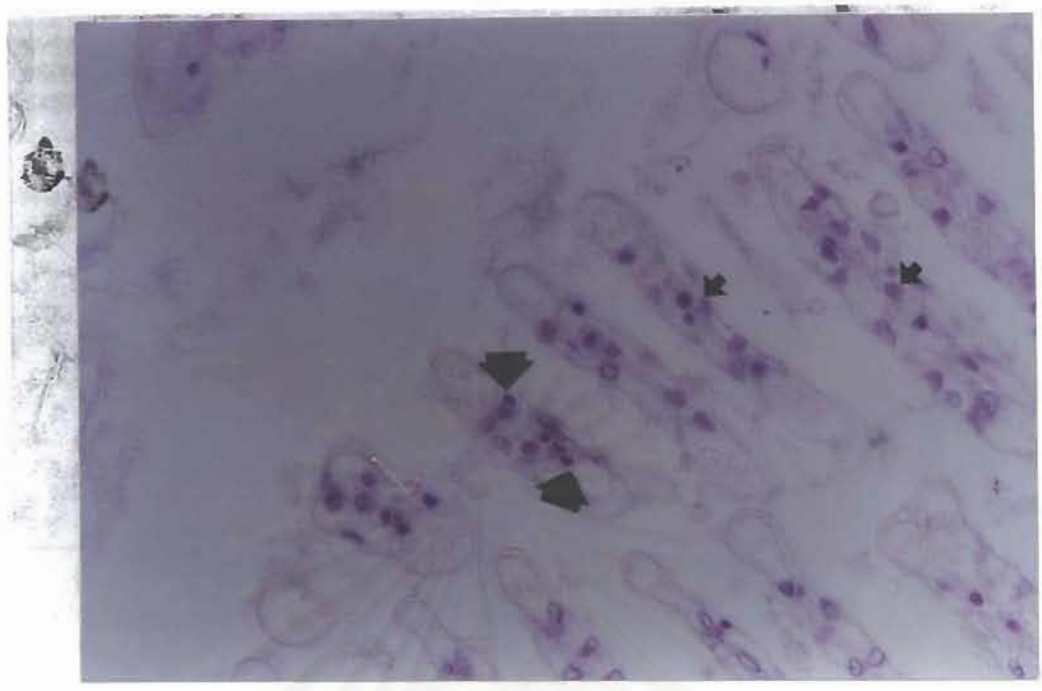
ตารางที่ 7 อัตรารอดเฉลี่ย (%) ของกุ้งกุลาดำหลังการฉีดด้วยสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาว

ชุดการทดลอง	อัตรารอดเฉลี่ย (%)	
	ไวรัสหัวเหลือง	ไวรัสตัวแดงดวงขาว
1. ชุดควบคุม (K-199)	$100.00^{aA} \pm 0.00$ (8/8)	$100.00^{aA} \pm 0.00$ (8/8)
2. ชุดควบคุมไวรัส	$0.00^{dA} \pm 0.00$ (0/8)	$0.00^{eA} \pm 0.00$ (0/8)
3. มะม่วง 10,000 ppm + ไวรัส	$100.00^{aA} \pm 0.00$ (8/8)	$100.00^{aA} \pm 0.00$ (8/8)
4. มะม่วง 7,500 ppm + ไวรัส	$70.83^{bA} \pm 14.43$ (5.6667/8)	$87.50^{bA} \pm 0.00$ (7/8)
5. มะม่วง 5,000 ppm + ไวรัส	$66.67^{bB} \pm 7.22$ (5.3333/8)	$83.33^{bA} \pm 7.22$ (6.6667/8)
6. มะม่วง 2,500 ppm + ไวรัส	$66.67^{bA} \pm 7.22$ (5.3333/8)	$58.33^{cA} \pm 7.22$ (4.6667/8)
7. มะม่วง 1,000 ppm + ไวรัส	$54.17^{cA} \pm 0.00$ (4.3333/8)	$54.13^{cdA} \pm 7.22$ (4.3333/8)
8. มะม่วง 100 ppm + ไวรัส	$50.00^{cA} \pm 7.22$ (4/8)	$50.00^{cdA} \pm 0.00$ (4/8)
9. มะม่วง 10 ppm + ไวรัส	$45.83^{cA} \pm 7.22$ (3.6667/8)	$45.83^{dA} \pm 12.50$ (3.6667/8)
10. มะม่วง 1 ppm + ไวรัส	$41.67^{cA} \pm 0.00$ (3.3333/8)	$45.83^{dA} \pm 7.22$ (3.6667/8)

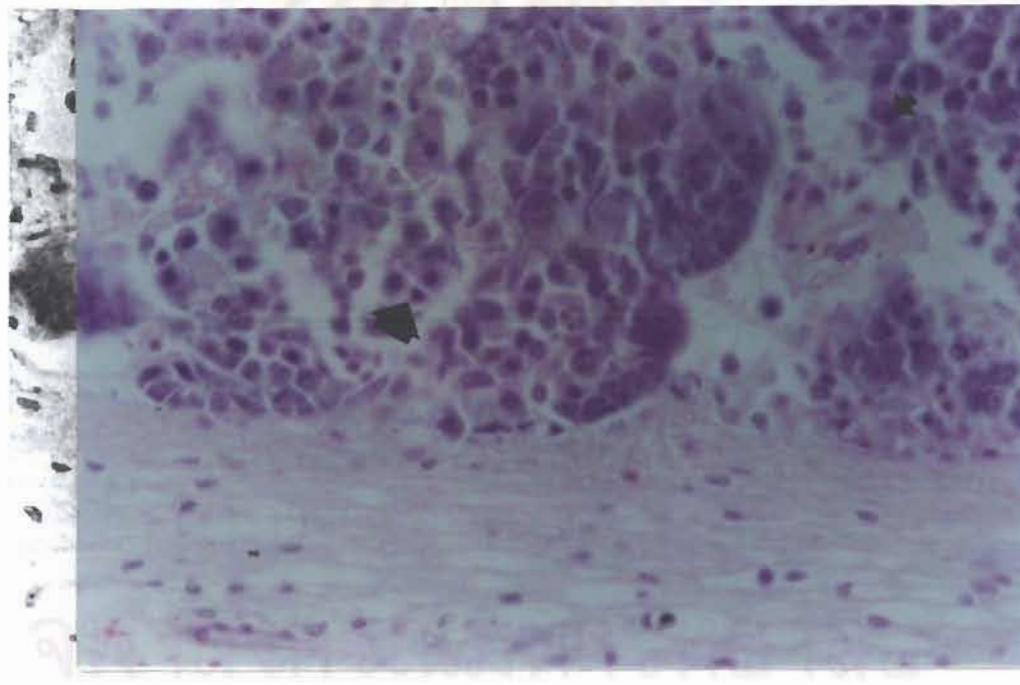
หมายเหตุ : ในวงเล็บ คือ จำนวนกุ้งที่รอดเฉลี่ยหลังจากฉีดเชื้อต่อจำนวนกุ้งทั้งหมด (ตัว)

: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้งหรือแนวนอน คือ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p< 0.01$) หรือมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก

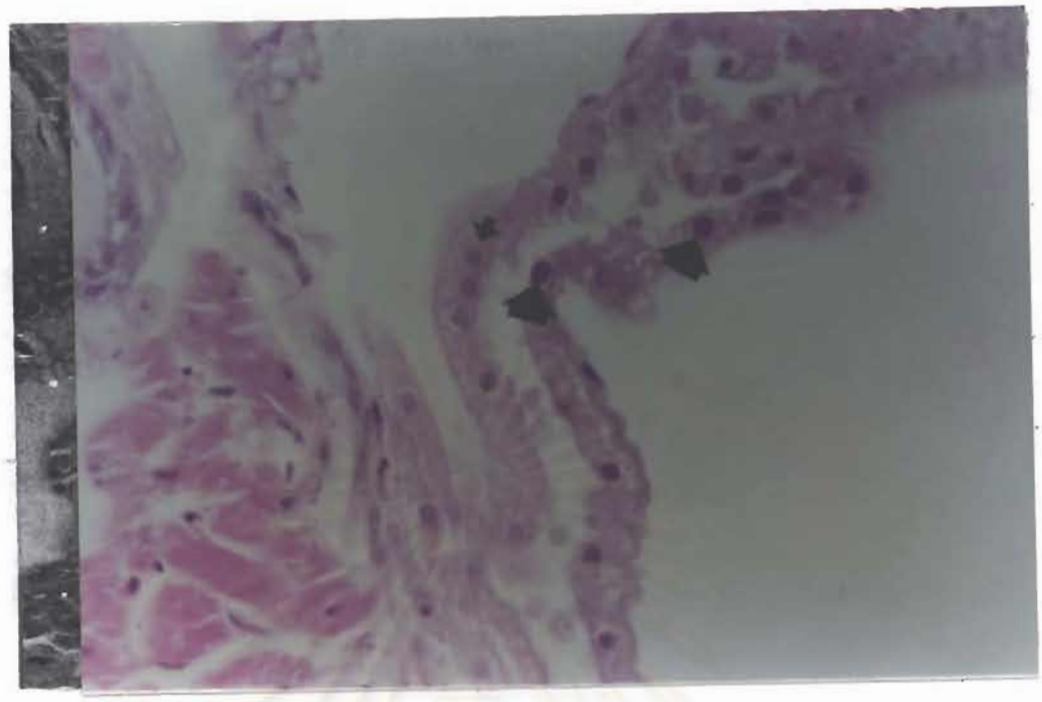


ข

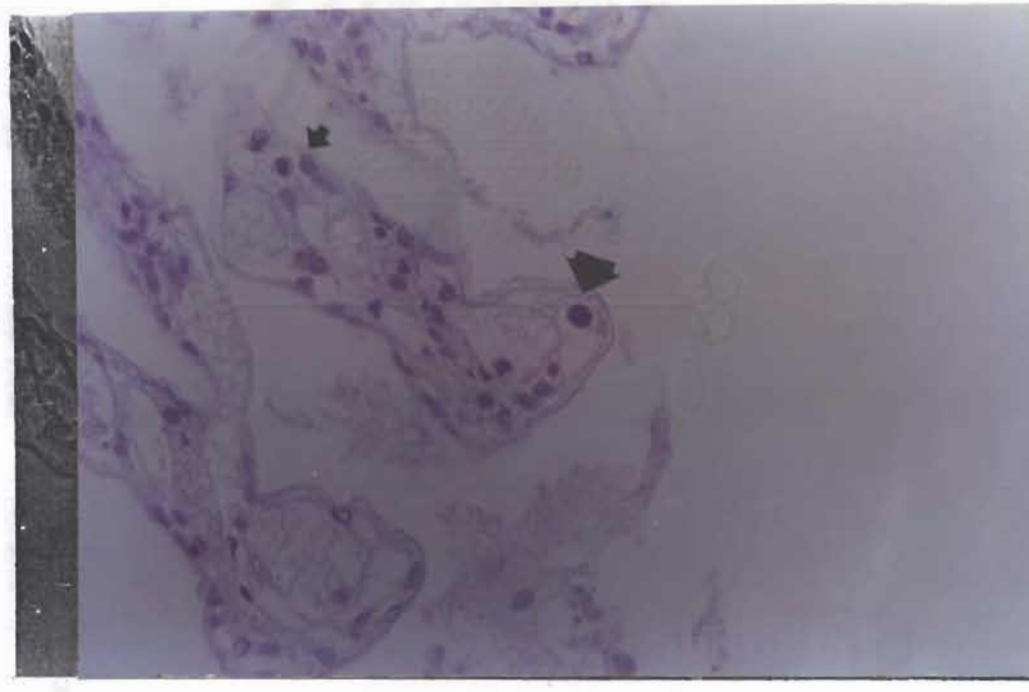
ภาพที่ 7 เนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง พบการตายของนิวเคลียสในเซลล์ (pyknotic nuclei) (ศรชี้สีเข้ม) เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ (ศรชี้) (X 400)

ก. เหงือก

ข. อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (haemopoietic tissue)



ก



ข

ภาพที่ 8 เนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบการบวมพองและการขยายใหญ่ของนิวเคลียสของเซลล์ (hypertrophic nuclei) (ศรชี้สีเข้ม) เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ (ศรชี้) (X 400)

ก. antennal gland

ข. เหงือก

จากตารางที่ 8 และ 9 แสดงคุณสมบัติของน้ำระหว่างการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ พบว่า อุณหภูมิของน้ำ อยู่ในช่วง 28.77-29.11 และ 28.67-29.18 องศาเซลเซียส ความเค็ม อยู่ในช่วง 30.00-30.50 และ 30.90-31.33 ส่วนในพัน ความเป็นกรดเป็นด่าง อยู่ในช่วง 8.00-8.05 และ 8.12-8.16 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ อยู่ในช่วง 6.26-6.38 และ 6.39-6.63 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นด่างทั้งหมด อยู่ในช่วง 159.95-164.83 และ 138.90-148.38 มิลลิกรัมต่อลิตรของ $CaCO_3$ และปริมาณแอมโมเนียทั้งหมด อยู่ในช่วง 1.313-2.214 และ 0.816-1.196 ตามลำดับ

3. <u>การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ</u>

จากตารางที่ 10 แสดงอัตรารอดเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำหลังการได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับ 1,000, 2,500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตรารอดเฉลี่ยเท่ากับ 66.67, 72.22 และ 63.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย ซึ่งมีอัตรารอดเฉลี่ย เท่ากับ 63.89 เปอร์เซ็นต์

สำหรับค่า phenoloxidase activity เฉลี่ยของกุ้งกุลาดำหลังได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 7 วัน แสดงในตารางที่ 11 ผลการทดลองพบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่า phenoloxidase activity สูงสุด เท่ากับ 25.83 units รองลงมาคือกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับ 2,500, 1,000 และ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่า phenoloxidase activity เท่ากับ 15.78, 7.89 และ 5.94 units ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

สำหรับคุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยตลอดการทดลองนี้ แสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 8 คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยตลอดการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ

ชุดการทดลอง	Temp (^{0}c)	ความเค็ม (ppt)	pH	DO (ppm)	Total Alk ppm as $CaCO_3$	Total NH_3 (ppm)
1. ชุดควบคุม (K-199)	29.11	30.24	8.04	6.33	160.83	1.721
2. ชุดควบคุมไวรัสหัวเหลือง	28.80	30.50	8.00	6.30	164.83	2.214
3. มะม่วง 10,000 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	28.90	30.28	8.03	6.26	162.21	1.477
4. มะม่วง 7,500 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	28.79	30.00	8.04	6.29	161.43	1.671
5. มะม่วง 5,000 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	28.79	30.24	8.03	6.35	160.55	1.598
6. มะม่วง 2,500 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	28.78	30.19	8.05	6.38	160.17	1.316
7. มะม่วง 1,000 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	28.89	30.43	8.03	6.31	160.21	1.398
8. มะม่วง 100 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	28.77	30.43	8.04	6.36	159.95	1.394
9. มะม่วง 10 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	28.88	30.48	8.05	6.35	160.79	1.313
10. มะม่วง 1 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	28.97	30.29	8.05	6.29	160.81	1.776

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยตลอดการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

ชุดการทดลอง	Temp (^{0}c)	ความเค็ม (ppt)	pH	DO (ppm)	Total Alk ppm as $CaCO_3$	Total NH_3 (ppm)
1. ชุดควบคุม (K-199)	29.18	31.09	8.13	6.63	145.48	1.004
2. ชุดควบคุมไวรัสตัวแดงดวงขาว	29.01	31.00	8.16	6.46	141.90	1.196
3. มะม่วง 10,000 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	28.91	31.29	8.12	6.39	148.38	1.064
4. มะม่วง 7,500 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	28.78	30.90	8.14	6.48	142.12	1.009
5. มะม่วง 5,000 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	28.76	31.33	8.15	6.50	140.95	0.935
6. มะม่วง 2,500 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	28.88	31.00	8.14	6.52	139.76	0.854
7. มะม่วง 1,000 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	28.91	31.00	8.14	6.55	139.76	0.893
8. มะม่วง 100 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	28.67	31.14	8.15	6.49	138.90	0.816
9. มะม่วง 10 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	28.82	31.29	8.16	6.59	141.55	1.096
10. มะม่วง 1 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	28.98	31.09	8.14	6.41	139.43	1.017

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 อัตรารอดเฉลี่ย (%) ของกุ้งกุลาดำหลังการได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกัน นาน 7 วัน

ชุดการทดลอง	อัตรารอด (%)
1. ชุดควบคุม (อาหาร + มะม่วง 0 ppm)	$63.89^{a} \pm 4.81$
2. อาหาร + มะม่วง 1,000 ppm	$66.67^{a} \pm 0.00$
3. อาหาร + มะม่วง 2,500 ppm	$72.22^{a} \pm 4.81$
4. อาหาร + มะม่วง 5,000 ppm	$63.89^{a} \pm 4.81$

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 11 ค่า phenoloxidase activity เฉลี่ยของกุ้งกุลาดำหลังการได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกัน นาน 7 วัน

ชุดการทดลอง	phenoloxidase activity (units)
1. ชุดควบคุม (อาหาร + มะม่วง 0 ppm)	$5.94^{c} \pm 0.42$
2. อาหาร + มะม่วง 1,000 ppm	$7.89^{c} \pm 1.26$
3. อาหาร + มะม่วง 2,500 ppm	$15.78^{b} \pm 1.08$
4. อาหาร + มะม่วง 5,000 ppm	$25.83^{a} \pm 3.44$

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p< 0.01$)

ตารางที่ 12 คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยตลอดการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ

ชุดการทดลอง	Temp (^{0}c)	ความเค็ม (ppt)	pH	DO (ppm)	Total Alk ppm as $CaCO_3$	Total NH_3 (ppm)
1. ชุดควบคุม (อาหาร + มะม่วง 0 ppm)	27.73	30.00	7.80	6.23	137.62	4.376
2. อาหาร + มะม่วง 1,000 ppm	27.63	30.29	7.88	6.37	138.09	4.481
3. อาหาร + มะม่วง 2,500 ppm	27.55	30.29	7.84	6.31	136.38	4.647
4. อาหาร + มะม่วง 5,000 ppm	27.74	30.24	7.87	6.68	135.91	4.565

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อลูกกุ้งกุลาดำ

จากผลการทดลอง พบว่า ค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวาที่ 18, 30 และ 42 มีค่าเท่ากับ 2,200 (1,966.04-2,461.80), 2,750 (2,387.15-3,168) และ 2,900 (2,495.69-3,369.80) มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) ตามลำดับ ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงของสารสกัดจากสมุนไพรชนิดอื่น ๆต่อลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวาที่ 15 ซึ่งพบว่า ค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงของสารสกัดหยาบจากใบพญายอ (*Clinacanthus nutans*), ใบฝรั่ง (*Psidium guajava*), กะเพรา (*Ocimum sanctum*), ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata*), บอระเพ็ด (*Tinospora crispa*), มะยม (*Phyllanthus acidus*), สารภีทะเล (*Calophyllum inphyllum*), ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) และหญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria*) มีค่าเท่ากับ 2,468 (2,460.2-2,475.8), 2,968, 2,597, 2,789, 3,548, 2,961, 1,987, 2,471 (2,464.7-2,477.3) และ 2,564 (2,558.2-2,569.8) ppm ตามลำดับ (สถาพร และคณะ, 2535; สถาพร และคณะ, 2539; Derekbusarakom และคณะ, 1995; Derekbusarakom และคณะ, 1996) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยมีความเป็นพิษต่ำต่อกุ้งกุลาดำเช่นเดียวกับสมุนไพรชนิดอื่นๆ ทั้งนี้เพราะจากการศึกษาของชุตินันท์ (2534) พบว่า สารสกัดจากใบมะม่วงเขียวเสวยเป็นสารสกัดจากธรรมชาติ เป็นสมุนไพรที่น่าจะมีศักยภาพที่ดี และสามารถรักษาโรคเริมในคนได้ เนื่องจากออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ Herpes simplex virus type-1 และ type-2 ในปริมาณค่อนข้างต่ำกว่าปริมาณที่เป็นพิษต่อเซลล์มาก ซึ่งค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยและสมุนไพรชนิดอื่นๆต่อลูกกุ้งกุลาดำจะไม่เท่ากัน ทั้งนี้อาจมีผลเนื่องมาจากในแต่ละการทดลองมีสภาพแวดล้อม ขนาดของลูกกุ้ง ตลอดจนความแข็งแรงและความทนทานของลูกกุ้ง แตกต่างกันไป และวิธีการสกัดสารจากสมุนไพรที่แตกต่างกันด้วย กล่าวคือ ในการทดลองครั้งนี้ใช้วิธีสกัดด้วยน้ำและนำไประเหยต่อในเครื่องระเหย (rotary evaporator) แต่การทดลองอื่นๆ ดังกล่าวใช้วิธีสกัดของ Herunsalee และคณะ (1993) คือ สกัดด้วยสารละลายเอทธานอล แล้วผสมด้วยสาร polyvinyl pyrroridone (PVP) เพื่อให้สามารถละลายน้ำได้ดี แต่ค่าดังกล่าวก็เป็นค่าที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยและสมุนไพรชนิดอื่นๆดังกล่าวมีความเป็นพิษต่ำต่อกุ้งกุลาดำ

จากการศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อกุ้งกุลาดำระยะ PL-18, PL-30 และ PL-42 พบว่า ค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียว-

เสวยมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อลูกกุ้งมีขนาดใหญ่ขึ้น ทั้งนี้เพราะกุ้งแต่ละขนาดจะสามารถทนต่อสารสกัดดังกล่าวได้ไม่เท่ากัน โดยทั่วไปลูกกุ้งขนาดใหญ่ขึ้นจะทนต่อความเป็นพิษของสารเคมีได้มากขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาในสารเคมีที่ใช้ในการป้องกันไวรัสในกุ้งกุลาดำ ได้แก่ แคลเซียมไฮโป-คลอไรด์หรือคลอรีนผง และเบนซัลโคเนียมคลอไรด์หรือบี เค ซี (ลิลา, 2539) ซึ่งพบว่า ลูกกุ้งกุลาดำสามารถทนต่อความเป็นพิษของสารเคมีดังกล่าวได้สูงขึ้น เมื่อลูกกุ้งมีขนาดโตขึ้น (ดวงพร, 2532; อรุณี, 2538; สมประสงค์, 2539) แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นยังขึ้นกับปัจจัยอื่นๆด้วย เช่น ความทนทานและแข็งแรงของลูกกุ้ง ซึ่งถึงแม้ในการทดลองครั้งนี้จะใช้กุ้งชุดเดียวกัน ก็อาจมีความทนทานและแข็งแรงไม่เท่ากัน

จากการทดลองพบว่า หลังเติมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในเวลา 24 ชั่วโมง มีผลต่อคุณสมบัติของน้ำ คือ อุณหภูมิของน้ำและค่าความเค็มไม่แตกต่างไปจากก่อนการเติมสาร ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเป็นกรดเป็นด่าง และความเป็นด่างทั้งหมดลดลง ตามปริมาณสารที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เพราะในใบมะม่วงประกอบด้วย chinomin, gallic acid ethyl ester, protocatechuic acid, gallic acid, methylchinomin, mangiferonic acid และ quercetin (Zhongyi และคณะ, 1982) ซึ่งสารสำคัญส่วนมากมีคุณสมบัติเป็นกรด จึงทำให้ความเป็นกรดเป็นด่างลดลง สำหรับปริมาณแอมโมเนียทั้งหมดเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีการให้อาร์ทีเมียเป็นอาหาร มีการตายไปบางส่วนของทั้งอาร์ทีเมียและกุ้ง ปริมาณแอมโมเนียทั้งหมดที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากการย่อยสลายซากอาร์ทีเมียที่ตายแล้ว สิ่งขับถ่ายที่ถูกปล่อยออกมาจากตัวกุ้ง และการเน่าของใบมะม่วง อย่างไรก็ตาม คุณสมบัติของน้ำที่เปลี่ยนไปของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อลูกกุ้งกุลาดำทั้ง 3 ระยะ (ตารางที่ 4, 5 และ 6) ยังอยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อกุ้งกุลาดำ คือ อุณหภูมิของน้ำที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ คือ 25-33 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดเป็นด่าง 6.0-9.0 กุ้งจะเจริญเติบโตดีที่สุด และที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.0-6.0 การเจริญเติบโตของกุ้งจะช้าลง (Chen, 1985) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตตามปกติของกุ้งกุลาดำอยู่ในระดับที่มากกว่า 3.8 มิลลิกรัมต่อลิตร (พานิชย์ และจารุวัฒน์, 2538) ความเค็มที่เหมาะสมสำหรับลูกกุ้งกุลาดำขนาด PL-15 และ PL-30 คือ 27-30 และ 20-25 ส่วนในพัน ตามลำดับ ส่วนที่ความเค็มเกิน 30 ส่วนในพัน ซึ่งเป็นบริเวณที่รับน้ำโดยตรงจากทะเลการเจริญเติบโตของกุ้งจะช้า (ชลอ, 2534) และความเป็นด่างมากกว่า 80 มิลลิกรัมต่อลิตร (พรเลิศ และคณะ, 2537) สำหรับค่าพิษเฉียบพลันของปริมาณแอมโมเนียรวม-ไนโตรเจนต่อลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวาในระดับความเข้มข้นที่ทำให้ลูกกุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 52.11 มิลลิกรัมต่อลิตร (Chin และ Chen, 1987) ดังนั้น ในการทดลองนี้คุณสมบัติของน้ำที่เปลี่ยนไปของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อลูกกุ้งกุลาดำทั้ง 3 ระยะ จึงไม่มีผลทำให้ลูกกุ้งตาย จึงเป็นการตายเนื่องมาจากสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยโดยตรง และเมื่อพิจารณา

ถึงการนำสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยไปใช้ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งควรต้องมีการทดลองยืนยันอีกครั้งในฟาร์มกุ้ง ทั้งนี้เนื่องจากมีปัจจัยทางสภาพแวดล้อมอื่น ๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง ได้แก่ อากาศ แสง คุณสมบัติของน้ำ และปริมาณสารอินทรีย์ เป็นต้น ซึ่งไม่สามารถควบคุมได้เช่นในห้องทดลอง ซึ่งอาจจะมีผลต่อความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยได้ เช่นเดียวกับสารเคมีบางชนิด ได้แก่ เบนซัลโคเนียมคลอไรด์ ความเป็นพิษจะลดลงเมื่ออุณหภูมิลดลง (อรุณศรี และคณะ, 2533) และที่ความกระด้างต่ำความเป็นพิษจะเพิ่มขึ้น (Hosking และ Dalziel, 1984) ส่วนคลอรีน ความเป็นพิษจะเพิ่มขึ้นถ้าความเค็มเพิ่มขึ้น (Hileman, 1982)

2. <u>การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ</u>

จากผลการศึกษา พบว่า สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยมีสารที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยตรง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของชุตินันท์ (2534) ที่ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยน้ำของก้านและใบมะม่วงเขียวเสวย พบว่า มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อไวรัส Herpes simplex virus type-1 และ type-2 โดยตรงก่อนไวรัสเข้าสู่เซลล์ และมีผลยับยั้งการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสทั้ง 2 types ภายในเซลล์ หลังจากที่ไวรัสเข้าสู่เซลล์แล้ว ทั้งนี้เพราะในใบมะม่วงมีสารสำคัญ คือ mangiferin และ isomangiferin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อ Herpes simplex virus ได้ดี (Anon, 1989) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารประกอบพวก triterpenoids (Anjaneyulu และคณะ, 1982) โดยเฉพาะ methylchinomin และ quercetin ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Zhongyi และคณะ, 1982)

จากผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ พบว่า ค่าความเข้มข้นของสารสกัดดังกล่าวที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยตรงได้ 100 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) ซึ่งมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากกะเพรา (*Ocimum sanctum*), ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata*), บอระเพ็ด (*Tinospora crispa*), มะยม (*Phyllanthus acidus*), สารภีทะเล (*Calophyllum inphyllum*) และหญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria*) 10 เท่า (1,000 ppm) และสูงกว่าลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) 100 เท่า (100 ppm) (สถาพร และคณะ, 2539; Derekbusarakom และคณะ, 1995) ขณะที่สูงกว่าใบพญายอ (*Clinacanthus nutans*) ถึง 10,000 เท่า (1 ppm) (สถาพร และคณะ, 2535) แต่ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm ของสารสกัดจากกะเม็ง (*Eclipta alba*), มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica*) และฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) จะไม่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อไวรัสชนิดนี้ (สถาพร และคณะ, 2539) และความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ 1 ppm สามารถ

I18374037

ยับยั้งเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้ โดยกุ้งมีอัตรารอดเท่ากับ 41.67 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ในระดับความเข้มข้นเดียวกันนี้ของสารสกัดจากลูกใต้ใบ (*P. amarus*) ให้ผลในการยับยั้งเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้ต่ำกว่า 2 เท่า โดยกุ้งมีอัตรารอดเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ และของหญ้าใต้ใบ (*P. urinaria*) จะไม่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อไวรัสชนิดนี้ (Derekbusarakom และคณะ, 1995) สำหรับผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ พบว่า ค่าความเข้มข้นของสารสกัดดังกล่าวที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยตรงได้ 100 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 10,000 ppm ซึ่งมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากหญ้าใต้ใบ (*P.* urinaria) ถึง 10 เท่า (1,000 ppm) ขณะที่ในระดับความเข้มข้นเดียวกันนี้ของสารสกัดจากใบฝรั่ง (*Psidium guajava*), ก้างปลาเครือ (*P. reticulatus*), มะยม (*P. acidus*), พญายอ (*C. nutans*), ธรณีสาร (*P. pulcher*) และลูกใต้ใบ 2 ชนิด ได้แก่ *P. debelis* และ *P. amarus* มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้ต่ำกว่า โดยกุ้งมีอัตรารอดเท่ากับ 58-85 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ 10 ppm สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้ โดยกุ้งมีอัตรารอดเท่ากับ 45.83 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากหญ้าใต้ใบ (*P.* urinaria) ที่ระดับเดียวกันนี้ จะไม่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อไวรัสชนิดนี้ (สถาพร และคณะ, 2540) จะเห็นได้ว่าระดับความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยตรงของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยแตกต่างจากสมุนไพรชนิดอื่น ๆดังกล่าว อาจเนื่องมาจาก วิธีการสกัดที่แตกต่างกัน กล่าวคือ การทดลองครั้งนี้ใช้วิธีสกัดด้วยน้ำและนำไประเหยต่อในเครื่องระเหย (rotary evaporator) แต่การทดลองอื่นๆ ดังกล่าวใช้วิธีสกัดด้วยสารละลายเอทธานอล แล้วผสมด้วยสาร polyvinyl pyrroridone (PVP) (Herunsalee และคณะ; 1993) ความแตกต่างของสารสำคัญที่ต้านไวรัสทั้งชนิดและปริมาณที่มีอยู่ในสมุนไพรแต่ละชนิด และปริมาณเชื้อไวรัสที่แตกต่างกัน อีกทั้งขนาดและความแข็งแรงของกุ้งแต่ละการทดลองแตกต่างกัน ขนาดของกุ้งที่ใช้ในการทดลองกับเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวในครั้งนี้ คือ 7.21-14.19 กรัม (เฉลี่ย 10.26 กรัม) และ 7.09-15.68 กรัม (เฉลี่ย 10.59 กรัม) ตามลำดับ ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าเมื่อเทียบกับการทดลองอื่น ๆ ดังกล่าวซึ่งใช้กุ้งขนาด 15-20 กรัม

นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm จะสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ดีกว่าไวรัสหัวเหลือง โดยกุ้งจะมีอัตรารอดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ขณะที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100, 1,000, 2,500, 7,500 และ 10,000 ppm จะสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดได้ใกล้เคียงกัน โดยกุ้งมีอัตรารอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ทั้งนี้อาจเกิดจากความแตกต่างของสารพันธุกรรมของไวรัสทั้งสองชนิด กล่าวคือ สารพันธุกรรมของไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาว เป็นแบบอาร์เอ็นเอ (Wongteerasupaya และคณะ, 1995) และแบบดีเอ็นเอ (จิราพร และคณะ, 2537) ตามลำดับ อีกทั้ง

ชนิดและปริมาณของสารสำคัญที่ต้านไวรัสในใบมะม่วง ใบมะม่วงมีสารสำคัญคือ mangiferin และ isomangiferin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อ Herpes simplex virus ได้ดี (Anon, 1989) methylchinomin และ quercetin ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Zhongyi และคณะ, 1982) ซึ่งเป็นไวรัสชนิดดีเอ็นเอเช่นเดียวกับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว สำหรับปัจจัยอื่น ๆ ที่จะทำให้สารออกฤทธิ์ในพืชชนิดเดียวกันมีชนิดและปริมาณแตกต่างกัน ได้แก่ แหล่งปลูก อายุ และฤดูกาล (อุดมลักษณ์, 2540) ไม่น่าจะมีผลต่อการทดลองนี้ ทั้งนี้เพราะการทดลองทั้งสองการทดลองนี้ใช้ใบมะม่วงเขียวเสวย ซึ่งเก็บมาจากแหล่งเดียวกันและในฤดูกาลเดียวกัน เช่นเดียวกันกับขนาดของกุ้งที่ใช้ก็ไม่แตกต่างกัน

การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ สามารถใช้ในการตรวจสอบหรือวินิจฉัยโรคไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำได้ (พรเทพ, 2537; กิจการ และ สิทธิ, 2539) สำหรับโรคหัวเหลือง พบว่า กุ้งบางตัวอย่างจะไม่แสดงอาการของโรคหัวเหลือง คือ บริเวณส่วนหัวและเหงือกมีสีเหลือง ตัวซีด แต่เมื่อทำการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ พบว่ามีลักษณะเหมือนกับตัวอย่างกุ้งที่เป็นโรคหัวเหลือง (Flegel และ Sriurairatana, 1993) จากผลการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง พบว่า มีการตายของนิวเคลียสในเซลล์ (pyknotic nuclei) ของหลาย ๆอวัยวะ เช่น ซี่เหงือก ต่อมน้ำเหลือง และกระเพาะอาหาร เป็นต้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ พรเทพ (2537) และ กิจการ และ สิทธิ (2539) ดังนั้น จึงสามารถกล่าวได้ว่า กุ้งที่ตายหลังฉีดเชื้อมีเชื้อไวรัสหัวเหลืองอยู่จริง และพบว่ากุ้งทดลองมีอัตราการตายสูงภายใน 2-3 วันหลังจากฉีดเชื้อ ทั้งนี้เพราะหลังจากที่กุ้งได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองประมาณ 32 ชั่วโมง การเพิ่มจำนวนอนุภาคไวรัสจะเกิดขึ้นภายในไซโตพลาสซึมเป็นส่วนใหญ่ ทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์ถูกทำลายอย่างรวดเร็วเป็นผลให้กุ้งตายภายในเวลา 48-56 ชั่วโมง ภายหลังได้รับเชื้อ (จิราพร และคณะ, 2537) สำหรับผลการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่ามีการบวมพองและการขยายใหญ่ของนิวเคลียสของเซลล์ (hypertrophic nuclei) บริเวณเนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก (subcuticular epidermal) และหลาย ๆอวัยวะ เช่น ซี่เหงือก กระเพาะอาหาร antennal gland เป็นต้น และพบว่ากุ้งทดลองมีอัตราการตายสูงภายใน 3-4 วันหลังจากฉีดเชื้อ เช่นเดียวกับการศึกษาของจิราพร และคณะ (2538) และกิจการ และ สิทธิ (2539) ดังนั้น จึงสามารถกล่าวได้ว่ากุ้งที่ตายหลังฉีดเชื้อมีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวอยู่จริง

คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยตลอดการทดลอง อยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อกุ้งกุลาดำ ซึ่งไม่มีผลต่อความเครียดของกุ้งกุลาดำ เพราะความเครียดทำให้ความต้านทานโรคลดลงและมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Pickering, 1989) กล่าวคือ อุณหภูมิของน้ำที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำคือ 25-33 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดเป็นด่าง 6.0-9.0 กุ้งจะเจริญเติบโตดีที่สุด (Chen, 1985)

ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตตามปกติของกุ้งกุลาดำอยู่ในระดับที่มากกว่า 3.8 มิลลิกรัมต่อลิตร (พานิชย์ และจารุวัฒน์, 2538) ความเค็มที่เหมาะสมสำหรับกุ้งกุลาดำใหญ่ คือ 10-15 ส่วนในพัน ส่วนที่ความเค็มเกิน 30 ส่วนในพัน ซึ่งเป็นบริเวณที่รับน้ำโดยตรงจากทะเลการเจริญเติบโตของกุ้งจะช้า (ชลอ, 2534) และความเป็นด่างมากกว่า 80 มิลลิกรัมต่อลิตร (พรเลิศ และคณะ, 2537) สำหรับค่าพิษเฉียบพลันของปริมาณแอมโมเนียรวม-ไนโตรเจนต่อกุ้งกุลาดำขนาด 0.8-4.5 กรัมในระดับความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 37.4 มิลลิกรัมต่อลิตร (Allan และคณะ, 1990)

การศึกษานี้ เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นถึงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดง-ดวงขาวในกุ้งกุลาดำของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยด้วยน้ำเท่านั้น จากการศึกษาทราบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยด้วยน้ำที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดโดยตรงได้ 100 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อลูกกุ้งกุลาดำระยะโพลสต์ลาวา 18, 30 และ 42 ประมาณ 3-4 เท่า (จากผลการทดลองที่ 1) เพราะฉนั้นการใช้สารสกัดนี้โดยวิธีการแช่คงไม่เหมาะสม เพราะต้องใช้สารสกัดในปริมาณมากมากมายมหาศาล อีกทั้งอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติบางประการของน้ำได้ เช่น ความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และความเป็นด่างลดลง สำหรับปริมาณแอมโมเนียทั้งหมดจะมีค่าเพิ่มขึ้น (จากผลการทดลองที่ 1) อย่างไรก็ตาม สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยด้วยน้ำอาจเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อใช้ป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ด้วยตนเองต่อไป เนื่องจากมะม่วงเขียวเสวยเป็นพืชที่หาได้ง่ายภายในประเทศ นิยมปลูกกันแพร่หลายเพื่อรับประทานเป็นผลไม้ ใบมะม่วงไม่นิยมนำมารับประทาน จึงสามารถหาได้ในปริมาณมาก ๆ โดยไม่ต้องซื้อหรือซื้อได้ในราคาถูก และที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย 1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถทำลายไวรัสทั้งสองชนิดได้โดยตรงคล้ายกับคุณสมบัติของสารฆ่าเชื้อที่ใช้กันทั่วไป โดยกุ้งมีอัตรารอดประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ จึงเห็นควรที่จะมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านต่าง ๆ เช่น วิธีการสกัดสารออกฤทธิ์โดยตรงต่อเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำให้ได้ปริมาณมากๆ การเก็บรักษาสารสกัด เป็นต้น ตลอดจนการนำสารสกัดนี้ไปทดลองใช้ในฟาร์มกุ้งจริงๆ เพื่อเป็นแนวทางการใช้สารสกัดนี้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อวงการธุรกิจการเลี้ยงกุ้งต่อไป

3. การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ

จากการทดลองนี้ พบว่า ค่า phenoloxidase activity เฉลี่ยในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำหลังได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยด้วยน้ำที่ระดับความเข้มข้น 2,500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร วันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) นาน 7 วัน มีค่าเท่ากับ 15.78 และ 25.83 units ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) กับกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับ 1,000 และ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่า phenoloxidase activity เท่ากับ 7.89 และ 5.94 units ตามลำดับ แสดงว่าการให้กุ้งกุลาดำได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งโดยให้ค่า phenoloxidase activity ในน้ำเลือดสูงขึ้นได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Derekbusarakom และคณะ (1995) พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดจากหญ้าใต้ใบ *(P. urinaria)* และลูกใต้ใบ *(P. amarus)* ด้วยเอทธานอลแล้วผสม PVP ในอัตรา 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม วันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) นาน 7 วัน มีผลกระตุ้นให้ค่า phagocytic index เพิ่มมากกว่ากลุ่มควบคุม 18.35 และ 20.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับในกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดจากใบพญายอ (*C. nutans*) ด้วยเอทธานอลแล้วผสม PVP ในอัตรา 20 ไมโครกรัมต่อตัว โดยวิธีการฉีด จะมีผลกระตุ้นให้ค่า phagocytic index เพิ่มมากกว่าในกลุ่มควบคุม 7.94 และ 2.98 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 3 และ 24 ชั่วโมงหลังฉีด ตามลำดับ (สถาพร และคณะ, 2534) ในขณะที่การศึกษาของภัสสร และคณะ (2540) พบว่า ค่าสารต้านฤทธิ์แบคทีเรีย (bactericidin) ในกุ้งกุลาดำหลังจากได้รับสารสกัดจากลูกใต้ใบ *(P. amarus)* ที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวิธีการป้อน ที่เวลาการป้อน 1 และ 6 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกลุ่มควบคุม จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยด้วยน้ำมีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งเช่นเดียวกับสมุนไพรบางชนิดดังกล่าว

จะเห็นได้ว่า การศึกษาว่าสมุนไพรมีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งหรือไม่ สามารถทำได้โดย การวัดค่า agglutinin ซึ่งเป็นการศึกษาภูมิคุ้มกันสารน้ำในกุ้ง (humural immune system) การวัดค่า phagocytic index การวัดค่า bactericidin และการวัดค่า phenoloxidase activity ซึ่งเป็นการศึกษาภูมิคุ้มกันทางเซลล์ในกุ้ง (cellular immune system) ทั้งนี้เพราะในกุ้งมีระบบภูมิคุ้มกันทางเซลล์ โดยเฉพาะขบวนการกลืนทำลาย (phagocytosis) ซึ่งเป็นหน้าที่สำคัญอย่างหนึ่งของเม็ดเลือดกุ้ง (haemocyte) เพื่อที่จะทำลายสิ่งแปลกปลอม หรือป้องกันไม่ให้สิ่งแปลกปลอมมาบุกรุกเข้าไปในร่างกายได้ โดยการเคลื่อนที่ของ haemocyte พวก hyalinocyte ไปยังบริเวณที่มีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาในร่างกาย นอกจากนี้ยังมีขบวนการต่าง ๆเข้ามาเกี่ยวข้องอีกมากมาย ได้แก่ nodule

formation และ encapsulation ในกรณีถ้ามีสิ่งแปลกปลอมจำนวนมาก หรือมีขนาดใหญ่จน haemocyte ไม่สามารถใช้วิธีการ phagocytosis โดยวิธีเดียวได้ จึงต้องใช้วิธีการรวมกลุ่มของ haemocyte ทำให้เกิด nodule formation และ encapsulation ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดขอบเขตการแพร่กระจายของเชื้อโรคได้มาก โดยจะควบคุมให้อยู่ภายใน haemocoel และกำจัดออกจากร่างกายต่อไป อีกทั้งระบบการแข็งตัวของเลือด (clotting of haemolymph) และระบบ Prophenoloxidase activating system ซึ่งเป็นขบวนการป้องกันตัวที่สำคัญ เนื่องจากมันจะค้นหาสิ่งแปลกปลอม ระบบนี้ประกอบด้วยหน่วยของ serine protease และ coagulogen รวมทั้งองค์ประกอบอื่น ๆที่จะกระตุ้นให้เซลล์รู้จักสิ่งแปลกปลอม เริ่มจากการกระตุ้นของเซลล์ที่ได้รับสารกลุ่ม lipopolysaccharide หรือ beta 1,3 glucan ซึ่งจะมีตัวรับ (receptor) อยู่ที่เซลล์ รวมทั้ง peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์จุลชีพหลายชนิด ก็สามารถกระตุ้นระบบนี้ได้ หลังจากการได้รับการกระตุ้น serine protease จะเปลี่ยนไปเป็น active serine protease มีผลไปยังปฏิกริยาการเปลี่ยน prophenoloxidase ให้เป็น phenoloxidase ปฏิกริยาการเปลี่ยนช่วงสุดท้ายนี้สามารถถูกกระตุ้นอีกทางได้ คือ เมื่อปริมาณแคลเซียมอิออนลดลงต่ำ จะไปกระตุ้นให้มีการเปลี่ยน serine protease S ให้เป็น active serine protease S แล้วมากระตุ้นให้ prophenoloxidase เปลี่ยนเป็น phenoloxidase ได้เช่นกัน ผลของการเกิดปฏิกิริยาทั้งหมดนี้จะให้ peptide ซึ่งสามารถไปกระตุ้นให้เกิดขบวนการต่าง ๆ ได้แก่ การแข็งตัวของเลือด การเกิด melanization, opsonization และช่วยในการติดต่อระหว่างเซลล์ อีกระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง คือระบบภูมิคุ้มกันสารน้ำ จะเป็นองค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับการเกิด agglutination, precipitation หรือการทำให้สิ่งแปลกปลอมหมดฤทธิ์ รวมถึงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง bactericidal, lytic และ bacteriostatic ทั้งนี้โดยทั่วไปจะหมายถึงสารที่เกี่ยวข้องกับการเป็นพิษต่อเชื้อรา สารต่อต้านเชื้อไวรัส หรือ cytotoxic agent อื่น ๆ (นันทริกา, 2538; Smith และ Soderhall, 1986a; Smith และ Soderhall, 1986b)

จากการทดลองพบว่า เปอร์เซ็นต์รอดของกุ้งกุลาดำหลังได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับ 0, 1,000, 2,500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 63.89, 66.67, 72.22 และ 63.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) โดยการตายส่วนใหญ่เนื่องมาจากการกินกันเอง และเมื่อพิจารณาจากคุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยตลอดการทดลอง พบว่า อุณหภูมิของน้ำ อยู่ในช่วง 27.55-27.74 องศาเซลเซียส ความเค็ม อยู่ในช่วง 30.00-30.29 ส่วนในพัน ความเป็นกรดเป็นด่าง อยู่ในช่วง 7.80-7.88 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ อยู่ในช่วง 6.23-6.68 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นด่างทั้งหมด อยู่ในช่วง 135.91-138.09 มิลลิกรัมต่อลิตรของ $CaCO_3$ และปริมาณแอมโมเนียทั้งหมด อยู่ในช่วง 4.376-4.647 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อกุ้งกุลาดำ ดังนั้น อาจกล่าวได้ว่าการให้กุ้งได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยระดับความเข้มข้นไม่เกิน 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร วันละ 2

ครั้ง (เช้า-เย็น) นาน 7 วัน โดยพิจารณาจากอัตรารอดจะไม่เป็นพิษต่อกุ้งกุลาดำ สอดคล้องกับการศึกษาของ Derekbusarakom และคณะ (1996) พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดจากใบฝรั่ง (*Psidium guajava*) ในอัตราไม่เกิน 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นาน 7 วัน จะไม่เป็นพิษต่อกุ้งกุลาดำโดยพบว่าไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ตับอ่อน และ lymphoid organ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผล

1. ค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 18, 30 และ 42 มีค่าเท่ากับ 2,200 (1,966.04-2,461.80), 2,750 (2,387.15-3,168) และ 2,900 (2,495.69-3,369.80) มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีค่าฟังก์ชันความลาดเอียงที่ช่วงเชื่อมั่น 95 % เท่ากับ 1.505 (1.393-1.625), 1.753 (1.506-2.040) และ 1.602 (1.392-1.844) ตามลำดับ

2.คุณสมบัติต่างๆของน้ำระหว่างการทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย พบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยไม่มีผลต่ออุณหภูมิของน้ำ และความเค็ม แต่มีผลให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเป็นกรดเป็นด่าง และความเป็นด่างทั้งหมดลดลง ส่วนปริมาณแอมโมเนียทั้งหมดเพิ่มขึ้น ซึ่งยังอยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อลูกกุ้งกุลาดำ

3.ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยตรงได้ 100 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100, 1,000, 2,500, 5,000 และ 7,500 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสหัวเหลืองกับไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ต่ำกว่า โดยกุ้งมีอัตรารอดเท่ากับ 41.67 กับ 45.83, 45.83 กับ 45.83, 50.00 กับ 50.00, 54.17 กับ 54.17, 66.67 กับ 58.33, 66.67 กับ 83.33 และ 70.83 กับ 87.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

4. สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm จะสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ดีกว่าเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยกุ้งจะมีอัตรารอดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ขณะที่สารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100, 1,000, 2,500, 7,500 และ 10,000 ppm จะสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดได้ใกล้เคียงกัน โดยกุ้งมีอัตรารอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)

5. การให้กุ้งกุลาดำได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป วันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) นาน 7 วัน สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งโดยให้ค่า phenoloxidase activity ในน้ำเลือดสูงขึ้นได้ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) กับกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับ 1,000 และ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

6. การให้กุ้งได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยระดับความเข้มข้นไม่เกิน 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร วันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) นาน 7 วัน จะไม่เป็นพิษต่อกุ้งกุลาดำ โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์รอดของกุ้งกุลาดำหลังได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับ 0, 1,000, 2,500 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 63.89, 66.67, 72.22 และ 63.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์ และ สิทธิ บุณยรัตนผลิน. 2539. การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและเซลล์ในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและโรคตัวแดงดวงขาว. วารสารสงขลานครินทร์ 18(1) :17-13.

คมสัน ลีลาคหกิจ. 2539. ความเคลื่อนไหวในแวดวงวิชาการ เขาซื้อขายกุ้งกุลาดำกันอย่างไร. วารสารการประมง 49(5):465-468.

จิราพร เกษรจันทร์ , กิจการ ศุภมาตย์ และ สิทธิ บุณยรัตนผลิน. 2537. การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสหัวเหลืองใน lymphoid organ ของกุ้งกุลาดำโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 2/2537 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 10 น.

จิราพร เกษรจันทร์, สิทธิ บุณยรัตนผลิน, เรวัตร คงประดิษฐ์ และอุษณีย์ เอกปฏิฐานพงศ์. 2538. ไวรัสรูปแท่ง สาเหตุของโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2538 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 11 น.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2534. คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. บริษัทฐานร่วมหอ จำกัด. กรุงเทพฯ. 202 น.

ชุตินันท์ กันตสุข. 2535. การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นเพื่อหาฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมแพลกซ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ดวงพร วัชรเกษมสินธุ์. 2532. พิษเฉียบพลันของเบนซัลโคเนียมคลอไรด์ คอปเปอร์คีเลท มาลาไคท์กรีน และเทรฟแลนต่อกุ้งกุลาดำวัยอ่อน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นันทริกา ชันซื่อ. 2538. ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง. 332-342. *ใน* ประมวลการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 22, 20-22 พฤศจิกายน 2538. จุฬาลงกรณ์มหาวิทาลัย, กรุงเทพฯ.

พรเทพ ปลอดภัย. 2537. การศึกษาช่วงระยะเวลาการมีชีวิตของเชื้อไวรัสหัวเหลืองในน้ำทะเล และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้ง และเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พรเลิศ จันทร์รัชชกูล, เจ เอฟ เทอร์นบอล และ ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2537. คู่มือการเลี้ยงและป้องกันโรคกุ้งกุลาดำ. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 98 น.

พานิชย์ สังข์เกษม และ จารุวัฒน์นภีตะภัฏ. 2538. อัตราการบริโภคออกซิเจนและปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งบางชนิด. เอกสารวิชาการฉบับที่ 24/2538, สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดระยอง กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 23 น.

ลิลา เรืองแป้น. 2539. โรคกุ้งกุลาดำและการป้องกันรักษา. น. 33-44. *ใน* เอกสารเผยแพร่. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 49 น.

ศิริพงษ์ พนาสนธิ์ และ ยุพินท์ วิวัฒนชัยเศรษฐ์. 2539. สัมมนาเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำที่จังหวัดสงขลา. วารสารการประมง 49(3) : 256-262.

สถาพร ดิเรกบุษราคม, อังคณา หิรัญสาลี, สิทธิ บุณยรัตผลิน, เยาวนิตย์ ดนยดล และอุษณีย์ เอกปณิธาพงศ์. 2535. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบพญายอต่อเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 7/2535, สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 6 น.

สถาพร ดิเรกบุษราคม, อังคณา หิรัญสาลี และสมพร รุ่งกำเนิดวงศ์. 2539. ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรเก้าชนิดต่อเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ, เอกสารวิชาการฉบับที่ 6/2539, สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 6 น.

สถาพร ดิเรกบุษราคม, เครือวัลย์ อ่อนทอง, สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์ และนิพัทธ์ โชติการ. 2540. ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรบางชนิดต่อเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ, น. 145-150. *ใน* การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35 สาขาประมง วิทยาศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์ คหกรรมศาสตร์ การจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม ศึกษาศาสตร์ และเศรษฐศาสตร์, 3-5 กุมภาพันธ์ 2540. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมประสงค์ ขันถม. 2539. ผลของเบนซาลโคเนียมคลอไรด์ต่ออัตราการตายของลูกกุ้งกุลาดำ, เอกสารวิชาการ ฉบับที่7/2539, ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์, กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 18 น.

บุศบรรณ ณ สงขลา. สมุนไพร ตอนที่ 1. โรงพิมพ์ฟันนี่พับบลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ. 81 น.

อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ. 2540. สารออกฤทธิ์จากพืช. ข่าวสารวัตถุมีพิษ. 24(1):33-36.

อรุณศรี เตชัสหงส์, สันติ ถุงสุวรรณ และ เกรียงศักดิ์ สายธนู. 2533. ประสิทธิภาพของยาฆ่าเชื้อกลูตารัลดีไฮด์ เฮกซาคลอโรเฟน และเบนซัลโคเนียมคลอไรด์. เวชชสารสัตวแพทย์ 20 : 293-309.

อรุณี จิตรกร. 2538. ผลของแคลเซียมไฮโปคลอไรด์ต่อคุณสมบัติของน้ำ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*. Fabricius) แพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์บางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Allan, G. A., G. B. Maguire and S. J. Hopkins. 1990. Acute chornic toxicity of ammonia to juvenile *Metapenaeus macleayi* and *Penaeus monodon* and the influence of low dissolved-oxygen levels. Aguaculture 91:265-280.

Anjaneyalu, V., K. H. Prasad and G.S. Rao. Triterpenoids of the leaves of *Mangifera indica*. Indian J. Pharm Sci 44 (3) : 58-59.

Anon. 1989. Mangoes for Herps. Acta Pharmocological Sinica 10 (1) : 85-90.

A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13th ed. Association of Official Agricultural Chemist, Inc., Verginia. 1422 p.

APHA, AWWA and WPCA. 1992. Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 18th ed., American Public Health Association, Washington, D.C. 1080 p.

Bell, T.A. and D. V. Lightner. 1988. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp History. World Aquaculture Society, Baton Rouge. 114p.

Chen, H.C. 1985. Water quality management for farming the giant shrimp, *Penaeus monodon*, p. 165. *In* Y. Taki, J.H. Primavera and J.A. Llobvera (eds.). Proceeeding of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawn/Shrimps. Aquaculture Department, SEAFDEC, Iloilo Philippines.

Chin, T. S. and J. C. Chen. 1987. Acute toxicity of ammonia to larvae of tiger prawn, *Penaeus monodon*. Aquaculture 66 : 247-253.

Direkbusarakom, S., A. Herunsalee, Y. Danayadol and U. Aekpanithanpong. 1995. Effect of *Phyllanthus* spp. against yellow-head baculovirus infection in black tiger shrimp, pp. 81-88. *In* M. Shariff, J. R. Arthur and R.P. Subasinghe (eds.), Diseases in Asian Aquaculture II.

Direkbusarakom, S., A. Herunsalee, M. Yoshimizu,m Y. Ezura and T. Kimura. 1996. Efficacy of guava (*Psidium guajava*) extract against some fish and shrimp pathogenic agents, p. 109. *In* . Creswell, L.R. (ed.) on Abstracts World Aquaculture 29 January -2 February 1996.

Flegel, T. W. and S. Sriurairatana. 1993. Black tiger prawn diseases in Thailand, pp.1-21. *In* D. Akiyama (ed.). Techanical Bulletin. American Soybean Association, Singapore.

Herunsalee, A. and S. Direkbusarakom. 1993. Investigation on the bioactive Thai medicinal plants to virus in tiger prawns, pp. 104-106. *In* Proc. of the Conference on Marine Biotechnology in the Asian Pacific Region 16-20 November 1993.

Hielman, B. 1982. The Chorination question. Env. Sci. Technol. 16 (1):15 A-17A.

Hosking, G.E. and F. C Dalziel. 1984. Survival of chinook fry (*Onchorhynchus tschwytscha*) following exposure to benzalkonium chloride in solf water. Prog. Fish-Cult. 46:98-101.

Litchfield, J. T. and F. Wilconxon. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther. 96 : 99-113.

Pickering, A. D. 1989. Stress responses and disease resistance in formed fish, pp. 35-49. *In* Aqua Nor 87, Conference 2 and 3, Trondheim, Norway.

Soderhall, K. and V. J. Smith. 1986a. Prophenoloxidase-activating cascade as a recognition system in arthropods, pp. 251-258. *In* A.P. Gupta (ed.). Hemolytic and Humoral Immunity in Arthropods. John Wiley & Son, Inc., New York.

Soderhall, K. and V. J. Smith. 1986b. The Prophenoloxidase activating systems : the biochemistry of its activation and role in arthropod cellular immunity, with reference to crustaceans, pp. 208-223. *In* M. Brehelin (ed.). Immunity in Invertibrates. Springer-Verlag. Berlin.

Wongteerasupaya, C., S. Sriuraitana, J. E. Vickers, A. Akrajamon, V. Boonsaeng, S. Panyim , A. Tassamakajon, B. Withyachumnarnkul and T.W. Flegel. 1995. Yellow head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. Dis. Aquat. Org. 22 : 45-50.

Zhongyi, L., M. Hongde, H. Mengru, L. Shaoyan. 1982. Studies on the chemical constituents of mango (*Manifera indica*) leaf. Zhongcaoyao. 13(3) : 3-6.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางผนวกที่ 1 จำนวนลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 18, 30 และ 42 ตายสะสมในการทดลองหาค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย

ขนาดกุ้งกุลาดำ	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนลูกกุ้งตายสะสม (ตัว) ซ้ำที่ 1	2	3
PL-18	กลุ่มควบคุม	0	0	0
	600	0	0	0
	966	5	4	7
	1,549	18	17	21
	2,483	34	33	36
	4,000	50	50	50
PL-30	กลุ่มควบคุม	0	0	0
(นน.เฉลี่ย 0.024 กรัม/ตัว)	1,200	0	1	0
(ยาวเฉลี่ย 1.7 ซม./ตัว)	1,698	10	11	9
	2,398	18	20	17
	3,388	27	30	28
	4,786	33	32	33
	6,800	40	40	40
PL42	กลุ่มควบคุม	0	0	0
(นน.เฉลี่ย 0.063 กรัม/ตัว)	1,350	1	0	0
(ยาวเฉลี่ย 2.3 ซม./ตัว)	1,888	6	5	7
	2,642	11	9	13
	3,698	19	15	17
	5,176	23	23	24
	7,200	25	25	25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา LC_{50} ตามวิธีของ Litchfield และ Wilcoxon (1949)

สัญญาลักษณ์ที่ใช้

K = จำนวนระดับความเข้มข้นที่ใช้

n = K-2 = degree of freedom ของ χ^2

LC_{50} = ความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตายไปครึ่งหนึ่ง

S = ค่าฟังก์ชั่นของความลาดเอียง

$f_{LC_{50}}$, f_S = ค่าแฟคเตอร์ของ LC_{50} และ S

N = จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ และอยู่ระหว่างค่า LC_{16} และ LC_{84}

R = อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นสูงสุดและความเข้มข้นต่ำสุด

A = ค่าคำนวณมาจากค่า S และ R

ในการทดลองถ้าค่า χ^2 จากการคำนวณมีค่าน้อยกว่า χ^2 จากตาราง แสดงว่าการเบี่ยงเบนของจุดไปจากเส้นตรง มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ดังนั้นสามารถใช้เส้นตรงนี้ในการประเมินค่า LC_{50} ได้

1. ในลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 18

concentration (ppm)	Dead/test	Observed dead % (O)	Expected dead % (E)	Observed minus Expected (O-E)	$\frac{(O-E)^2}{E(100-E)}$
600	0/50	0.00 (1.15)	3.5	2.35	0.0163
966	5.33/50	10.66	8.0	2.66	0.0096
1,549	18.66/50	37.32	22.0	10.66	0.0662
2,483	34.33/50	68.66	68.0	-6.68	0.0205
4,000	50/50	100.00 (99.46)	98.4	1.06	0.0071
				Total	0.1197

χ^2 ของเส้นที่ลาก = 0.1197 X $\frac{\text{จำนวนสัตว์ทดลอง}}{\text{จำนวนระดับความเข้มข้นที่ใช้}}$

= 0.1197 X 50

= 5.985

degrees of freedom, n= K-2 = 5-2 = 3

χ^2 จากตารางเมื่อ n = 3 มีค่าเท่ากับ 7.82

5.985 น้อยกว่า 7.82 ดังนั้น ข้อมูลที่ได้มีการกระจายของจุดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

LC_{16} = 1,300 ppm

LC_{50} = 2,200 ppm

LC_{84} = 2,900 ppm

ได้จากการอ่านค่าความเข้มข้นบนเส้นตรงคาดคะเนที่สร้างบน Logarithmic probability paper ของการตายสะสมเท่ากับ 16, 50 และ 84 เปอร์เซ็นต์

$$S = \frac{LC_{84}/LC_{50} + LC_{50}/LC_{16}}{2}$$

$$= \frac{2,900/2,200 + 2,200/1,600}{2}$$

$$= 1.505$$

$$^{f}LC_{50} = S^{2.77/\sqrt{N}}$$

$$= 1.505^{2.77/\sqrt{100}}$$

$$= 1.119$$

การคำนวณขีดจำกัดของ LC_{50} ที่ช่วงเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ขีดจำกัดบนของ $LC_{50} = LC_{50} \times {}^{f}LC_{50}$ = 2,200 X 1.119 = 2,461.80

ขีดจำกัดล่างของ $LC_{50} = LC_{50} / {}^{f}LC_{50}$ = 2,200/1.119 = 1,966.04

LC_{50} และช่วงเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ = 2,200 (1,966.04 - 2,461.80) มิลลิกรัมต่อลิตร

R = ความเข้มข้นสูงสุด/ความเข้มข้นต่ำสุด = 4,000/600 = 6.66

$$A = \text{antilog } \frac{1.1(\log S)^2}{\log R} = \text{antilog } \frac{1.1(\log 1.505)^2}{\log 6.6} = 1.102$$

$$f_S = A^{10(k-1)/K/\sqrt{N}}$$

$$= 1.102^{10(5-1)/5/\sqrt{100}}$$

$$= 1.08$$

ขีดจำกัดบนของ $S = S \times f_S$ = 1.505 X 1.08 = 1.625

ขีดจำกัดล่างของ $S_0 = S / f_S$ = 1.505/1.08 = 1.393

S และช่วงเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ = 1.505 (1.393 - 1.625)

2. ในลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 30

concentration (ppm)	Dead/test	Observed dead % (0)	Expected dead % (E)	Observed minus Expected (O-E)	$\frac{(O-E)^2}{E(100-E)}$
1,200	0.33/40	0.83 (3.95)	12.5	-8.55	0.0668
1,698	10/40	25.00	20.0	5.00	0.0156
2,398	8.33/40	45.83	40.0	5.83	0.0141
3,388	28.33/40	70.83	66.0	4.83	0.0104
4,786	33/40	82.50	87.0	-4.50	0.0179
6,800	40/40	100 (98.85)	96.5	2.35	0.0163
				Total	0.1411

χ^2 ของเส้นที่ลาก = 0.1411 X $\frac{\text{จำนวนสัตว์ทดลอง}}{\text{จำนวนระดับความเข้มข้นที่ใช้}}$

= 0.1411 X 40

= 5.644

degrees of freedom, n= K-2 = 6-2 = 4

χ^2 จากตารางเมื่อ n = 4 มีค่าเท่ากับ 9.49

5.644 น้อยกว่า 9.49 ดังนั้น ข้อมูลที่ได้มีการกระจายของจุดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

LC_{16} = 1,500 ppm

LC_{50} = 2,750 ppm

LC_{84} = 4,600 ppm

ได้จากการอ่านค่าความเข้มข้นบนเส้นตรงคาดคะเนที่สร้างบน Logarithmic probability paper ของการตายสะสมเท่ากับ 16, 50 และ 84 เปอร์เซ็นต์

$$S = \frac{LC_{84}/LC_{50} + LC_{50}/LC_{16}}{2}$$

$$= \frac{4,600/2,750 + 2,750/1,500}{2}$$

= 1.753

$^{f}LC_{50} = S^{2.77/\sqrt{N}}$

$= 1.753^{2.77/\sqrt{120}}$

$= 1.152$

การคำนวณขีดจำกัดของ LC_{50} ที่ช่วงเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ขีดจำกัดบนของ $LC_{50} = LC_{50} \times {}^{f}LC_{50} = 2,750 \times 1.152 = 3,168$

ขีดจำกัดล่างของ $LC_{50} = LC_{50} / {}^{f}LC_{50} = 2,750/1.152 = 2,387.15$

LC_{50} และช่วงเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ = 2,750 (2,387.15 -3,168) มิลลิกรัมต่อลิตร

R = ความเข้มข้นสูงสุด/ความเข้มข้นต่ำสุด = 6,800/1,200 = 5.67

$A = \text{antilog} \frac{1.1 (\log S)^2}{\log R} = \text{antilog} \frac{1.1 (\log 1.753)^2}{\log 5.67} = 1.221$

$f_S = A^{10(k-1)/K/\sqrt{N}}$

$= 1.221^{10(6-1)/6/\sqrt{120}}$

$= 1.164$

ขีดจำกัดบนของ $S = S \times f_S = 1.753 \times 1.164 = 2.040$

ขีดจำกัดล่างของ $S_0 = S / f_S = 1.505/ 1.164 = 1.506$

S และช่วงเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ = 1.753 (1.506 - 2.040)

3. ในลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 42

concentration (ppm)	Dead/test	Observed dead % (O)	Expected dead % (E)	Observed minus Expected (O-E)	$\frac{(O-E)^2}{E(100-E)}$
1,350	0.33/25	1.32 (1.6)	5.0	-3.40	0.0243
1,888	6/25	24.00	17.0	7.00	0.0347
2,642	11/25	44.00	42.0	2.00	0.0016
3,698	17/25	68.00	67.0	1.00	0.0005
5,176	23.33/25	93.32	90.0	3.32	0.0122
7,200	25/25	100 (99.15)	97.5	1.65	0.0112
				Total	0.0845

χ^2 ของเส้นที่ลาก = 0.0845 X $\frac{\text{จำนวนสัตว์ทดลอง}}{\text{จำนวนระดับความเข้มข้นที่ใช้}}$

= 0.0845 X 25

= 2.112

degrees of freedom, n = K-2 = 6-2 = 4

χ^2 จากตารางเมื่อ n = 4 มีค่าเท่ากับ 9.49

2.112 น้อยกว่า 9.49 ดังนั้น ข้อมูลที่ได้มีการกระจายของจุดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

LC_{16} = 1,850 ppm

LC_{50} = 2,900 ppm

LC_{84} = 4,750 ppm

ได้จากการอ่านค่าความเข้มข้นบนเส้นตรงคาดคะเนที่สร้างบน Logarithmic probability paper ของการตายสะสมเท่ากับ 16, 50 และ 84 เปอร์เซ็นต์

$$S = \frac{LC_{84}/LC_{50} + LC_{50}/LC_{16}}{2}$$

$$= \frac{4,750/2,900 + 2,900/1,850}{2}$$

= 1.602

$$^{f}LC_{50} = S^{2.77/\sqrt{N}}$$

$$= 1.602^{2.77/\sqrt{75}}$$

= 1.162

การคำนวณขีดจำกัดของ LC_{50} ที่ช่วงเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ขีดจำกัดบนของ $LC_{50} = LC_{50} \times {}^{f}LC_{50}$ = 2,900 X 1.162 = 3,369.80

ขีดจำกัดล่างของ $LC_{50} = LC_{50} / {}^{f}LC_{50}$ = 2,900/1.162 = 2,495.69

LC_{50} และช่วงเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ = 2,900 (2,495.69 - 3,369.80) มิลลิกรัมต่อลิตร

R = ความเข้มข้นสูงสุด/ความเข้มข้นต่ำสุด = 7,200/1,350 = 5.33

$$A = \text{antilog } \frac{1.1 (\log S)^2}{\log R} = \text{antilog } \frac{1.1 (\log 1.602)^2}{\log 5.33} = 1.158$$

$f_S = A^{10(k-1)/K/\sqrt{N}}$

$= 1.602^{(6-1)/6/\sqrt{75}}$

$= 1.151$

ขีดจำกัดบนของ S $= S \times f_S = 1.602 \times 1.151 = 1.844$

ขีดจำกัดล่างของ $S_0 = S / f_S = 1.602 / 1.151 = 1.392$

S และช่วงเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ = 1.602 (1.392 - 1.844)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางผนวกที่ 2 อัตรารอดเฉลี่ย (%) ของกุ้งกุลาดำหลังการฉีดด้วยสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง

ชุดการทดลอง	อัตรารอดเฉลี่ย (%) ของกุ้งกุลาดำหลังการฉีด (วัน)							
	ซ้ำที่	1	2	3	4	5	6	7
1. ชุดควบคุม (K-199)	1	100	100	100	100	100	100	100
	2	100	100	100	100	100	100	100
	3	100	100	100	100	100	100	100
	เฉลี่ย	100	100	100	100	100	100	100
		(8/8)	(8/8)	(8/8)	(8/8)	(8/8)	(8/8)	(8/8)
2. ชุดควบคุมไวรัสหัวเหลือง	1	100	37.5	12.5	0	0	0	0
	2	100	50.0	12.5	0	0	0	0
	3	100	37.5	0	0	0	0	0
	เฉลี่ย	100	41.67	8.33	0	0	0	0
		(8/8)	(3.3333/8)	(0.6667/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
3. มะม่วง 10,000 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	1	100	100	100	100	100	100	100
	2	100	100	100	100	100	100	100
	3	100	100	100	100	100	100	100
	เฉลี่ย	100	100	100	100	100	100	100
		(8/8)	(8/8)	(8/8)	(8/8)	(8/8)	(8/8)	(8/8)
4. มะม่วง 7,500 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	1	100	100	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
	2	100	100	100	100	87.5	87.5	87.5
	3	100	100	75	62.5	62.5	62.5	62.5
	เฉลี่ย	100	100	79.17	75	70.83	70.83	70.83
		(8/8)	(8/8)	(6.3333/8)	(6/8)	(5.6667/8)	(5.6667/8)	(5.6667/8)
5. มะม่วง 5000 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	1	100	87.5	75	75	75	75	75
	2	100	87.5	75	62.5	62.5	62.5	62.5
	3	100	100	87.5	75	62.5	62.5	62.5
	เฉลี่ย	100	91.67	79.17	70.83	66.67	66.67	66.67
		(8/8)	(7.3333/8)	(6.3333/8)	(5.6667/8)	(5.3333/8)	(5.3333/8)	(5.3333/8)

หมายเหตุ : ในวงเล็บ คือ จำนวนกุ้งที่รอดเฉลี่ยหลังการฉีดต่อจำนวนกุ้งทั้งหมด (ตัว)

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ) อัตรารอดเฉลี่ย (%) ของกุ้งกุลาดำหลังการฉีดด้วยสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง

ชุดการทดลอง	อัตรารอดเฉลี่ย (%) ของกุ้งกุลาดำหลังการฉีด (วัน)							
	ซ้ำที่	1	2	3	4	5	6	7
6. มะม่วง 2,500 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	1	100	100	75	75	75	75	75
	2	100	87.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
	3	100	87.5	75	62.5	62.5	62.5	62.5
	เฉลี่ย	100	91.67	70.83	66.67	66.67	66.67	66.67
		(8/8)	(7.3333/8)	(5.6667/8)	(5.3333/8)	(5.3333/8)	(5.3333/8)	(5.3333/8)
7. มะม่วง 1,000 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	1	100	100	75	62.5	62.5	62.5	62.5
	2	100	87.5	75	62.5	50	50	50
	3	100	87.5	75	62.5	50	50	50
	เฉลี่ย	100	91.67	75	62.5	54.17	54.17	54.17
		(8/8)	(7.3333/8)	(7/8)	(6/8)	(4.3333/8)	(4.3333/8)	(4.3333/8)
8. มะม่วง 100 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	1	100	62.5	62.5	50	50	50	50
	2	100	100	50	50	50	50	50
	3	100	100	62.5	62.5	50	50	50
	เฉลี่ย	100	87.5	58.33	54.17	50	50	50
		(8/8)	(7/8)	(4.6667/8)	(4.3333/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)
9. มะม่วง 10 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	1	100	100	50	50	50	50	50
	2	100	75	50	37.5	37.5	37.5	37.5
	3	100	87.5	62.5	62.5	50	50	50
	เฉลี่ย	100	87.5	54.17	50	45.83	45.83	45.83
		(8/8)	(7/8)	(4.3333/8)	(4/8)	(3.6667/8)	(3.6667/8)	(3.6667/8)
10. มะม่วง 1 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	1	100	87.5	62.5	50	37.5	37.5	37.5
	2	100	62.5	50	37.5	37.5	37.5	37.5
	3	100	62.5	62.5	50	50	50	50
	เฉลี่ย	100	79.17	58.33	45.83	41.67	41.67	41.67
		(8/8)	(6.3333/8)	(4.6667/8)	(3.6667/8)	(3.3333/8)	(3.3333/8)	(3.3333/8)

หมายเหตุ : ในวงเล็บ คือ จำนวนกุ้งที่รอดเฉลี่ยหลังการฉีดต่อจำนวนกุ้งทั้งหมด (ตัว)

ตารางผนวกที่ 3 คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยตลอดการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ

ชุดการทดลอง	วันที่	Temp. (^{o}c)	ความเค็ม (ppt)	pH	DO (ppm)	Total Alk ppm as $CaCO_3$	Total NH_3 (ppm)
1. ชุดควบคุม (K-199)	1	28.47	32.67	8.00	6.43	166.50	2.804
	2	29.07	29.33	8.00	6.37	160.83	2.302
	3	29.20	29.67	8.00	6.27	161.50	2.979
	4	29.23	30.00	8.00	6.43	163.67	2.618
	5	29.70	30.00	8.00	6.23	158.83	0.467
	6	28.67	30.00	8.00	6.30	156.83	0.329
	7	29.47	30.00	8.07	6.27	154.50	0.550
	เฉลี่ย	29.11	30.24	8.04	6.33	160.83	1.721
2. ชุดควบคุมไวรัสหัวเหลือง	1	28.10	32.00	8.00	6.20	166.00	2.155
	2	28.80	30.00	8.00	6.40	161.50	1.853
	3	29.20	30.00	8.00	6.33	164.50	1.954
	4	29.10	30.00	8.00	6.27	167.33	2.895
	5	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-
	เฉลี่ย	28.80	30.50	8.00	6.30	164.83	2.214
3. มะม่วง 10,000 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	1	28.17	32.33	8.00	6.40	164.00	1.872
	2	28.90	29.67	8.00	6.23	161.50	1.786
	3	29.07	30.00	8.00	6.30	164.33	3.057
	4	29.07	30.00	8.00	6.17	164.50	2.338
	5	29.40	30.00	8.00	6.20	161.33	0.436
	6	28.40	30.00	8.10	6.27	159.50	0.392
	7	29.30	30.00	8.10	6.27	160.33	0.459
	เฉลี่ย	28.90	30.28	8.03	6.26	162.21	1.477
4. มะม่วง 7,500 ppm+ ไวรัสหัวเหลือง	1	28.07	33.00	8.00	6.33	164.50	2.936
	2	28.80	30.00	8.00	6.37	161.50	2.176
	3	28.90	30.00	8.00	6.33	163.83	2.661
	4	28.87	30.00	8.00	6.37	165.17	2.607
	5	29.40	30.00	8.10	6.23	161.33	0.413
	6	28.27	30.00	8.10	6.27	158.00	0.37
	7	29.27	30.00	8.10	6.13	155.67	0.535
	เฉลี่ย	28.79	30.43	8.04	6.29	161.43	1.671

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ) คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยตลอดการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ

ชุดการทดลอง	วันที่	Temp. (^{0}c)	ความเค็ม (ppt)	pH	DO (ppm)	Total Alk ppm as $CaCO_3$	Total NH_3 (ppm)
5. มะม่วง 5,000 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	1	28.10	32.67	8.00	6.50	162.33	2.476
	2	28.70	29.00	8.00	6.40	162.00	2.153
	3	28.90	30.00	8.00	6.30	164.50	2.839
	4	28.90	30.00	8.00	6.30	167.50	2.607
	5	29.40	30.00	8.10	6.30	159.00	0.338
	6	28.30	30.00	8.00	6.33	155.00	0.341
	7	29.20	30.00	8.10	6.30	153.50	0.431
	เฉลี่ย	28.79	30.24	8.03	6.35	160.55	1.598
6. มะม่วง 2,500 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	1	28.10	32.00	8.00	6.06	162.17	2.169
	2	28.80	29.33	8.00	6.47	162.33	1.685
	3	28.80	30.00	8.00	6.33	164.00	1.830
	4	28.90	30.00	8.00	6.30	166.67	2.540
	5	29.37	30.00	8.13	6.30	157.83	0.275
	6	28.30	30.00	8.07	6.40	154.00	0.377
	7	29.17	30.00	8.17	6.23	154.17	0.335
	เฉลี่ย	28.78	30.19	8.05	6.38	160.17	1.316
7. มะม่วง 1,000 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	1	28.25	33.00	8.00	6.37	165.00	2.366
	2	28.90	30.00	8.00	6.40	163.00	1.890
	3	29.00	30.00	8.00	6.30	164.50	1.547
	4	29.10	30.00	8.00	6.30	167.50	3.045
	5	29.50	30.00	8.00	6.10	157.00	0.321
	6	28.30	30.00	8.00	6.40	151.50	0.331
	7	29.20	30.00	8.20	6.27	153.00	0.362
	เฉลี่ย	28.89	30.43	8.03	6.31	160.21	1.398
8. มะม่วง 100 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	1	28.15	32.00	8.00	6.53	165.67	2.368
	2	28.70	30.00	8.00	6.37	162.00	1.770
	3	28.80	30.00	8.00	6.30	164.00	2.128
	4	28.90	30.00	8.00	6.30	167.00	2.462
	5	29.30	30.00	8.10	6.23	156.00	0.358
	6	28.40	30.00	8.10	6.47	151.00	0.325
	7	29.17	31.00	8.10	6.30	154.00	0.347
	เฉลี่ย	28.77	30.43	8.04	6.36	159.95	1.394

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ) คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยตลอดการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ

ชุดการทดลอง	วันที่	Temp. (^{0}c)	ความเค็ม (ppt)	pH	DO (ppm)	Total Alk ppm as $CaCO_3$	Total NH_3 (ppm)
9. มะม่วง 10 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	1	28.50	32.33	8.00	6.20	167.50	1.978
	2	28.80	30.00	8.00	6.37	162.50	1.760
	3	29.00	30.00	8.00	6.40	164.50	2.101
	4	28.90	30.00	8.00	6.40	167.00	2.361
	5	29.57	30.00	8.13	6.30	155.00	0.275
	6	28.30	30.00	8.10	6.50	155.00	0.295
	7	29.10	31.00	8.10	6.27	154.00	0.423
	เฉลี่ย	28.88	30.48	8.05	6.35	160.79	1.313
10. มะม่วง 1 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	1	28.37	32.00	8.00	6.00	166.33	2.464
	2	28.96	30.00	8.00	6.30	162.50	2.436
	3	29.07	30.00	8.00	6.30	164.33	2.859
	4	29.17	30.00	8.00	6.27	167.33	3.239
	5	29.57	30.00	8.17	6.33	155.00	0.505
	6	28.30	30.00	8.10	6.40	154.17	0.420
	7	29.33	30.00	8.10	6.47	156.00	0.509
	เฉลี่ย	28.97	30.29	8.05	6.29	160.81	1.776

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางผนวกที่ 4 อัตรารอดเฉลี่ย (%) ของกุ้งกุลาดำหลังการฉีดด้วยสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ชุดการทดลอง	อัตรารอดเฉลี่ย (%) ของกุ้งกุลาดำหลังการฉีด (วัน)							
	ซ้ำที่	1	2	3	4	5	6	7
1. ชุดควบคุม (K-199)	1	100	100	100	100	100	100	100
	2	100	100	100	100	100	100	100
	3	100	100	100	100	100	100	100
	เฉลี่ย	100	100	100	100	100	100	100
		(8/8)	(8/8)	(8/8)	(8/8)	(8/8)	(8/8)	(8/8)
2. ชุดควบคุมไวรัสตัวแดงดวงขาว	1	100	87.5	50	25	0	0	0
	2	100	87.5	50	25	0	0	0
	3	100	62.5	37.5	12.5	0	0	0
	เฉลี่ย	100	83.33	45.83	20.83	0	0	0
		(8/8)	(6.6667/8)	(3.6667/8)	(1.667/8)	(0)	(0)	(0)
3. มะม่วง 10,000 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	1	100	100	100	100	100	100	100
	2	100	100	100	100	100	100	100
	3	100	100	100	100	100	100	100
	เฉลี่ย	100	100	100	100	100	100	100
		(8/8)	(8/8)	(8/8)	(8/8)	(8/8)	(8/8)	(8/8)
4. มะม่วง 7,500 ppm + ไวรัสหัวเหลือง	1	100	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5
	2	100	100	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5
	3	100	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5
	เฉลี่ย	100	91.67	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5
		(8/8)	(7.3333/8)	(7/8)	(7/8)	(7/8)	(7/8)	(7/8)
5. มะม่วง 5,000 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	1	100	87.5	87.5	75	75	75	75
	2	100	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5
	3	100	100	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5
	เฉลี่ย	100	91.67	87.5	83.33	83.33	83.33	83.33
		(8/8)	(7.3333/8)	(7/8)	(6.6667/8)	(6.6667/8)	(6.6667/8)	(6.6667/8)

หมายเหตุ : ในวงเล็บ คือ จำนวนกุ้งที่รอดเฉลี่ยหลังการฉีดต่อจำนวนกุ้งทั้งหมด (ตัว)

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ) อัตรารอดเฉลี่ย (%) ของกุ้งกุลาดำหลังการฉีดด้วยสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ชุดการทดลอง	อัตรารอดเฉลี่ย (%) ของกุ้งกุลาดำหลังการฉีด (วัน)							
	ซ้ำที่	1	2	3	4	5	6	7
6. มะม่วง 2,500 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	1	100	87.5	75	62.5	62.5	62.5	62.5
	2	100	75	75	50	50	50	50
	3	100	75	75	62.5	62.5	62.5	62.5
	เฉลี่ย	100	79.17	75	58.33	58.33	58.33	58.33
		(8/8)	(6.3333/8)	(6/8)	(4.6667/8)	(4.6667/8)	(4.6667/8)	(4.6667/8)
7. มะม่วง 1,000 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	1	100	75	75	75	62.5	62.5	62.5
	2	100	75	62.5	62.5	50	50	50
	3	100	75	62.5	62.5	50	50	50
	เฉลี่ย	100	75	66.67	66.67	54.17	54.17	54.17
		(8/8)	(6/8)	(5.3333/8)	(5.3333/8)	(4.3333/8)	(4.3333/8)	(4.3333/8)
8. มะม่วง 100 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	1	100	62.5	50	50	50	50	50
	2	100	87.5	62.5	50	50	50	50
	3	100	87.5	62.5	62.5	50	50	50
	เฉลี่ย	100	79.17	66.67	54.17	50	50	50
		(8/8)	(6.3333/8)	(5.3333/8)	(4.3333/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)
9. มะม่วง 10 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	1	100	87.5	75	75	75	50	50
	2	100	75	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
	3	100	62.5	50	37.5	37.5	37.5	37.5
	เฉลี่ย	100	75	62.5	50	50	45.83	45.83
		(8/8)	(6/8)	(5/8)	(4/8)	(4/8)	(3.667/8)	(3.667/8)
10. มะม่วง 1 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	1	100	75	62.5	62.5	50	50	50
	2	100	75	75	50	50	50	50
	3	100	75	50	37.5	37.5	37.5	37.5
	เฉลี่ย	100	75	62.5	50	45.83	45.83	45.83
		(8/8)	(6/8)	(5/8)	(4/8)	(3.6667/8)	(3.6667/8)	(3.6667/8)

หมายเหตุ : ในวงเล็บ คือ จำนวนกุ้งที่รอดเฉลี่ยหลังการฉีดต่อจำนวนกุ้งทั้งหมด (ตัว)

ตารางผนวกที่ 5 คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยตลอดการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

ชุดการทดลอง	วันที่	Temp. (^{0}c)	ความเค็ม (ppt)	pH	DO (ppm)	Total Alk ppm as $CaCO_3$	Total NH_3 (ppm)
1. ชุดควบคุม (K-199)	1	29.30	30.00	8.10	6.37	153.83	0.682
	2	29.50	31.00	8.17	6.40	147.67	0.699
	3	29.43	30.67	8.17	6.57	152.17	1.417
	4	29.03	32.00	8.20	6.90	144.67	1.593
	5	29.03	31.00	8.10	6.77	143.67	1.153
	6	28.87	31.33	8.20	6.60	141.67	0.595
	7	29.10	31.67	8.00	6.80	135.17	0.889
	เฉลี่ย	29.18	31.09	8.13	6.63	145.48	1.004
2. ชุดควบคุมไวรัสตัวแดงดวงขาว	1	29.20	31.00	8.10	6.30	154.00	0.749
	2	29.27	31.00	8.20	6.40	142.00	1.324
	3	29.50	30.00	8.20	6.50	137.50	1.445
	4	28.50	32.00	8.20	6.60	139.50	1.328
	5	28.60	31.00	8.10	6.50	136.50	1.136
	6	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-
	เฉลี่ย	29.01	31.00	8.16	6.46	141.90	1.196
3. มะม่วง 10,000 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	1	29.10	31.00	8.10	6.37	162.83	0.976
	2	29.27	31.00	8.17	6.10	158.67	1.393
	3	29.53	31.00	8.10	6.33	159.17	1.517
	4	28.60	32.00	8.17	6.40	147.33	1.386
	5	28.73	31.00	8.10	6.43	141.33	0.969
	6	28.53	31.00	8.2	6.50	137.50	0.712
	7	28.60	32.00	8.00	6.57	131.83	0.492
	เฉลี่ย	28.91	31.29	8.12	6.39	148.38	1.064
4. มะม่วง 7,500 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	1	29.10	30.00	8.10	6.33	159.33	0.736
	2	29.20	30.00	8.20	6.27	141.00	1.109
	3	29.47	30.00	8.23	6.37	142.33	1.439
	4	28.30	31.33	8.20	6.57	141.67	1.096
	5	28.60	32.00	8.07	6.56	138.67	1.136
	6	28.37	31.00	8.20	6.50	138.67	0.846
	7	28.40	32.00	8.00	6.73	133.17	0.796
	เฉลี่ย	28.78	30.90	8.14	6.48	142.12	1.009

ตารางผนวกที่ 5 (ต่อ) คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยตลอดการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

ชุดการทดลอง	วันที่	Temp. (^{o}c)	ความเค็ม (ppt)	pH	DO (ppm)	Total Alk ppm as $CaCO_3$	Total NH_3 (ppm)
5. มะม่วง 5,000 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	1	29.00	31.00	8.13	6.43	158.00	0.835
	2	29.17	31.00	8.20	6.33	137.83	0.996
	3	29.47	31.00	8.20	6.37	142.33	1.089
	4	28.40	32.00	8.20	6.40	139.17	1.116
	5	28.57	31.33	8.10	6.67	134.83	1.093
	6	28.33	31.00	8.20	6.53	138.67	0.772
	7	28.37	32.00	8.00	6.77	135.83	0.646
	เฉลี่ย	28.76	31.33	8.15	6.50	140.95	0.935
6. มะม่วง 2,500 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	1	29.17	31.00	8.17	6.43	158.17	0.739
	2	29.27	30.00	8.20	6.30	139.50	0.953
	3	29.50	30.00	8.17	6.40	138.83	0.883
	4	28.43	32.00	8.17	6.47	141.67	1.216
	5	*28.67*	*31.00*	*8.10*	*6.67*	*131.00*	*1.093*
	6	28.53	31.00	8.20	6.67	136.83	0.469
	7	28.57	32.00	8.00	6.73	132.33	0.626
	เฉลี่ย	28.88	31.00	8.14	6.52	139.76	0.854
7. มะม่วง 1,000 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	1	29.20	31.00	8.17	6.27	166.83	0.899
	2	29.30	30.00	8.17	6.33	142.00	1.069
	3	29.53	30.00	8.17	6.47	136.83	1.199
	4	28.43	32.00	8.17	6.47	141.67	1.093
	5	28.70	31.00	8.07	6.67	134.17	0.909
	6	28.63	31.00	8.20	6.80	129.83	0.475
	7	28.60	32.00	8.00	6.83	127.00	0.606
	เฉลี่ย	28.91	31.00	8.14	6.55	139.76	0.893
8. มะม่วง 100 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	1	28.93	31.00	8.13	6.37	163.17	0.916
	2	29.10	31.00	8.20	6.27	193.33	0.939
	3	29.33	30.00	8.20	6.40	139.00	1.066
	4	28.23	32.00	8.20	6.47	140.00	0.856
	5	28.50	31.00	8.10	6.57	134.33	0.863
	6	28.33	31.00	8.20	6.57	130.50	0.606
	7	28.27	32.00	8.00	6.80	126.00	0.435
	เฉลี่ย	28.67	31.14	8.15	6.49	138.90	0.816

ตารางผนวกที่ 5 (ต่อ) คุณสมบัติของน้ำเฉลี่ยตลอดการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

ชุดการทดลอง	วันที่	Temp. (^{0}c)	ความเค็ม (ppt)	pH	DO (ppm)	Total Alk ppm as $CaCO_3$	Total NH_3 (ppm)
9. มะม่วง 10 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	1	29.07	30.67	8.10	6.43	164.33	1.246
	2	29.20	30.00	8.20	6.50	140.50	1.423
	3	29.47	31.33	8.20	6.50	140.50	1.359
	4	28.43	32.00	8.20	6.70	139.33	1.176
	5	28.63	32.00	8.13	6.63	138.67	1.073
	6	28.47	31.00	8.27	6.60	136.67	0.709
	7	28.50	32.00	8.00	6.80	130.83	0.689
	เฉลี่ย	28.82	31.29	8.16	6.59	141.55	1.096
10. มะม่วง 1 ppm + ไวรัสตัวแดงดวงขาว	1	29.23	30.00	8.07	6.17	161.00	1.487
	2	29.37	30.33	8.20	6.20	138.83	1.186
	3	29.60	30.00	8.20	6.30	141.67	1.216
	4	28.57	32.00	8.20	6.40	136.67	1.113
	5	28.83	32.00	8.10	6.50	132.67	1.043
	6	28.60	31.33	8.20	6.57	138.17	0.596
	7	28.67	32.00	8.00	6.70	127.00	0.475
	เฉลี่ย	28.98	31.09	8.14	6.41	139.43	1.017

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังการฉีดสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองความเข้มข้น 1:1,000,000

SOV	df	SS	MS	F
Treatments	9.0000	23026.0391	2558.4487	54.5802**
Error	20.0000	937.5000	46.8750	
Total	29.0000	23963.5391		

CV. = 11.49 %

หมายเหตุ ** = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

ตารางผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังการฉีดสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น 1:100,000

SOV	df	SS	MS	F
Treatments	9.0000	25729.1660	2858.7961	109.7776**
Error	20.0000	520.8340	26.0417	
Total	29.0000	26250.0000		

CV. = 8.16 %

หมายเหตุ ** = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

ตารางผนวกที่ 8 ค่า phenoloxidase activity ของกุ้งกุลาดำหลังการได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกัน นาน 7 วัน

ชุดการทดลอง	phenoloxidase activity (units)				
	ซ้ำที่	1	2	3	เฉลี่ย
1. ชุดควบคุม	1	5.3333	4.3333	4.6667	
(อาหาร + มะม่วง 0 ppm)	2	5.6667	7.6667	8.0000	
	เฉลี่ย	5.5000	6.0000	6.3334	5.94 ± 0.42
2. อาหาร + มะม่วง 1,000 ppm	1	7.3333	6.3333	9.0000	
	2	6.6667	8.3333	9.6667	
	เฉลี่ย	7.0000	7.3333	9.3334	7.89 ± 1.26
3. อาหาร + มะม่วง 2,500 ppm	1	16.0000	10.3333	12.3333	
	2	17.6667	19.0000	19.3333	
	เฉลี่ย	16.8334	14.6667	15.8333	15.78 ± 1.08
4. อาหาร + มะม่วง 5,000 ppm	1	25.6667	22.0000	28.3333	
	2	20.3333	27.6667	31.0000	
	เฉลี่ย	23.0000	24.8334	29.6667	25.83 ± 3.44

ตารางผนวกที่ 9 อัตรารอด (%) ของกุ้งกุลาดำหลังการได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกัน นาน 7 วัน

ชุดการทดลอง	อัตรารอด (%)			
	ซ้ำที่ 1	2	3	เฉลี่ย
1. ชุดควบคุม (อาหาร + มะม่วง 0 ppm)	66.6667	66.6667	58.3333	63.89 ± 4.81
2. อาหาร + มะม่วง 1,000 ppm	66.6667	66.6667	66.6667	66.67 ± 0.00
3. อาหาร + มะม่วง 2,500 ppm	66.6667	75.0000	75.0000	72.22 ± 4.81
4. อาหาร + มะม่วง 5,000 ppm	58.3333	66.6667	66.6667	63.89 ± 4.81

ตารางผนวกที่ 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังการได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกัน นาน 7 วัน

SOV	df	SS	MS	F
Treatments	3.0000	138.8906	46.2969	2.6667ns
Error	9.0000	138.8906	17.3613	
Total	11.0000	277.7813		

CV. = 6.25 %

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

ตารางผนวกที่ 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า phenoloxidase activity ของกุ้งกุลาดำหลังการได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกัน นาน 7 วัน

SOV	df	SS	MS	F
Treatments	3.0000	736.0475	245.3492	66.2845**
Error	8.0000	29.6116	3.7015	
Total	11.0000	765.6592		

CV. = 13.88 %

หมายเหตุ ** = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01)

สารเคมีและการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อ

1. Davidson 's fixative (Bell และ Lightner, 1988)

95 % Ethyl alcohol	330	มิลลิลิตร
100 % Formalin	220	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	115	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	335	มิลลิลิตร

ผสมสารเคมีทั้งหมดเข้าด้วยกัน เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

2. การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อ

2.1 ดองตัวอย่างกุ้งเฉพาะส่วนหัวในน้ำยา Davidson 's fixative โดยให้มีปริมาตรน้ำยามากกว่าปริมาตรตัวอย่าง 10 เท่า ทิ้งไว้ 24-72 ชั่วโมง

2.2 ย้ายตัวอย่างกุ้งลงในเอธิลแอลกอฮอล์ 50 % เก็บตัวอย่างไว้ได้นานโดยไม่จำกัดเวลา

2.3 ตัดเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษาให้มีความหนาไม่เกิน 0.5 เซนติเมตร

2.4 นำเนื้อเยื่อที่ได้มาผ่านขั้นตอนต่าง ๆ โดยใช้เครื่อง Automatic tissue processor ตามวิธีมาตราฐานของ Humason (1979) ดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	50 % alcohol	0.5-1
2	70 % alcohol	0.5-1
3	95 % alcohol	0.5-1
4	95 % alcohol	0.5-1
5	95 % alcohol	0.5-1
6	100 % alcohol	0.5-1
7	100 % alcohol	0.5-1
8	100 % alcohol	0.5-1
9	chloroform 1	1
10	chloroform 2	1.5
11	paraplast 1	1.5
12	paraplast 2	2

2.5 นำเนื้อเยื่อมาวางในพิมพ์ (mold) เพื่อทำให้เป็นแท่งด้วยพาราฟิน (paraffin embedding)

2.6 นำแท่งชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ได้ มาแต่งหน้าให้เรียบ และตัดด้วยเครื่อง microtome ให้มีความหนาประมาณ 5-6 ไมครอน

2.7 นำไปลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส ใช้แผ่นสไลด์ช้อนตัวอย่างที่สมบรูณ์ขึ้นมา นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ ทิ้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมง จึงนำไปผ่านขบวนการย้อมสี Hematoxylin และ eosin

สารเคมีและการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin

1. <u>การเตรียมสี Mayer ' s Hematoxylin</u>

hematoxylin crystals	4.0	gm.
sodium iodate	0.8	gm.
potassium aluminum sulfate (alum)	100.0	gm.
citric acid	4.0	gm.
chloral hydrate	200.0	gm.
น้ำกลั่น	2000.0	gm.

ละลาย alum ในน้ำกลั่น แล้วจึงใส่ hematoxylin ลงไปคนให้ละลาย เติม sodium iodate ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม citric acid และ chloral hydrate คนให้เข้ากัน เขย่าจนกระทั่งสารละลายทั้งหมดเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ จึงนำมาใช้

2. <u>การเตรียมสี Eosin</u>

eosin Y.CI 45380	1.0	gm.
70% ethyl alcohol	100.0	ml.
glacial acetic acid	5.0	ml.

ผสมสารเคมีทั้ง 3 อย่างเข้าด้วยกัน แล้วเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

3. <u>การย้อมสี Hematoxylin และ Eosin</u>

3.1 นำตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดอยู่บนสไลด์ ไปละลายพาราฟินออกด้วยการแช่ใน xylene และทำการดึงน้ำออก (dehydration) โดยผ่านแอลกอฮอล์ระดับต่าง ๆตั้งแต่ 100, 95 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไปจนถึงแช่ในน้ำกลั่น นานอย่างละ 2-3 นาที

3.2 ซับน้ำออก แล้วนำไปแช่ใน hematoxylin นาน 5-10 นาที ซึ่งเวลาที่ใช้จะขึ้นกับคุณภาพของสีว่าจะใช้นานเพียงใด

3.3 ล้างในน้ำประปาที่ไหล จนชิ้นเนื้อเป็นสีน้ำเงิน (2-3 นาที)

3.4 ซับน้ำออก ใส่ลงใน eosin นาน 5-10 นาที แล้วแต่คุณภาพของสี

3.5 ดึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำให้ใสสะอาด (cleaning) ด้วย xylene นานอย่างละ 2-3 นาที

3.6 ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover glass) ซึ่งทำให้ปิดแน่นด้วย permount

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาว

1. การเตรียม K-199

1.1 ละลาย M-199 (Medium 199 modified with hanks' salts with L-glutamine, without sodium bicarbonate) ซึ่งมีลักษณะเป็นผงในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน

1.2 เติม $NaHCO_3$ จำนวน 0.35 กรัม ลงในสารละลาย M-199 ในข้อ 1.1

1.3 เตรียมสารละลายเกลือ ซึ่งประกอบด้วย

- $NaCl_2$ 11.00 กรัม
- KCl 0.4 กรัม
- $MgSO_4 . 7HO_2$ 3.00 กรัม
- $MgCl_2 . 6HO_2$ 3.00 กรัม
- $CaCl_2 . 2HO_2$ 0.9 กรัม
- $NaHPO_4 . 2HO_2$ 0.05 กรัม
- L-glutamine 0.15 กรัม

มาละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

1.4 ผสมสารละลายในข้อ 1.2 ปริมาณ 500 มิลลิลิตร และข้อ 1.3 ปริมาณ 500 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน

1.5 ปรับ pH ของสารละลายในข้อ 1.4 ให้ได้ 7.3 ด้วย 7.5 % $NaHCO_3$

1.6 นำมากรองผ่าน filter ขนาด 0.2 ไมครอน ด้วยเครื่อง suction pump

1.7 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม K-199 เพื่อใช้กับไวรัส

2.1 เติม fetal calf serum 2.5 % ลงในสารละลาย K-199 ซึ่งได้ปรับ pH เท่ากับ 7.3 และผ่านการกรองด้วย filter ขนาด 0.2 ไมครอนมาแล้ว

2.2 นำสารละลายในข้อ 2.1 มาเก็บในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาค่า Phenoloxidase activity

1. การเตรียม Tris - buffered saline (TBS)

- 50 mM Tris = 0.6057 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
- 100 mM $NaCl_2$ = 0.5844 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ปรับ pH ของสารละลายให้ได้ 7.3 ด้วย HCl 1 N

2. การเตรียมสารละลาย L-DOPA

- L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenyl alanine) 0.0160 กรัมในสารละลาย TBS 10 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารละลาย Blank

- สารละลาย TBS 780 ไมโครลิตร + สารละลาย L-DOPA 180 ไมโครลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย