จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

# ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทย ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio spp.* ที่ก่อให้เกิดโรคในหอยหวาน *(Babylonia areolata Link* 1807*)*

โดย

ทิพวรรณ ตัณฑวนิช

มาลินี จงเจริญใจ

วีณา เคยพุดซา

กรกฎาคม 2556

# กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๔ ขอขอบคุณ รศ.ดร.เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ เจ้าหน้าที่ของสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ และศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ หน่วยอายุรศาสตร์สัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและช่วยเหลือในระหว่างการดำเนินงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

จฬ
เลขหมู่ สพ 15
เลขทะเบียน 016734
วัน, เดือน, ปี 21 ก.ค. 58

**ชื่อโครงการวิจัย:** ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่ก่อให้เกิดโรคในหอยหวาน (*Babylonia areolata* Link ๑๘๐๗)
**ชื่อผู้วิจัย:** นางสาวทิพวรรณ ตัณฑวณิช นางสาวมาลินี จงเจริญใจ และ ผศ.ดร.วีณา เคยพุดซา
**เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ:** ธันวาคม ๒๕๕๕

## บทคัดย่อ

ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร ข่า และใบฝรั่ง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น ๔ ขั้นตอน ขั้นตอนที่ ๑ หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* ที่ทำให้เกิดโรคปากบวมแดงในหอยหวาน (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Bactericidal Concentration: MBC) พบว่าสารสกัดหยาบใบฝรั่งที่สกัดด้วยน้ำกลั่น โดยวิธีการต้มมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและกำจัดแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ได้สูงสุด (MIC = ๒.๗๓ mg/L และ MBC = ๒๑.๘๘ mg/L) รองลงมาคือ สารสกัดหยาบข่าที่สกัดด้วยเอธานอล ๑๐๐% และสารสกัดหยาบข่าที่สกัดด้วยน้ำกลั่น (MIC = ๒.๗๓ - ๑๐.๙๔ mg/L และ MBC = ๒๑.๘๘ - ๔๓.๗๕ mg/L) ส่วนสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรมีประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรียได้ต่ำที่สุด (MIC = ๕.๔๗ mg/L และ MBC = ๘๗.๕๐ mg/L) ขั้นตอนที่ ๒ หาค่าความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่ทำให้หอยหวานตายลง ๕๐ เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา ๒๔ ชั่วโมง (Median Lethal Dose at ๒๔ hr: $LD_{50}$ at ๒๔ hr) ด้วยวิธีการฉีดเชื้อเข้ากล้ามเนื้อเท้าของหอยหวาน พบว่ามีค่า $LD_{50}$ at ๒๔ hr เท่ากับ ๑.๔๒๖ x $๑๐^{๕}$ cfu/ml ขั้นตอนที่ ๓ ทดสอบหาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดที่ทำให้หอยหวานตายครึ่งหนึ่ง (๕๐ เปอร์เซ็นต์) ภายในเวลา ๙๖ ชั่วโมง โดยวิธีการแช่ พบว่าหอยหวานที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดจะมีอาการกระวนกระวายและดิ้นไปดิ้นมาทันทีหลังจากแช่ในสารสกัด โดยพบว่าสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรมีความเป็นพิษระดับสูงที่สุด ($LC_{50}$ ๙๖ hr = ๓๘๕.๒๕ มิลลิกรัม/ลิตร) รองลงมาคือ สารสกัดหยาบข่า ($LC_{50}$ ๙๖ hr = ๘๐๙.๓๙ มิลลิกรัม/ลิตร) และสารสกัดหยาบใบฝรั่งมีความเป็นพิษระดับต่ำที่สุด ($LC_{50}$ ๙๖ hr = ๓,๐๑๗.๑๑ มิลลิกรัม/ลิตร) และขั้นตอนที่ ๔ ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดในการรักษาโรควิบริโอซีสในหอยหวานด้วยวิธีการแช่ต่อเนื่องเป็นเวลา ๑๔ วัน พบว่าสารสกัดหยาบข่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในหอยหวานได้ดีที่สุด โดยระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจร ข่าและใบฝรั่งที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันรักษาโรคสูงสุด คือ ระดับความเข้มข้น ๑๘.๗๕, ๑๘.๗๕ และ ๓๗.๕๐ มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ แต่อัตราการรอดชีวิตของหอยหวานที่แช่ในสารสกัดหยาบสมุนไพรทั้ง ๓ ชนิด ไม่มีความแตกต่างกับชุดควบคุมบวกที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียแต่ไม่ได้แช่สารสกัดสมุนไพร จากการศึกษานี้พบว่าสารสกัดหยาบใบฝรั่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ได้สูงสุด จึงมีความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งมาประยุกต์ใช้ในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป

**คำสำคัญ :** สารสกัดหยาบ, สมุนไพรไทย, หอยหวาน, โรควิบริโอซีส, เชื้อวิบริโอ

**Project Title:** The efficiency of the crude extract from Thai herbs against Spotted Babylon (*Babylonia areolata* Link 1807) pathogenic bacteria (*Vibrio* spp.)

**Name of the Investigators:** Tippawan Tantawanich, Malinee Jongjareanjai and Assist. Prof. Dr. Weena Koeypudsa

**Year:** December, 2012

## Abstract

Study on the efficiency of the crude extract from three Thai herbs (Andrographis; *Andrographis paniculata*, Galangal; *Alpinia galanga*, Guava leaves; *Psidium guajava*) against Spotted Babylon (*Babylonia areolata* Link 1807) pathogenic bacteria (*Vibrio alginolyticus*). The experiment was separated into four parts. The first part was to evaluate the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC). It found that guava extract by distilled water boiled had highest inhibit to *V. Alginolyticus* (MIC = 2.73 and MBC = 21.88 mg/L), follow by galangal extract by ๑๐๐% ethanol and distilled water (MIC = 2.73 – 10.94 and MBC = 21.88 – 43.75 mg/L, respectively) On the other hand, andrographis extract by distilled water boiled had lowest inhibit to *V. Alginolyticus* (MIC = 5.47 and MBC = 87.50 mg/L). The second part was to determine the median lethal dose at 24 hr (50% kill dose at 24 hours) of Spotted Babylon. The $LD_{50}$ at 24 hr results of *V. alginolyticus* was 1.426 x $10^8$ cfu/ml. The third part, the toxicity was determined by $LC_{50}$ 96 hr (50% kill concentration at 96 hours) by bath method. It was results that all Spotted Babylon in three crude extracts had been nervous and wriggle after bathed. The crude extract of andrographis showed the highest toxicity ($LC_{50}$ 96 hr = 385.25 mg/L), follow by galangal extract ($LC_{50}$ 96 hr = 809.39 mg/L) and guava leaves extract showed the lowest toxicity ($LC_{50}$ 96 hr = 3,017.11 mg/L). The fourth part was to evaluate the antimicrobial activity of crude extract by distilled water boiled from three Thai herbs. All Spotted Babylon bathed in six different concentrations of each crude extract and reared along 14 day. The results showed the effective concentrations of andrographis, galangal and guava leaves extracts were 18.75, 18.75 and 37.50 mg/L, respectively. However, Spotted Babylon bathed in three crude extracts were no significant difference ($P>0.05$) in survival rate in positive control group. These results indicate that the guava leaves extract had highly antimicrobial activity against *V. alginolyticus*, which is applicable as antibacterial agent used in aquaculture farm.

**Keywords:** crude extract, Thai herb, Spotted Babylon, vibriosis, *V. alginolyticus*

# สารบัญ


| เรื่อง | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | ii |
| บทคัดย่อภาษาไทย | iii |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | iv |
| สารบัญ | v |
| รายการตารางประกอบ | vi |
| รายการภาพประกอบ | vii |
| บทนำ | ๑ |
| - วัตถุประสงค์ของการวิจัย | ๒ |
| - ขอบเขตการวิจัย | ๒ |
| - ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย | ๒ |
| - การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง | ๓ |
| - ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | ๙ |
| วิธีการวิจัย | ๑๐ |
| ผลการวิจัย | ๑๗ |
| การอภิปรายผล | ๓๕ |
| ข้อสรุป | ๓๙ |
| ข้อเสนอแนะ | ๓๙ |
| บรรณานุกรม | ๔๐ |
| ภาคผนวก | ๔๓ |
| ก. | ๔๔ |
| ข. | ๔๘ |
| ค. | ๔๙ |
| ง. | ๕๑ |
| จ. | ๕๓ |
| ฉ. | ๕๙ |
| ช. | ๖๕ |

# รายการตารางประกอบ


| ตารางที่ | หน้า |
|---|---|
| ๑. คุณสมบัติและสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของพืชสมุนไพรทั้ง ๓ ชนิด | ๙ |
| ๒. ผลการแยกชนิดเชื้อ *V. alginolyticus* จากหอยหวานป่วย โดยทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API ๒๐ E | ๑๘ |
| ๓. ปริมาณความชื้นที่วิเคราะห์ในสมุนไพรไทยผงทั้ง ๓ ชนิด | ๒๑ |
| ๔. ค่า MIC/MBC ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายและวิธีที่แตกต่างกัน | ๒๖ |
| ๕. ค่า $LC_{50}$ ๙๖ hr จากความเข้มข้นของแต่ละสารสกัดสมุนไพรที่ทำให้หอยหวานตายครึ่งหนึ่ง (๕๐เปอร์เซ็นต์) ภายใน ๙๖ ชั่วโมง | ๒๘ |
| ๖. อัตราการรอดชีวิตของหอยหวานที่ทดลองเลี้ยงด้วยวิธีการแช่ในสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ในชุดการทดลองที่แตกต่างกัน ตลอดระยะเวลาการทดลอง ๑๔ วัน | ๓๓ |
| ๗. ผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำในพารามิเตอร์ต่างๆ ในระยะเวลาการทดลองเลี้ยง ๑๔ วัน | ๓๔ |

# รายการภาพประกอบ

ภาพที่ หน้า


๑. หอยหวานที่มีอาการปาก (proboscis) บวมแดง ๑๑
๒. ขั้นตอนการย้อมสีแกรม (Gram's stain) เพื่อดูการติดสีของผนังเซลล์ และลักษณะรูปร่างของเชื้อแบคทีเรีย ๑๑
๓. ลักษณะของสมุนไพรสดที่หั่นและนำไปอบแห้ง ๑๒
๔. ผงสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ที่ผ่านการอบแห้งและบดละเอียด ๑๒
๕. เครื่อง Rotary evaporator ใช้สำหรับระเหยตัวทำละลายออก ๑๓
๖. หอยหวานมีอาการป่วยปากบวมแดงที่นำมาแยกเชื้อแบคทีเรีย ๑๗
๗ ชุดทดสอบ API ๒๐E ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆของเชื้อวิบริโอ ๑๗
๘. ผลการย้อมติดสีแกรมของ *V. alginolyticus* ซึ่งติดสีแดง มีรูปร่างท่อนสั้นโค้ง ๑๘
๙ *V. alginolyticus* ผลิตเอนไซม์ออกซิเดสได้ เมื่อทำการทดสอบจะติดสีม่วงเข้ม ๑๘
๑๐ *V. alginolyticus* โคโลนีมีสีเหลืองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar มีลักษณะกลม ขอบเรียบ ๑๘
๑๑. ทำการเจือจางเชื้อ *V. alginolyticus* แบบ ๑๐ เท่า ในหลอดทดลอง ๒๐
๑๒. เพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA+๑.๕% NaCl ด้วยวิธี Spread plate technique ๒๐
๑๓. แสดงโครมาโตแกรมของสาร Quercetin ในใบฝรั่งผง จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ๒๒
๑๔. หาค่า MIC ในถาดหลุม ๙๖ หลุม (๙๖-well plate) โดยดูจากความขุ่นใสที่เกิดขึ้นในหลุม ๒๓
๑๕. หาค่า MBC ด้วยวิธี Spread plate technique เพื่อนับจำนวนโคโลนี ๒๕
๑๖. ทดลองเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีส (vibriosis) ในหอยหวาน ซึ่งจะเกิดอาการปากบวมแดง ๒๗
๑๗. กราฟแสดงแนวโน้มการตายของหอยหวานทดลองในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรที่ทำให้หอยหวานตาย ๕๐เปอร์เซ็นต์ ภายใน ๙๖ ชั่วโมง ๒๘
๑๘ กราฟแสดงแนวโน้มการตายของหอยหวานทดลองในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบข่าที่ทำให้หอยหวานตาย ๕๐เปอร์เซ็นต์ ภายใน ๙๖ ชั่วโมง ๒๙
๑๙. กราฟแสดงแนวโน้มการตายของหอยหวานทดลองในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบฝรั่งที่ทำให้หอยหวานตาย ๕๐เปอร์เซ็นต์ ภายใน ๙๖ ชั่วโมง ๒๙
๒๐. อัตราการรอดชีวิตของหอยหวานที่ทดลองเลี้ยงด้วยวิธีการแช่ในสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจร หลังจากได้รับเชื้อ *V. alginolyticus* และทดลองเลี้ยงเป็นเวลา ๑๔ วัน ๓๑
๒๑. อัตราการรอดชีวิตของหอยหวานที่ทดลองเลี้ยงด้วยวิธีการแช่ในสารสกัดหยาบข่า หลังจากได้รับเชื้อ *V. alginolyticus* และทดลองเลี้ยงเป็นเวลา ๑๔ วัน ๓๒
๒๒ อัตราการรอดชีวิตของหอยหวานที่ทดลองเลี้ยงด้วยวิธีการแช่ในสารสกัดหยาบใบฝรั่ง หลังจากได้รับเชื้อ *V. alginolyticus* และทดลองเลี้ยงเป็นเวลา ๑๔ วัน ๓๒

# บทนำ

หอยหวานเป็นหอยทะเลฝาเดียวที่อยู่ในสกุล *Babylonia* เป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจชนิดใหม่อีกชนิดหนึ่งที่กำลังเป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายและมีปริมาณความต้องการเพิ่มมากขึ้น โดยถือว่าเป็นสัตว์น้ำที่มีมูลค่าค่อนข้างสูงและมีรสชาติดี โดยผลผลิตของหอยหวานที่เข้าสู่ตลาดโลกแต่เดิมนั้นจะมาจากการจับจากธรรมชาติเกือบทั้งหมด เมื่อความต้องการหอยหวานในตลาดโลกเพิ่มมากขึ้นจนทำให้หอยหวานในธรรมชาติมีปริมาณลดลง หน่วยงานของไทยทั้งภาครัฐและเอกชนต่างๆจึงได้ตื่นตัว และมีการพัฒนางานวิจัยขึ้นอย่างต่อเนื่องในการเพาะเลี้ยงหอยหวานทั้งเชิงอนุรักษ์และเชิงพาณิชย์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้นและมีการพัฒนาการเจริญเติบโตให้ดีขึ้น เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการ ปัจจุบันนี้ระบบการเพาะเลี้ยงหอยหวานชนิด *Babylonia areolata* เชิงพาณิชย์ในประเทศไทยได้มีการพัฒนาและมีประสิทธิภาพดีขึ้น แต่เมื่อเลี้ยงหอยหวานไปได้ระยะหนึ่งในระบบการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ซึ่งมีอัตราการปล่อยค่อนข้างหนาแน่นและให้อาหารสดเป็นประจำ อาจทำให้เกิดการสะสมของอินทรีย์สารจากเศษอาหารที่เหลือและมูลที่ขับถ่ายออกมาของหอยหวานเพิ่มมากขึ้นในระบบเลี้ยงจนอาจส่งผลให้มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้นอีกทั้งการเลี้ยงหอยหวานไประยะหนึ่งทรายรองพื้นบ่อที่เลี้ยงจะเกิดคราบสีดำแผ่กว้างออกมากขึ้น จึงอาจเป็นสาเหตุที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในหอยหวานตามมาได้ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำกลุ่ม bivalve และ gastropod ได้นั้น ส่วนใหญ่คือ *Vibrio* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรควิบริโอซิส (vibriosis) ในหอยหวานได้ โดยจะเกิดอาการปากหรือท่องวง (proboscis) บวมแดง ไม่สามารถหดปากกลับเข้าไปในลำตัวได้เช่นปกติ นอนหงาย กล้ามเนื้อเท้าไม่หดเข้าไปในเปลือกและไม่ฝังตัวลงไปในพื้นทราย และพบว่าหอยหวานจะตายภายใน ๒๔ ชั่วโมงเมื่อเกิดอาการติดเชื้อวิบริโอ ซึ่งก็จะเป็นสาเหตุให้อัตราการรอดลดลง และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการรักษาเพิ่มมากขึ้น จึงอาจส่งผลให้หอยหวานมีต้นทุนสูงขึ้นและผลผลิตต่ำลง จากการค้นคว้ารายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในหอยหวานนั้น พบว่าในปัจจุบันมีการศึกษากันไม่มากนัก แต่ปัญหาเรื่องโรคและการป้องกันรักษานั้นก็มีความสำคัญไม่น้อยไปกว่าการศึกษาด้านอื่นๆ เพราะการเกิดโรคในสัตว์น้ำจะส่งผลให้มีอัตราการรอดและผลผลิตต่ำลง และยังเป็นเหตุให้เกษตรกรต้องหันมาพึ่งยาปฏิชีวนะและสารเคมีที่มีขายตามท้องตลาดกันมากยิ่งขึ้นและไม่ถูกวิธี ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภคได้ โดยมีการตรวจพบว่ามีการตกค้างของยาปฏิชีวนะในสัตว์น้ำที่จะนำมาบริโภคและส่งออก ซึ่งถือว่าเป็นปัญหาใหญ่ในการค้าสัตว์น้ำระหว่างประเทศ นอกจากนี้ ยังมีการตรวจพบการตกค้างของยาปฏิชีวนะในสิ่งแวดล้อมบริเวณข้างเคียง อันก่อให้เกิดผลกระทบต่อระบบนิเวศน์โดยเฉพาะจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ และที่สำคัญยังเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์อื่นๆ อีกด้วย

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดที่จะใช้สารสกัดที่ได้จากสมุนไพรไทยบางชนิดที่มีการศึกษาแล้วว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) เข้ามาประยุกต์ใช้ในการป้องกันและยับยั้งการเกิดโรควิบริโอซิส (vibriosis) ในหอยหวาน เพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีต่างๆ ลดการนำเข้ายาและสารเคมีจากต่างประเทศ ลดผลกระทบที่มีต่อสิ่งแวดล้อม ลดปัญหาการดื้อยาที่อาจจะทวีความรุนแรงมากขึ้นเป็นลำดับ และลดปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในตัวสัตว์ที่กำลังเป็นปัญหาทางการค้าในปัจจุบัน ดังนั้น การแก้ปัญหาเรื่องโรคของหอยหวานโดยไม่ทำให้เกิดผลกระทบตามมาในภายหลังนั้น จึงจำเป็นต้องหันมาทำเกษตรอินทรีย์ โดยใช้สารสกัดจากธรรมชาติ เช่น สารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยมาประยุกต์ใช้ในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยงานวิจัยนี้จะนำความรู้และเทคนิคทางด้านจุลชีววิทยาและเภสัชวิทยาเข้ามาช่วยในการศึกษา เพื่อให้หอยหวานมีอัตรารอดสูงขึ้นและเป็นผลให้มีปริมาณผลผลิตต่อรุ่นเพิ่มขึ้นด้วย โดย

ข้อมูลจากการศึกษาวิจัยที่ได้นี้จะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยต่อยอด เพื่อหาแนวทางหรือวิธีการป้องกันและยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในหอยหวานได้อย่างถูกต้องและเหมาะสมได้ในอนาคต และเพื่อเป็นการส่งเสริมการทำเกษตรอย่างยั่งยืนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

**วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

- เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ได้แก่ ใบฝรั่ง ข่าและฟ้าทะลายโจรในการยับยั้งและกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรควิบริโอซิส (vibriosis) ในหอยหวานในห้องปฏิบัติการ
- เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดในการยับยั้งและกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรควิบริโอซิส (vibriosis) ในหอยหวาน
- เพื่อทดสอบหาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด
- เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ในการยับยั้งและกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรควิบริโอซิส (vibriosis) ในหอยหวานโดยวิธีการแช่

**ขอบเขตการวิจัย**

ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ได้แก่ ใบฝรั่ง ข่าและฟ้าทะลายโจรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่ก่อให้เกิดโรคในหอยหวาน จะทำการศึกษาตั้งแต่ในระดับห้องปฏิบัติการไปจนถึงการประยุกต์ใช้งานได้จริงในการเพาะเลี้ยงหอยหวานเชิงพาณิชย์ โดยจะทำการศึกษาหาชนิด ระดับความเข้มข้นและความเป็นพิษของสารสกัดหยาบสมุนไพรไทยที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่ก่อให้เกิดโรคในหอยหวาน โดยการศึกษาจะประกอบด้วย

- หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่ทำให้เกิดโรคในหอยหวานได้ (Minimum Inhibitory Concentration: MIC)
- หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่ทำให้เกิดโรคในหอยหวานได้ (Minimum Bactericidal Concentration: MBC)
- หาระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดที่ทำให้หอยหวานตาย ๕๐ เปอร์เซ็นต์ ภายใน ๒๔ ชั่วโมง ($LC_{50}$ at ๒๔ hr)
- ศึกษาอัตราการรอดของหอยหวานที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่ได้รับการรักษาโดยวิธีการแช่สารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด

**ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย**

ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรควิบริโอซีสในสัตว์น้ำ เพื่อเป็นการศึกษาป้องกันและรักษาโรควิบริโอซีสในหอยหวาน โดยจะทำการศึกษาให้ทราบถึงระดับความเข้มข้นและความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยที่เหมาะสม เพื่อให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้จริงในระบบฟาร์มเพาะเลี้ยงหอย

หวานเชิงพาณิชย์ และเพื่อเป็นการทดแทนการใช้ยาต้านจุลชีพที่มีผลกระทบและอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังเป็นการส่งเสริมการทำเกษตรแบบอินทรีย์ และเป็นการบริหารจัดการใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมได้อย่างยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย โดยจะนำความรู้และเทคนิคต่างๆ มาใช้ในการศึกษาวิจัย เพื่อเป็นเพิ่มอัตราการรอดและเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มในการผลิตหอยหอยหวานไทยให้ไปสู่การแข่งขันระดับโลกและพึ่งพาตนเองได้

การศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปใช้ได้ทั้งในด้านวิชาการและในระบบการเลี้ยงหอยหวานทั้งในรูปแบบของ small scale และ commercial scale ซึ่งจะสามารถลดอัตราการตายและเพิ่มผลผลิตจากอัตราการรอดของหอยหวานที่เพิ่มขึ้นได้ ซึ่งโดยปกติแล้วหากหอยหวานเกิดการติดโรควิบริโอซีสก็จะค่อยๆ ตายเพิ่มขึ้น ซึ่งจะก่อให้เกิดความสูญเสียต่อรายได้ของเกษตรกรผู้เลี้ยงหอยหวานเป็นอย่างยิ่ง

**การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง**

ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับหอยหวาน

หอยหวานหรือชื่อภาษาไทยอื่นๆ เช่น หอยตุ๊กแกหรือหอยเทพรส มีชื่อสามัญว่า Spotted Babylon และชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Babylonia areolata* Link, ๑๘๐๗ หอยหวานมีอนุกรมวิธาน ดังนี้

Phylum Mollusca
Class Gastropod
Order Neogastropod
Family Buccinidae
Genus Babylonia
Species areolata

หอยหวานเป็นหอยทะเลฝาเดียวรูปไข่ มีเปลือกค่อนข้างหนา ผิวเรียบและมีแต้มสีน้ำตาลเข้มเป็นระยะๆ บนพื้นสีขาว ส้มหรือเหลือง ลำตัวมีลักษณะพองกลม ที่หัวมีเทนตาเคิล ๑ คู่และตา ๑ คู่ มีท่อ (siphon) และมีเท้าขนาดใหญ่ใช้สำหรับเคลื่อนที่ หอยหวานมีการกินอาหารแบ่งออกเป็น ๒ แบบตามช่วงชีวิต คือ ลูกหอยหวานวัยอ่อนมีการดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอนและกินอาหารด้วยการกรอง (filter feeder) สำหรับหอยหวานระยะลงพื้นและตัวเต็มวัยจะเป็นสัตว์ที่กินเนื้อเป็นอาหาร (carnivorous feeder) และมีพฤติกรรมการกินอาหารแบบกลุ่มก้อน เนื่องจากมีท่องวงยาวสีขาวที่เรียกว่า proboscis ไว้ช่วยในการกินอาหาร โดยหอยหวานมีต่อมน้ำลายสำหรับสร้างน้ำย่อยและส่งออกมาทางท่อนี้ เพื่อช่วยย่อยอาหารภายนอกแล้วจึงดูดเข้าสู่ร่างกาย ด้วยเหตุนี้ หอยหวานจึงไม่มีปัญหาในการกินอาหารแบบกลุ่มก้อนเพราะหอยที่อยู่ด้านหลังสามารถยืดงวงผ่านตัวอื่นๆ เข้าไปกินอาหารได้ โดยปกติแล้วเมื่อหอยหวานกินอาหารอิ่มแล้วจะเคลื่อนที่ออกจากเหยื่อและฝังตัวอยู่ใต้ชั้นทรายทันที หอยหวานจัดเป็นสัตว์ที่มีเพศแยก (dioecious) และไม่สามารถจำแนกเพศได้จากลักษณะเปลือกภายนอก การสืบพันธุ์ของหอยหวานเป็นแบบปฏิสนธิภายใน (internal fertilization) หอยหวานที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่จะมีการแพร่กระจายอยู่ทั่วไปบริเวณชายฝั่งอ่าวไทยและทะเลฝั่งอันดามัน จังหวัดที่พบมาก ได้แก่ ระยอง จันทบุรี ตราด กระบี่ ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี เพชรบุรี ระนอง สตูล ปัตตานีและนครศรีธรรมราช เป็นต้น โดยจะชอบ

อาศัยอยู่บริเวณชายฝั่งทะเลที่มีพื้นทะเลเป็นทรายและทรายปนโคลน ที่ระดับความลึกประมาณ ๕-๒๐ เมตร (นิลนาจ ชัยธนาวิสุทธิ์ และศิรุษา กฤษณะพันธุ์, ๒๕๔๕)

หอยหวานเป็นที่นิยมของผู้บริโภคมากและได้รับความนิยมแพร่หลายทั้งตลาดในและต่างประเทศ อาทิ ไต้หวัน ฮ่องกง ญี่ปุ่น และมีราคาเฉลี่ยที่สูงถึง ๒๐๐-๓๐๐ บาทต่อกิโลกรัม ในประเทศไทยหอยหวานที่บริโภคเกือบทั้งหมดเป็นหอยที่จับมาจากธรรมชาติ เนื่องจากเป็นหอยที่มีมูลค่าค่อนข้างสูงทางเศรษฐกิจ จึงทำให้มีอัตราการจับเพิ่มมากขึ้น และส่งผลให้ประชากรหอยหวานในธรรมชาติมีปริมาณลดลง การเพาะเลี้ยงหอยหวานจึงต้องเข้ามามีบทบาทในการเพิ่มผลผลิตทดแทนผลผลิตจากธรรมชาติที่ลดน้อยลงไป หน่วยงานต่างๆในภาครัฐจึงได้ทำการศึกษาเพื่อหาวิธีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดนี้จนได้ผลเป็นที่น่าพอใจในระดับหนึ่ง แต่ปรากฏว่าเกษตรกรที่ประกอบอาชีพการเพาะเลี้ยงหอยหวานก็ยังคงมีจำนวนน้อย ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะการถ่ายทอดเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงหอยหวานแก่เกษตรกรยังดำเนินการไม่ทั่วถึง และหอยหวานยังประสบปัญหาเรื่องโรคที่ยังไม่สามารถรักษาได้ (ศพช. จันทบุรี กรมประมง, ๒๕๔๘)

โรคที่พบในหอยหวาน

วีณา เคยพุดซา และคณะ (๒๕๔๙) กล่าวว่า แบคทีเรียที่ทำให้สัตว์น้ำในกลุ่มของ bivalve และ gastropod เกิดโรคได้นั้น ส่วนใหญ่คือ *Vibrio* spp. เนื่องจากพบได้โดยทั่วไปในสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำ (aquatic environment)

จากรายงานการศึกษาโรคและพาราสิตของหอยหวานระยะต่างๆ รวมถึงสาเหตุของการเกิดโรค และวิธีการป้องกันรักษา โครงการต่อเนื่องปีที่ ๒ ของวีณา เคยพุดซา และคณะ (๒๕๔๙) พบว่า เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ทั้ง ๕ species ได้แก่ *Vibrio alginolyticus, V. parahaemolyticus, V. fluvialis, V. vulnificus* และ *V. cholerea* สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซิส (vibriosis) ในหอยหวานได้ทั้ง ๕ species โดยหอยหวานที่เป็นโรคจะมีอาการปาก (proboscis) บวมแดง ไม่สามารถหดปากกลับเข้าไปในลำตัวได้เช่นปกติ นอนหงาย กล้ามเนื้อเท้าไม่หดเข้าไปในเปลือกและไม่ฝังตัวลงไปในทราย ซึ่งพบว่า *V. alginolyticus* มีความรุนแรงมากที่สุดที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในหอยหวานได้ และพบว่าหอยหวานจะตายภายใน ๒๔ ชั่วโมง ถ้าหากได้รับแบคทีเรียเข้าไปในปริมาณ ๔.๓๒x๑๐$^{๖}$-๑.๕๘x๑๐$^{๗}$ cfu/ml โดยปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ไม่มีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซิส (vibriosis) ในหอยหวาน ซึ่งแตกต่างจากในหอยเป๋าฮื้อที่จะเกิดการติดเชื้อจาก *V. parahaemolyticus* ได้ดีขึ้นหากมีค่า DO อยู่ในช่วง ๒.๐๕-๓.๕๗ มิลลิกรัม/ลิตร (Cheng *et al.*, ๒๐๐๔) และยังพบว่า หอยหวานที่ป่วยเป็นโรควิบริโอซิสนี้มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Enrofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacin, Tetracycline, Oxolinic acid, Chloramphenical และ Oxytetracycline (วีณา เคยพุดซา และคณะ, ๒๕๕๑)

โรคติดเชื้อวิบริโอ หรือ โรควิบริโอซีส (Vibriosis)

โรคติดเชื้อวิบริโอพบได้ทั่วโลกและเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของการเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะในกุ้ง เกิดจากเชื้อวิบริโอ (*Vibrio* spp.) เช่น *V. parahaemolyticus, V. harveyi, V.vulnificus* เป็นต้น ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนใหญ่มีรูปร่างแบบแท่ง ต้องการเกลือในการเจริญเติบโต (>๑๐ ppt = >๑%) จึงเรียกว่า "halophilic" เชื้อนี้พบได้ทั่วไปในน้ำทะเล แม้แต่ในกุ้งที่แข็งแรงก็สามารถพบเชื้อวิบริโอหลายสปีชีส์ในทางเดินอาหารของกุ้งได้ และเชื้อวิบริโอนี้เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพได้ง่ายมาก

ลักษณะอาการ พบเนื้อตายในเฮปปาโตแพนเครียสเกิดจากการติดเชื้อวิบริโอ เชื้อวิบริโอหลายสปีชีส์เป็นเชื้อจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของกุ้งปกติ จึงคาดว่าการติดเชื้อน่าจะผ่านทางทางเดินอาหารเป็นส่วนใหญ่ เชื้อนี้ก่อโรคได้ในกุ้งทุกระยะตั้งแต่ไข่จนถึงกุ้งโตเต็มวัย อาจพบโรคนี้ได้ในโรงเพาะฟัก เชื้ออาจเป็นสาเหตุโดยตรงของโรคหรือเป็นเชื้อฉวยโอกาส ซึ่งต้องอาศัยสิ่งโน้มนำอื่น เช่น การติดเชื้อไวรัส หรือความเครียด เชื้อวิบริโออาจทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร โรคตามระบบ (systemic infection) หรือโรคบริเวณเปลือกกุ้ง ซึ่งอาจแสดงอาการต่างๆ กัน เช่น อัตราการตายสูง การกินอาหารลดลง สังเกตได้จากกุ้งไม่มีอุจจาระและลอกคราบช้าลง อาการและรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่อาจใช้ในการวินิจฉัยเบื้องต้นได้แก่ ฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) หรือเลือดแข็งตัวช้า แบคทีเรียในฮีโมลิมฟ์หรือเนื้อเยื่อต่างๆ แผ่นคราบแบคทีเรีย (bacterial plaques) บนคิวติเคิล จุดดำโนดูลในเนื้อเยื่อ (melanized hemocytic nodules) มีแบคทีเรียตรงกลางโนดูล ไขมันในเฮปปาโตแพนเครียสต่ำ และ/หรือ melanized tubules การเรืองแสงของตัวกุ้ง (luminescence) การพบโคโลนีของแบคทีเรียที่มีสีเขียวขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS) (ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ์, ๒๕๕๑)

สมุนไพรไทย

สมุนไพรเป็นยาพื้นบ้านที่ใช้รักษาโรคในคนมาแต่ครั้งโบราณ และในปัจจุบันวงการสาธารณสุขไทยก็ได้มีการรณรงค์ให้แพทย์หันกลับมาใช้ประโยชน์จากสมุนไพรกันมากขึ้น นอกจากใช้รักษาโรคในคนแล้วยังมีการทดลองใช้สมุนไพรบางชนิดบรรเทาและรักษาอาการของโรคในสัตว์น้ำด้วย โดยเฉพาะการรักษาโรคในกุ้งกุลาดำ ที่ได้มีการศึกษาไว้อย่างแพร่หลาย ซึ่งเหตุผลในการนำสมุนไพรมาใช้ในสัตว์น้ำก็คือ สมุนไพรเป็นสิ่งที่มีอยู่แล้วในประเทศ มีผลข้างเคียงน้อย ราคาค่อนข้างถูก สามารถนำมาใช้ทดแทนยาแผนปัจจุบันที่มีราคาแพงและอาจช่วยแก้ปัญหาเรื่องการดื้อยาได้ อีกทั้งยังส่งผลให้ผู้เลี้ยงสามารถลดต้นทุนการผลิตได้อีกทางหนึ่งด้วย

สารประกอบต่างๆ ที่ได้จากสมุนไพรนั้น ถือว่าเป็นสารจากแหล่งธรรมชาติ มีความปลอดภัยสูงกว่ายาปฏิชีวนะหรือสารเคมีต่างๆ ถ้านำมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในหอยหวานแล้วได้ผลดี ก็จะช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีลงได้ ซึ่งในปัจจุบันผู้บริโภคมีความห่วงใยสุขภาพกันมากยิ่งขึ้น จึงหันมาสนใจการใช้สารสกัดจากธรรมชาติแทนการใช้สารเคมีกันมากยิ่งขึ้น ดังนั้นหากจะนำสมุนไพรมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในหอยหวาน ก็น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เป็นไปได้

ประโยชน์ในทางการแพทย์และการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสมุนไพรไทย

ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งกุลาดำต้องประสบปัญหาหลายด้าน โดยเฉพาะปัญหาการเกิดโรค ทำให้มีการนำยาและสารเคมีหลายชนิดเข้ามาใช้เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว ซึ่งยาและสารเคมีบางชนิดอาจมีผลตกค้างมาสู่คนผู้บริโภคกุ้งได้ นอกจากนี้ยังมีผลต่อสิ่งแวดล้อมอีกมากโดยที่เรานึกไม่ถึง การใช้สมุนไพรนับเป็นทางออกที่ดี เนื่องจากเป็นพืชธรรมชาติที่ใช้เป็นยารักษาโรคในคนมาแต่โบราณ จึงมีความปลอดภัยสูงในการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อแก้ปัญหาเรื่องโรคในกุ้งกุลาดำ นอกจากนี้ยังสามารถลดการขาดดุลการค้าของประเทศได้ เพราะสมุนไพรเป็นพืชที่มีอยู่แล้วในประเทศ ไม่จำเป็นต้องเสียเงินเพื่อสั่งซื้อยาและสารเคมีจากต่างประเทศ ด้วยเหตุนี้หลายประเทศในทวีปเอเชียจึงอุดมสมบูรณ์ไปด้วยสมุนไพรที่มีคุณค่ามหาศาล (สถาพร ดิเรกบุษราคัม, ๒๕๔๐) จึงได้มีการทดลองและพัฒนาการใช้สมุนไพรในสัตว์น้ำกันอย่างกว้างขวางมากยิ่งขึ้น

Zhang and Lu (๑๙๘๒) และ Hamilton-Miller (๑๙๙๕) รายงานว่า สารสกัดชา (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) ด้วยน้ำร้อนมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio cholerae* และ *Vibrio* spp. ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Toda, *et al.* (๑๙๘๙) and Shetty, *et al.* (๑๙๙๔) ได้รายงานว่าชามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วงได้หลายชนิด โดยพบว่า สารสกัดชาเขียวญี่ปุ่นมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae, V. parahaemolyticus* และ *V. mimicus,* ส่วนสารสกัดชาดำและชาจีน มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วงได้หลายชนิด และมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae* ได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ Hara and Ishigami (๑๙๘๙) ยังพบว่าสาร polyphenols (๑๐ ชนิด) ที่แยกได้จากชา ความเข้มข้นมากกว่า ๑,๐๐๐ ppm มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus,V. fluvialis* และ *V. metschnikivii,* และสอดคล้องกับ Toda, *et al.* (๑๙๙๐) รายงานว่า สาร epicatechin gallate และ epigallocatechin gallate ที่มีอยู่ในชามีฤทธิ์ต้าน hemolysin ที่สร้างขึ้นโดยเชื้อ *V. parahaemolyticus* (Vp-TDH) และ *V. cholerae* (cholera hemolysin)

Nakanishi, *et al.* (๑๙๖๕) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* ( Burm.f.) Wall. ex Nees) พบว่า สารสกัดแอลกอฮอล์ ๘๕% และ ๗๐% จากใบฟ้าทะลายโจร ความเข้มข้น ๒๐ มก./มล. นำมาทดสอบด้วยวิธี agar dilution สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วง ได้แก่ *V. cholerae* ได้ ๑๐๐% นอกจากนี้ สถาพร และคณะ (๒๕๓๙) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร ๑๖ ชนิดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ พบว่า ฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ทดสอบได้มากถึง ๘๐-๑๐๐% ของจำนวนสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการทดสอบ

Gritsanapan and Chulasiri (๑๙๘๓) พบว่า สารสกัด ๗๐% เอทานอลจากเปลือกผลทับทิม (*Punica granatum* Linn.) ที่ความเข้มข้น ๒๕๐ มก./มล. มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ในขณะที่ Aynehchi, *et al.* (๑๙๘๒) รายงานว่า สารสกัด ๘๐% เอทานอล ที่ความเข้มข้น ๑๐๐ มคก./มล. ไม่สามารถต้านเชื้อ *V. cholerae* ได้

ธิดาพร ฉวีภักดิ์ และคณะ (๒๕๕๐) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรไทย ๓ ชนิด ได้แก่ ข่า กระวานและกระชาย ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่แยกได้จากกุ้งทะเลทั้ง ๗ ชนิด ได้แก่ *V. cholerae, V. parahaemolyticus, V. fluvialis, V. vulnificus, V. alginolyticus, V. mimicus* และ *V. harveyi* พบว่า สารสกัดข่าสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้ง ๗ ชนิด ได้ดี แต่สารสกัดกระวานและกระชายไม่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง ๗ ชนิด ส่วนค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งได้ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่กำจัดได้ (MBC) ของ *Vibrio* spp. แต่ละชนิดมีค่าแตกต่างกัน โดยค่า MIC และ MBC ของ *V. Cholerae* มีค่าน้อยที่สุด เท่ากับ ๐.๗๘ mg/ml นอกจากนี้ Oonmetta aree, *et al.* (๒๐๐๕) ได้ศึกษาพบสารประกอบหลักในสารสกัดข่า คือ D, L-1' – acetoxychavicol acetate (ACA) พบประมาณ ๗๖.๙ % แยกโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบโดย GC-MS และ NMR และทำการสกัดข่าด้วยน้ำกลั่น เมทานอลและแอลกอฮอล์ จะพบสารที่ออกฤทธิ์ คือ 1'-acetoxychavicol acetate, 1'-acetoxyeugenol acetate และ eugenol ซึ่งสามารถช่วยลดอาการอักเสบและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ และยังฆ่าเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคกลากเกลื้อนได้เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Okazaki and Oshima (๑๙๕๒) พบว่า สารสกัดข่าด้วยไดเอทิลอีเธอร์ ปิโตรเลียมอีเธอร์ แ ละน้ำกลั่นสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการแน่นจุกเสียดท้องได้ โดยพบ eugenol เป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

จริยา สินเดิมสุข และคณะ (๒๕๓๒a) รายงานว่า ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) (ไม่ระบุตัวทำละลาย) สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วง ได้แก่ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (MIC) ที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วง เท่ากับ ๒๕ มก./มล. นอกจากนี้ จริยา สินเดิมสุข และคณะ (๒๕๓๒b) ยังทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการรักษาโรคอุจจาระร่วงระหว่างใบฝรั่งและเปลือกมังคุด พบว่า สารสกัดน้ำร้อนจากเปลือกผลมังคุดสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วง โดยมีค่า MIC ของสารสกัดต่อเชื้อ *V. cholerae* และ*V. parahaemolyticus* เท่ากับ ๒๕ มก./มล. ส่วนสารสกัดใบฝรั่งด้วยน้ำ ความเข้มข้น ๒๐ มก./มล. มีฤทธิ์สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae* (ทำให้เกิดอหิวาตกโรค) ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อได้ ซึ่งขนาดความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งได้ (MIC) มีค่าเท่ากับ ๕ มก./มล. และสรุปได้ว่าสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้น้อยกว่าใบฝรั่ง

ฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn.) มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ โดยนำสารสกัดเปลือกต้นฝรั่งด้วย ๗๐% เอทานอล ความเข้มข้น ๒๕๐ มก./มล. มาทดสอบในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง คือ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* (Gritsanapan and Chulasiri, ๑๙๘๓) และสารสกัดผลดิบของฝรั่งด้วยเมทานอล ในขนาด ๕๐, ๑๐๐ และ ๓๐๐ มก./กก. สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae* ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อได้ ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งได้ (MIC) มีค่าเท่ากับ ๑๐๐-๒๐๐ มคก./มล. (Ghosh, *et al.*, ๑๙๙๓)

ปัญจางค์ ธนังกูล และชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ (๒๕๓๐) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของใบฝรั่งในการรักษาโรคอุจจาระร่วงในคนเปรียบเทียบกับยาเตตร้าซัยคลิน โดยทำการทดลองทางคลินิกในผู้ป่วย ๑๒๒ คน ที่เป็นโรคอุจจาระร่วง เป็นชาย ๖๔ คน และหญิง ๕๘ คน มีช่วงอายุ ๑๖ - ๕๕ ปี ทำการศึกษาเปรียบเทียบด้วยวิธีการสุ่มตัวอย่าง โดยนำใบฝรั่งไปอบแห้งแล้วบดเป็นผงบรรจุแคปซูลขนาด ๒๕๐ มิลลิกรัม ลักษณะและขนาดเดียวกับยาเตตร้าซัยคลิน และบริหารการรับประทานยาเช่นเดียวกัน คือ ๕๐๐ มิลลิกรัม ทุก ๖ ชั่วโมง เป็นเวลา ๓ วัน ทั้งสองกลุ่ม พบว่า ใบฝรั่งสามารถลดจำนวนอุจจาระ ระยะเวลาที่ถ่ายอุจจาระ แ ละจำนวนน้ำเกลือที่ให้ทดแทนได้มากกว่ายาเตตร้าซัยคลิน แ ละไม่พบอาการข้างเคียงใดๆ ซึ่งตรงกับการทดลองทางการแพทย์ที่พบว่า ใบ ดอกและผลฝรั่ง มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียได้

เพ็ญศรี บุญตามช่วย และคณะ (๒๕๔๙) ทดลองนำใบฝรั่ง ๓ แบบ คือ ใบฝรั่งสด ใบฝรั่งตากแห้ง และใบฝรั่งตากแห้งเก็บไว้นาน ๑ เดือน โดยนำมาต้ม ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อวิบริโอที่แยกได้จากกุ้งป่วย ๗ ชนิด คือ *Vibrio damsela, V. parahaemolyticus, V. alginolyticus, V. pelagiusll, V. vunificus, V. harveyi* และ *V. mimicus* โดยวิธีการ Agar dilution พบว่า ใบฝรั่งสดและใบฝรั่งตากแห้งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *V. damsela, V. alginolyticus* และ *V. pelagiusll* มีค่า MIC เท่ากับ ๐.๐๗๘ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับ *V. vulnificus* และ *V. harveyi* มีค่า MIC เท่ากับ ๐.๑๕๖ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วน *V. mimicus* มีค่า MIC เท่ากับ ๐.๖๒๕ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารสกัดที่ได้จากใบฝรั่งตากแห้งที่เก็บไว้นาน ๑ เดือน ให้ค่า MIC สูงกว่าใบฝรั่งสดและใบฝรั่งตากแห้งเพิ่มขึ้นหนึ่งความเข้มข้นในแต่ละเชื้อ พบว่าสารสกัดจากใบฝรั่งที่นำไปต้มมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อวิบริโอที่ก่อโรคในกุ้งได้ภายใต้ห้องปฏิบัติการ ซึ่งความร้อนไม่ได้ทำให้ประสิทธิภาพของสารสกัดสูญเสียไป ดังนั้นใบฝรั่งสดและใบฝรั่งตากแห้งมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อเหมือนกันในขณะที่ใบฝรั่งตากแห้งที่เก็บไว้นานๆ ประสิทธิภาพจะเสื่อมลง

สถาพร ดิเรกบุษราคัม และคณะ (๒๕๓๙) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร ๑๖ ชนิดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ พบว่า ใบฝรั่งและมะระขี้นกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ทดสอบได้มากถึง ๘๐-๑๐๐% ของจำนวนสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการทดสอบ แม้จะใช้สารสกัดในระดับความเข้มข้นต่ำเพียง ๐.๖๒๕ และ ๑.๒๕ มก./มล. ตามลำดับ และสรุปได้ว่า ใบฝรั่งสามารถยับยั้งเชื้อได้ด้วยความเข้มข้นต่ำกว่ามะระขี้นก (๐.๖๒๕ มก./มล.) ในขณะที่มะระขี้นกสามารถยับยั้งเชื้อได้เปอร์เซ็นต์สูงกว่าใบฝรั่งที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน นอกจากนี้ สถาพร ดิเรกบุษราคัม และคณะ (๒๕๓๕) ยังได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งด้วยน้ำในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคจำนวน ๒๓ สายพันธุ์ คือ *V. harveyi* ๙ สายพันธุ์ *V. splendidus* ๗ สายพันธุ์ *V. parahaemolyticus* ๒ สายพันธุ์ *V. mimicus* ๑ สายพันธุ์ *V. vulnificus* ๑ สายพันธุ์ *V. fluvialis* ๑ สายพันธุ์ *V. cholerae* ๑ สายพันธุ์ และ *V. alginolyticus* ๑ สายพันธุ์ พบว่า เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ๒๑ สายพันธุ์ จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตด้วยสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งที่ระดับความเข้มข้น ๒.๕ มก./มล. ยกเว้นเชื้อ *V. splendidus* ๑ สายพันธุ์ และ *V. minicus* ๑ สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งที่ระดับความเข้มข้น ๕ มก./มล. สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ได้ทุกสายพันธุ์

นอกจากนี้ สถาพร ดิเรกบุษราคัม และคณะ (๒๕๔๑) ยังได้ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของใบฝรั่งและยาออกซิเตตร้าซัยคลินในการกำจัดแบคทีเรียเรืองแสง (*V. harveyi*) ในกุ้งกุลาดำ พบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรียเรืองแสงของกุ้งกุลาดำที่ได้รับสารสกัดจากใบฝรั่งจะดีกว่าในกลุ่มที่ได้รับออกซิเตตร้าซัยคลิน เปอร์เซ็นต์การลดลงของแบคทีเรียเมื่อเทียบกับชุดควบคุมของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบฝรั่งเข้มข้น ๑๐ และ ๑ mg/ml มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ ๖๘.๐๕% และ ๖๒.๙๙% ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มที่ได้รับยาออกซิเตตร้าซัยคลินมีค่าเพียง ๕๑.๔%

พืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยจึงน่าจะเป็นหนทางหนึ่งในการป้องกันและยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรควิบริโอซิสในหอยหวานได้ ซึ่งมีข้อดี คือ ประหยัดรายจ่าย หาซื้อได้ง่ายและราคาถูก (วันดี กฤษณพันธ์, ๑๙๙๑) สำหรับพืชสมุนไพรที่เลือกมาศึกษาเปรียบเทียบผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรควิบริโอซิสในหอยหวานในครั้งนี้มี ๓ ชนิด ได้แก่ สารสกัดหยาบจากใบฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn.), ข่า (*Alpinia galanga* (Linn.) Swartz.) และฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall. ex Nees) ซึ่งได้มีการอ้างอิงถึงแล้วว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ เช่น สารสกัดหยาบจากใบฝรั่งและข่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ได้ทั้ง ๕ สายพันธุ์ ได้แก่ *Vibrio alginolyticus,V. parahaemolyticus, V. fluvialis, V. vulnificus* และ *V. cholerae* ได้ดีกว่าสมุนไพรไทยชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาแล้วว่าสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่ายาออกซิเตตร้าซัยคลิน และไม่มีความเป็นพิษหรือผลข้างเคียงใดๆ (สถาพร ดิเรกบุษราคัม และคณะ, ๒๕๔๑) ส่วนสารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจรยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ได้มากถึง ๘๐ - ๑๐๐% (ตารางที่ ๑) อีกทั้งใบฝรั่ง ข่าและฟ้าทะลายโจรก็ยังสามารถเก็บรวบรวมได้จากธรรมชาติและหาซื้อได้ง่าย เนื่องจากเป็นพืชสมุนไพรที่มีผลผลิตตลอดทั้งปีและราคาไม่แพง ถ้างานวิจัยนี้สามารถนำสารสกัดหยาบจากใบฝรั่ง ข่าและฟ้าทะลายโจร มาใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ได้สำเร็จ อาจจะช่วยลดปัญหายาและสารเคมีตกค้างในสัตว์น้ำได้ และยังเป็นแนวทางที่จะส่งเสริมให้มีการเลี้ยงสัตว์น้ำแบบเกษตรอินทรีย์เพื่อความยั่งยืนและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ตารางที่ ๑ คุณสมบัติและสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของพืชสมุนไพรทั้ง ๓ ชนิด

| พืชสมุนไพร | ตัวทำละลาย | สารสำคัญในการออกฤทธิ์ | เชื้อแบคทีเรียที่ถูกยับยั้ง | MIC |
|---|---|---|---|---|
| ใบฝรั่ง | น้ำกลั่น | quercetin, quercetin-3-arabinoside | *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. splendidus*, *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* | ๑.๒๕-๕.๐๐ มก./มล. (สถาพร ดิเรกบุษราคัม และคณะ, ๒๕๓๙; จริยาและคณะ, ๒๕๓๒b) |
| | Ethanol ๗๐% | - (ยังไม่พบรายงาน) | *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* | - (Gritsanapan and Chulasiri, ๑๙๘๓) |
| ฟ้าทะลายโจร | แอลกอฮอล์ ๗๐% และ ๘๕% | Flavone และ Lactone: Andrographolide; Neo-, Deoxy-Andrographolide | *V. cholerae* | - (สถาพร ดิเรกบุษราคัม และคณะ, ๒๕๓๙) |
| ข่า | Ethanol ๑๐๐%, น้ำกลั่น | Eugenol, 1'-acetoxychavicol acetate, 1'-acetoxyeugenol acetate | *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. harveyi* | ๐.๗๘-๕๐ มก./มล. (ธิดาพร ฉวีภักดิ์ และคณะ, ๒๕๕๐) |

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

- ทราบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ได้แก่ ใบฝรั่ง ข่าและฟ้าทะลายโจรในการยับยั้งการเจริญเติบโตและกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรควิบริโอซิส (vibriosis) ในหอยหวานเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต
- ทราบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดในการยับยั้งการเจริญเติบโตและกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรควิบริโอซิส (vibriosis) ในหอยหวานได้
- สามารถใช้สมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดในการยับยั้งโรควิบริโอซิส (vibriosis) ในหอยหวานแทนการใช้ยาปฏิชีวนะได้ เพื่อเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม
- สามารถช่วยลดปัญหาสารเคมีและยาปฏิชีวนะตกค้างในตัวหอยหวานได้ ซึ่งจะทำให้ได้หอยหวานที่มีคุณภาพและปลอดสารพิษ และยังช่วยส่งเสริมการทำเกษตรอินทรีย์

# วิธีการวิจัย

## การวางแผนการทดลอง

### การเตรียมน้ำทะเล

ใช้น้ำทะเลที่ผ่านการกรองด้วยถุงกรอง คุณสมบัติของน้ำทะเลก่อนการทดลอง มีความเค็มประมาณ ๓๐ psu ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO หรือ dissolve oxygen) มีค่ามากกว่า ๕ มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นกรดเป็นด่างหรือ pH ควรมีค่าระหว่าง ๗.๐ - ๘.๕ อุณหภูมิน้ำประมาณ ๒๗ - ๒๙ องศาเซลเซียส ความเป็นด่างทั้งหมด เท่ากับ ๑๐๐ - ๒๐๐ มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณแอมโมเนียรวม (total ammonia) ไม่ควรเกิน ๐.๔ มิลลิกรัมต่อลิตร

### การเตรียมหอยหวาน

เตรียมหอยหวานความยาวเปลือก ๒.๐ - ๓.๐ เซนติเมตร จำนวน ๑,๘๐๐ ตัว จากชันเซ็ทฟาร์มหอยหวาน จังหวัดชลบุรี นำมาเลี้ยงไว้ในกระบะพลาสติกขนาดความจุน้ำทะเล ๕ ลิตร ที่ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ หน่วยอายุรศาสตร์สัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำการเลี้ยงหอยในกระบะพลาสติกที่บรรจุน้ำทะเลความเค็มประมาณ ๓๐ psu ที่พื้นก้นกระป๋องปกคลุมด้วยทรายละเอียดที่ล้างจนสะอาดและตากแดดจนแห้งสนิท หนาประมาณ ๕.๐ เซนติเมตร สำหรับให้หอยหวานฝังตัว ระดับความลึกของน้ำในกระบะพลาสติกสูงประมาณ ๓๐ เซนติเมตร เลี้ยงเป็นเวลาอย่างน้อย ๗ วันก่อนเริ่มดำเนินการทดลอง เพื่อปรับให้หอยหวานคุ้นเคยกับสภาพทดลองก่อน (acclimated) โดยตลอดระยะเวลาการทดลองจะให้ปลาข้างเหลือง (*Selaroides leptolepis*) ในลักษณะปลาทั้งตัวเป็นอาหาร และให้อาหารแบบให้กินจนอิ่ม (satiation feeding) เป็นประจำทุกวัน วันละ ๑ ครั้งในช่วงเช้า หลังจากให้อาหารแล้วจะเก็บอาหารส่วนที่เหลือออกให้หมด ก่อนการทดลองทุกครั้งงดให้อาหาร ๑ วัน ใช้หัวทรายให้อากาศตลอดการเลี้ยงและมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน

### การเตรียมแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* ที่ใช้ในการทดลองแยกได้จากหอยหวานที่ป่วยปาก (proboscis) บวมแดงจากชันเซ็ทฟาร์มหอยหวาน จังหวัดชลบุรี จำนวน ๑๕ ตัวอย่าง (ภาพที่ ๑) ที่มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย ๖.๔๘ ± ๐.๓๓ กรัม และความยาวเปลือกเฉลี่ย ๒.๘๗ ± ๐.๐๕ เซนติเมตร โดยนำมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Triptic Soy Agar (TSA, Difco) ที่มี ๑.๕ % NaCl และ Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose (TCBS, Difco) บ่มเชื้อไว้ที่ incubator อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๘-๒๔ ชั่วโมง เมื่อได้เชื้อแบคทีเรียที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS แล้วจะนำไปทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) ก่อนนำไปพิสูจน์เชื้อเพื่อแยกชนิด (Identification) โดยการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test) การย้อมติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อแบคทีเรีย (Gram's stain and morphology) (ภาพที่ ๒) ความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆทั้ง ๒๐ ชนิด โดยใช้ API ๒๐E Test kit (Biomerieux, France) ได้แก่ β-galactosidase, arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, citrate utilization, sulfide production, urease, tryptophane

deaminase, indole production, Voges-Proskauer reaction, gelatin liquefaction, glucose fermentation, mannitol fermentation, inositol fermentation, sorbitol fermentation, rhamnose fermentation, sucrose fermentation, melibiose fermentation, amygdalin fermentation และ arabinose fermentation เพื่อพิสูจน์และยืนยันว่าเป็นแบคทีเรียชนิดที่ต้องการ โดยสามารถดูวิธีการทดสอบได้ในภาคผนวก ก.

จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาเจือจางแบบ ๑๐ เท่า โดยใช้น้ำเกลือ (NaCl) ๑.๕ เปอร์เซ็นต์เจือจางให้ได้ ๕ ระดับความเข้มข้น คำนวณหาปริมาณเชื้อโดยการเทียบกับค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น ๖๐๐ นาโนเมตร ดูดสารละลายเชื้อจากแต่ละหลอดมา ๐.๑ มิลลิลิตร มาเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA + ๑.๕% NaCl ด้วยวิธี Spread plate technique นำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๘ - ๒๔ ชั่วโมง เพื่อทำการนับจำนวนเชื้อทั้งหมดเป็นหน่วย Colony forming unit/ml (CFU/ml) นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหากราฟมาตรฐาน

โดยกราฟมาตรฐาน มีค่า X หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสง (OD) และค่า Y หมายถึง ค่า log ของความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสามารถใช้สมการของกราฟมาตรฐานดังกล่าวมาในการคำนวณความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ในแต่ละการทดลองได้ (วีณา เคยพุดชา และคณะ, ๒๕๔๙)

ภาพที่ ๑ หอยหวานที่มีอาการปาก (proboscis) บวมแดง

ภาพที่ ๒ ขั้นตอนการย้อมสีแกรม (Gram's stain) เพื่อดูการติดสีของผนังเซลล์ และลักษณะรูปร่างของเชื้อแบคทีเรีย

การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพรไทย

นำสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ได้แก่ ใบฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn.) เป็นใบแก่สีเขียวเข้มซื้อจากสวนฝรั่ง อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม, ข่า (*Alpinia galanga* (Linn.) Swartz.) เหง้าแก่สดซื้อจากตลาดสดยิ่งเจริญ กรุงเทพฯ (ภาพที่ ๓) และใบฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall. ex Nees) ตากแห้งบดละเอียดซื้อจากร้านขายยาสมุนไพรย่านเยาวราช กรุงเทพฯ นำพืชสมุนไพรสดมาล้างด้วยน้ำสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนออก นำไปผึ่งลมให้แห้งและนำไปอบด้วยตู้อบ hot air oven (memmert, Germany) ที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบดละเอียด (Sharp Model EM-๒๒A, Thailand) จนได้ผงสมุนไพรละเอียด (ภาพที่ ๔) จากนั้นนำผงสมุนไพรมาแช่ด้วยตัวทำละลาย และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหย Rotary evaporator (BUCHI Rotavapor R-๒๑๐, Switzerland) (ภาพที่ ๕) ซึ่งจะทำการสกัดให้ได้สารสกัดที่มากพอใช้ในการทดลอง โดยใบฝรั่งจะทำการสกัดตามวิธีการของพเยาว์, ๒๕๒๖, ข่าจะสกัดตามวิธีการของ Oonmetta-aree *et al.*, ๒๐๐๕ และใบฟ้าทะลายโจรจะสกัดตามวิธีการของ Herunsalee, ๑๙๙๓ ซึ่งการสกัดสารสมุนไพรแต่ละชนิดนั้น จะสกัดสารเพียงครั้งเดียวให้ได้ปริมาณมากเพียงพอกับการทดลอง เพื่อควบคุมให้ได้สารสกัดสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพและมีปริมาณสารสำคัญคงที่ เมื่อสกัดสารจากพืชสมุนไพรทั้ง ๓ ชนิดเสร็จแล้ว จะส่งสมุนไพรผงบดละเอียดไปตรวจวิเคราะห์ทางพฤษเคมี เพื่อหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อวิบริโอ โดยใช้เครื่องมือพิเศษ เช่น HPLC, GC-MS ในการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดและค่าปริมาณความชื้น ซึ่งส่งตรวจที่สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง จำกัด เพื่อบ่งบอกถึงสารสำคัญในสมุนไพร

ก. ใบฝรั่งสด ข. เหง้าข่าสด

ภาพที่ ๓ ลักษณะของสมุนไพรสดที่หั่นและนำไปอบแห้ง

ก. ใบฟ้าทะลายโจรผง ข. ข่าผง ค. ใบฝรั่งผง

ภาพที่ ๔ ผงสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ที่ผ่านการอบแห้งและบดละเอียด

ภาพที่ ๕ เครื่อง Rotary evaporator ใช้สำหรับระเหยตัวทำละลายออก

**วิธีการดำเนินการวิจัยในแต่ละขั้นตอน ดังนี้**

**<u>ขั้นตอนที่ ๑</u> การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่ทำให้เกิดโรคในหอยหวาน (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) โดยวิธี Broth Dilution Method**

ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเชื้อแบคทีเรียในหอยหวาน โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) ทำการเจือจางสารละลายจากสารสกัดสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดแบบ ๒-fold dilution ได้สารละลายสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น ดังนี้ ๗๐๐.๐๐, ๓๕๐.๐๐, ๑๗๕.๐๐, ๘๗.๕๐ ๔๓.๗๕, ๒๑.๘๘, ๑๐.๙๔, ๕.๔๗, ๒.๗๓, ๑.๓๗, ๐.๖๘, ๐.๓๔ และ ๐.๑๗ มิลลิกรัม/ลิตร

จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่เตรียมไว้ตามวิธีข้างต้น มาใช้ทดสอบโดยดูดสารละลายของแบคทีเรีย $๑๐^{๖}$ cfu/mL ปริมาณ ๐.๑ มิลลิลิตร ใส่ลงในถาดหลุม ๙๖ หลุม (๙๖-well plate) ที่มีอาหาร MHB (Mueller Hinton Broth) ผสม ๑.๕% NaCl ปริมาตร ๐.๑ มิลลิลิตรแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๐-๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๘-๒๔ ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC) แล้วตรวจสอบผลการทดลองโดยดูจากความขุ่นใสที่เกิดขึ้นในหลุม ค่า MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดของหลอดทดลองที่ไม่มีความขุ่น (Oonmetta-aree *et al.*, ๒๐๐๕) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ น้ำกลั่นและยาออกซิเตตร้าซัยคลิน (ธิดาพร ฉวีภักดิ์ และคณะ, ๒๕๕๐)

**<u>ขั้นตอนที่ ๒</u> การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดในการกำจัดแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่ทำให้เกิดโรคในหอยหวาน (Minimal Bactericidal Concentration: MBC) โดยวิธี Total plate count**

นำถาดหลุม ๙๖ หลุม (๙๖-well plate) ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง ๓ ชนิดในขั้นตอนที่ ๑ (ทดสอบ MIC) ที่ใสไม่เกิดความขุ่น และหลุมที่มีความขุ่นสุดท้ายที่มีความเข้มข้นต่อจากหลุมที่ใส มาทดสอบหาค่า MBC ต่อโดยการดูดสารละลายในหลุม ๐.๑ มิลลิลิตร แล้วมาเกลี่ยให้ทั่วบน TSA agar ที่มี ๑.๕% NaCl แล้วบ่มที่อุณหภูมิ ๓๐-๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๘-๒๔ ชั่วโมง และนับจำนวนโคโลนี

ของแบคทีเรีย ค่า MBC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้แบคทีเรียตาย ๙๙.๙% หรือมากกว่านั้น (MBC < ๒๐ cfu/๐.๑ มิลลิลิตร) (ธิดาพร ฉวีภักดิ์ และคณะ, ๒๕๕๐)

**ขั้นตอนที่ ๓ การเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซิส (vibriosis) และหาค่า median lethal dose at ๒๔ hr ($LD_{50}$ at ๒๔ hr)**

นำหอยหวานจำนวน ๑๕๐ ตัว ที่เตรียมไว้มาแบ่งออกเป็น ๕ กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม ๑ กลุ่ม และกลุ่มทดลอง ๔ กลุ่ม แต่ละกลุ่มจะมี ๓ ซ้ำ ซ้ำละ ๑๐ ตัว แต่ละซ้ำจะเลี้ยงหอยหวานในกระบะพลาสติกขนาดความจุน้ำ ๕ ลิตร ความเค็มของน้ำทะเล ๓๐-๓๒ psu ทุกกระบะทดลองจะให้อากาศตลอดการทดลองโดยใช้หัวทราย งดให้อาหารหอย ๑ วันก่อนการทดลอง หอยหวานที่ตายใหม่ๆจากการทดลอง จะนำมาเพาะเชื้อแบคทีเรียบน TSA, TCBS และทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) เพื่อยืนยันผล หอยหวานที่รอดจากการทดลองจะไม่นำมาใช้ทดลองอีก

หอยหวานในกลุ่มควบคุมทุกตัวจะใช้ Tuberculin syringe ขนาดเข็ม ๒๗G ความยาว ๐.๕ นิ้ว (๐.๔๕ x ๑๓ mm) ฉีดน้ำเกลือ (sterile normal saline solution) เข้าที่กล้ามเนื้อเท้าหอยหวานตัวละ ๐.๑ มิลลิลิตร ส่วนหอยหวานในกลุ่มทดลองทั้ง ๔ กลุ่ม จะใช้ความเข้มข้นของเชื้อ ๔ ระดับ ($๑๐^{๕}$, $๑๐^{๖}$, $๑๐^{๗}$ และ $๑๐^{๘}$ cfu/mL) โดยฉีดเชื้อเข้ากล้ามเนื้อของหอยหวานทุกตัว ตัวละ ๐.๑ มิลลิลิตร หลังจากนั้นจะสังเกตพฤติกรรมและอาการของหอยหวานภายในเวลา ๒๔ ชั่วโมง บันทึกจำนวนหอยที่ตายและวิการของหอย แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปหาค่า $LD_{50}$ โดยวิธี Probit Analysis (วีณา เคยพุดชา และคณะ, ๒๕๔๙)

**ขั้นตอนที่ ๔ การทดสอบหาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดที่ทำให้หอยหวานตาย ๕๐ เปอร์เซ็นต์ (median lethal concentration: $LC_{50}$)**

การศึกษาวิจัยนี้จำเป็นต้องใช้หอยหวานที่เตรียมไว้ทั้งหมด ๕๔๐ ตัว โดยแบ่งการทดลองออกเป็น ๓ ครั้ง ครั้งละ ๑๘๐ ตัว/สมุนไพร ๑ ชนิด ได้แก่ ใบฝรั่ง ข่าและฟ้าทะลายโจร โดยมีวิธีการดำเนินการ ดังนี้

นำหอยหวานขนาด ๒.๐ - ๓.๐ เซนติเมตร จำนวน ๑๘๐ ตัว มาแบ่งออกเป็น ๖ กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม ๑ กลุ่มและกลุ่มทดลอง ๕ กลุ่ม โดยในกลุ่มทดลองต้องการหาระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งที่ทำให้หอยหวานตาย ๕๐ เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา ๙๖ ชั่วโมง จะแบ่งกลุ่มทดลองเป็นระดับความเข้มข้นย่อย ๕ กลุ่ม แต่ละกลุ่มมี ๓ ซ้ำ ซ้ำละ ๑๐ ตัว นำหอยหวานมาเลี้ยงในกระบะพลาสติกขนาดความจุ ๕ ลิตร ความเค็มของน้ำทะเล ๓๐ - ๓๒ psu ทำการทดลองเลี้ยงหอยหวานในน้ำทะเลที่ใส่สารสกัดหยาบจากใบฝรั่งในแต่ละระดับความเข้มข้น ส่วนกลุ่มควบคุมจะเลี้ยงในน้ำทะเลที่ไม่ใส่สารสกัดหยาบจากใบฝรั่ง กระบะพลาสติกทดลองทุกใบจะให้อากาศตลอดการทดลองโดยใช้หัวทราย งดให้อาหารหอย ๑ วันก่อนการทดลอง จะทำการเลี้ยงหอยหวานเป็นเวลาอย่างน้อย ๗-๑๔ วันก่อนเริ่มดำเนินการทดลอง เพื่อปรับให้คุ้นเคยกับสภาพทดลองก่อน (acclimated) และมีการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงหอยหวานทั้ง ๖ กลุ่ม โดยจะวัดค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำและอุณหภูมิน้ำ (Oxygen meter, YSI Model ๕๕, USA), ความเค็ม (Hand Refractometer, Atago, USA), ความเป็นกรด-ด่าง (pH meter), ความกระด้าง (Standard hydrochloric acid titration method, APHA *et al.*, ๑๙๙๘), แอมโมเนีย (Phenol hypochlorite method, Grasshoff, ๑๙๗๖) และจะทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำตลอดการทดลองทุกๆ วันจนเสร็จสิ้นการทดลอง และทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้ในสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยที่เหลืออีก ๒ ชนิด คือ ข่าและฟ้าทะลายโจร

ในการทดลองหาค่า $LC_{50}$ จะมีการติดตามผลและบันทึกการตายสะสมและพฤติกรรมของหอยหวานในแต่ละระดับความเข้มข้นตลอดในช่วง ๖ ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นทำการบันทึกทุก ๑๒ ชั่วโมงจนทำการทดลองครบ ๙๖ ชั่วโมง ลักษณะที่ควรจะให้ความสนใจเป็นพิเศษ เช่น สังเกตการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่เกิดขึ้นในตัวหอยหวาน พฤติกรรมต่างๆ เช่น การกินอาหาร การเคลื่อนที่และการฝังตัวในทราย เป็นต้น นำเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของหอยหวานไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดที่ทำให้หอยหวานตาย ๕๐ เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา ๙๖ ชั่วโมง และทำการวิเคราะห์ค่า $LC_{50}$ ที่ ๙๖ ชั่วโมง ด้วยโปรแกรมคำนวณทางคอมพิวเตอร์

**<u>ขั้นตอนที่ ๕</u> การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ในหอยหวาน**

การศึกษาวิจัยนี้จำเป็นต้องใช้หอยหวานที่เตรียมไว้ทั้งหมด ๗๒๐ ตัว โดยแบ่งการทดลองออกเป็น ๓ ครั้ง ครั้งละ ๒๔๐ ตัว/สมุนไพร ๑ ชนิด ได้แก่ ใบฝรั่ง ข่าและฟ้าทะลายโจร โดยมีวิธีการดำเนินการ ดังนี้

นำหอยหวานจำนวน ๒๔๐ ตัว มาแบ่งออกเป็น ๘ กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม ๒ กลุ่ม และกลุ่มทดลอง ๖ กลุ่ม โดยจะเลี้ยงหอยหวานในกระบะพลาสติกขนาดความจุ ๕ ลิตร ที่พื้นกระบะทดลองปกคลุมด้วยทรายละเอียดมีความหนาประมาณ ๕.๐ เซนติเมตร ความเค็มของน้ำทะเล ๓๐-๓๒ psu กระบะทดลองทุกใบจะให้อากาศตลอดการทดลองโดยใช้หัวทราย งดให้อาหารหอย ๑ วันก่อนการทดลอง หอยหวานที่ตายใหม่ๆจากการทดลอง จะนำมาเพาะเชื้อแบคทีเรียบน TSA, TCBS และทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) เพื่อยืนยันผล หอยหวานที่รอดจากการทดลองจะไม่นำมาใช้ทดลองอีก

หอยหวานทุกตัวในกลุ่มควบคุมที่ ๑ (negative control) จะใช้ Tuberculin syringe ขนาดเข็ม ๒๗G ความยาว ๐.๕ นิ้ว (๐.๔๕ x ๑๓ mm) ฉีดน้ำเกลือ (sterile normal saline solution) เข้าที่กล้ามเนื้อเท้าหอยหวานตัวละ ๐.๑ มิลลิลิตร และเลี้ยงในน้ำทะเลที่แช่สารสกัดหยาบจากใบฝรั่ง โดยกลุ่มควบคุมที่ ๑ จะเลี้ยงในน้ำทะเลที่ใส่สารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดที่ระดับความเข้มข้นที่มีอัตรารอดสูงสุด ทดลองเลี้ยงทั้งหมด ๓ ซ้ำ ซ้ำละ ๑๐ ตัว ทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา ๑๔ วัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำ ๕๐% แล้วเติมน้ำทะเลและสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งใหม่ทุกวัน ทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้จนครบทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยที่เหลืออีก ๒ ชนิด คือ ข่าและฟ้าทะลายโจร

หอยหวานทุกตัวในกลุ่มควบคุมที่ ๒ (positive control) จะใช้ Tuberculin syringe ขนาดเข็ม ๒๗G ความยาว ๐.๕ นิ้ว (๐.๔๕ x ๑๓ mm) ฉีดแบคทีเรีย (sub lethal dose ๕๐ at ๒๔ hr) เข้าที่กล้ามเนื้อเท้าหอยหวานตัวละ ๐.๑ มิลลิลิตร โดยกลุ่มควบคุมที่ ๒ นี้จะทำการทดลองเลี้ยงหอยหวานในน้ำทะเลที่ไม่ใส่สารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ทดลองเลี้ยงทั้งหมด ๓ ซ้ำ ซ้ำละ ๑๐ ตัว

หอยหวานทุกตัวในกลุ่มทดลอง (treatment) จะใช้ Tuberculin syringe ขนาดเข็ม ๒๗G ความยาว ๐.๕ นิ้ว (๐.๔๕ x ๑๓ mm) ฉีดแบคทีเรีย (sub lethal dose ๕๐ at ๒๔ hr) เข้าที่กล้ามเนื้อเท้าหอยหวานตัวละ ๐.๑ มิลลิลิตร และเลี้ยงในน้ำทะเลที่แช่สารสกัดหยาบจากใบฝรั่ง โดยกลุ่มทดลองจะแบ่งระดับความเข้มข้นย่อยเป็น ๖ กลุ่ม แต่ละกลุ่มมี ๓ ซ้ำ ซ้ำละ ๑๐ ตัว ทำการทดลองเลี้ยงหอยหวานเป็นระยะเวลา ๑๔ วัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำ ๕๐% แล้วเติมน้ำทะเลและสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งใหม่ทุกวัน ทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้จนครบทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยที่เหลืออีก ๒ ชนิด คือ ข่าและฟ้าทะลายโจร

บันทึกการตายสะสมของหอยหวานทุกวัน จนครบ ๑๔ วัน หลังจากนั้นจึงมาคำนวณหาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดในการยับยั้งและป้องกันรักษาโรควิบริโอซิส (vibriosis) ในหอยหวาน โดยนำข้อมูลที่ได้มาทำการแปลงข้อมูลด้วยวิธี Arcsine Transformation ก่อนการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ทดสอบความแตกต่างโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการทดลองที่แตกต่างกันโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น ๙๕ เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS version ๑๓.๐ (อนันต์ชัย เขื่อนธรรม, ๒๕๔๒)

**การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ**

ทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำในการทดลองขั้นตอนที่ ๕ ได้แก่ อุณหภูมิของน้ำ (Temperature) วิเคราะห์โดยใช้ Thermometer ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) โดยใช้ DO meter รุ่น YSI Model ๕๕ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้ pH meter ค่าความเค็ม (Salinity) โดยใช้ Hand Refractometer และตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมี ได้แก่ ค่าความเป็นด่างของน้ำ (Alkalinity) โดยวิธี Titration method ค่าแอมโมเนีย โดยวิธี Phenol hypochlorite method (Grasshoff, ๑๙๗๖) ทำการเก็บตัวอย่างน้ำที่ใช้ทดลองเลี้ยงหอยหวานทุกๆ ๓ วัน ตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยจะนำมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำภายในห้องปฏิบัติการ

**การวิเคราะห์ทางสถิติ**

นำข้อมูลที่คำนวณได้จากการทดลอง และมีการกระจายแบบปกติมาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี One Way Analysis of Variance สำหรับข้อมูลอัตราการรอดทำการแปลงข้อมูลด้วยวิธี Arcsine Transformation ก่อนการวิเคราะห์ เพื่อให้ข้อมูลมีการกระจายแบบปกติ (Normal Distribution) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น ๙๕% การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version ๑๓.๐ (อนันต์ชัย, ๒๕๔๒)

# ผลการวิจัย

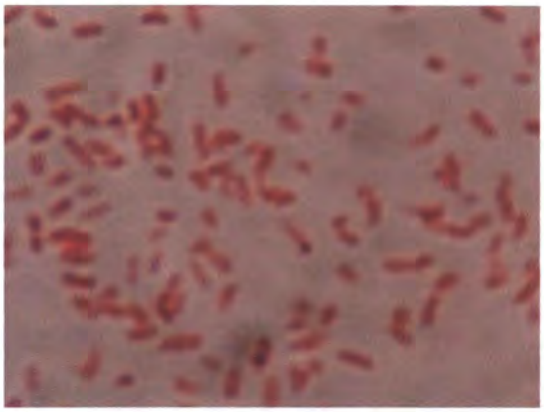
## ผลการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในหอยหวานปากบวมแดง

ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* จากหอยหวานที่มีอาการป่วยที่ได้จากซันเซ็ทฟาร์มหอยหวาน จังหวัดชลบุรี จำนวน ๑๐ ตัวอย่าง ซึ่งการทดลองนี้ต้องการแบคทีเรีย *V. alginolyticus* เนื่องจากมีความรุนแรงของเชื้อมากที่สุดที่ทำให้หอยหวานเกิดโรคปากบวมได้ โดยทำการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากบริเวณปาก (proboscis) ของหอยหวานที่มีอาการป่วยปากบวมแดง (ภาพที่ ๖) จากนั้นทำการพิสูจน์เชื้อวิบริโอที่แยกได้เพื่อจำแนกชนิด (Identification) โดยการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test) การย้อมติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อแบคทีเรีย (Gram's stain and morphology) ความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆ ทั้ง ๒๐ ชนิด โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API ๒๐E (bioMérieux, France) (ภาพที่ ๗) เพื่อพิสูจน์และยืนยันว่าเป็นเชื้อ *V. alginolyticus* ชนิดที่ต้องการ โดยเทียบผลกับตารางที่แนบมาพร้อมกับชุดทดสอบสำเร็จรูป แสดงผลไว้ในตารางที่ ๒

เมื่อทำการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* แล้ว พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีลักษณะรูปร่างท่อนสั้นโค้ง (curved rod หรือ comma shape) ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ ๘) สามารถเคลื่อนที่ได้และผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase) ได้ เมื่อทำการทดสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ด้วยน้ำยา Oxidase reagent เชื้อจะติดสีม่วงเข้ม (ภาพที่ ๙) และเมื่อเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar (Difco, USA) พบว่า โคโลนีมีลักษณะกลม มีสีเหลือง ขอบเรียบ (ภาพที่ ๑๐) เนื่องจากการหมักย่อยน้ำตาลซูโครส จากการจำแนกเชื้อ *V. alginolyticus* จากหอยหวานที่มีอาการป่วยสามารถจำแนกได้ทั้งหมด ๒ isolates ซึ่งมี % identification เท่ากับร้อยละ ๙๗.๘ และ ๙๘.๘ ตามลำดับ (ตารางที่ ๒)

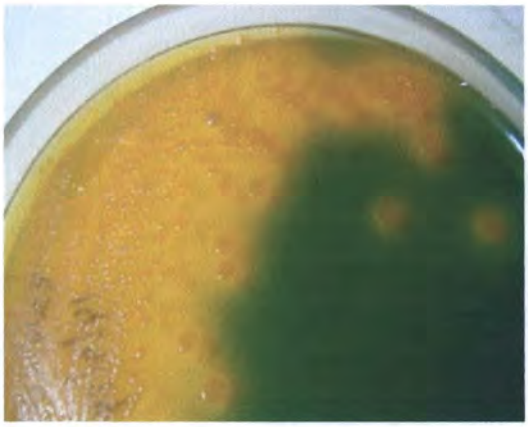
ภาพที่ ๖ หอยหวานมีอาการป่วยปากบวมแดง ที่นำมาแยกเชื้อแบคทีเรีย

ภาพที่ ๗ ชุดทดสอบ API ๒๐E ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆของเชื้อวิบริโอ



ภาพที่ ๘ ผลการย้อมติดสีแกรมของ *V. alginolyticus* ซึ่งติดสีแดง มีรูปร่างท่อนสั้นโค้ง

ภาพที่ ๙ *V. alginolyticus* ผลิตเอนไซม์ออกซิเดสได้ เมื่อทำการทดสอบจะติดสีม่วงเข้ม



ภาพที่ ๑๐ *V. alginolyticus* โคโลนีมีสีเหลืองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar มีลักษณะกลม ขอบเรียบ

**ตารางที่ ๒** ผลการแยกชนิดเชื้อ *V. alginolyticus* จากหอยหวานป่วย โดยทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API ๒๐ E

| การทดสอบชีวเคมี | *V. alginolyticus* | |
|---|---|---|
| | Isolate ๑ | Isolate ๒ |
| TCBS Agar | Y | Y |
| Gram stain | - | - |
| Motility | + | + |
| Shape | Short | Short rod |
| Oxidase test | + | + |
| ONPG test | - | - |
| ADH (Arginine Dihydolase) | - | - |

| การทดสอบชีวเคมี | *V. alginolyticus* | |
|---|---|---|
| | Isolate ๑ | Isolate ๒ |
| LDC (Lysine Decarboxylase) | + | + |
| ODC (Ornithine Decarboxylase) | + | + |
| CIT (Citrate utilization) | + | + |
| $H_2S$ (Sulfide production) | - | - |
| URE (Urea hydrolysis) | - | - |
| TDA (Trytophane Deaminase) | - | - |
| IND (Indole production) | + | + |
| VP (Voges Proskauer) | - | - |
| GEL (Gelatin hydrolysis) | - | + |
| ARA (Arabinose Fermentation) | - | - |
| GLU (Glucose Fermentation) | + | + |
| MAN (Mannitol Fermentation) | + | + |
| INO (Inosital Fermentation) | - | - |
| SOR (Sorbitol Fermentation) | - | - |
| RHA (Rhamnose Fermentation) | - | - |
| SAC (Sucrose Fermentation) | + | + |
| MEL (Melibiose Fermentation) | - | - |
| AMY (Amygdalin Fermentation) | + | + |
| **% Identification** | ๙๘.๘ | ๙๗.๘ |

+ = positive reaction, - = negative reaction

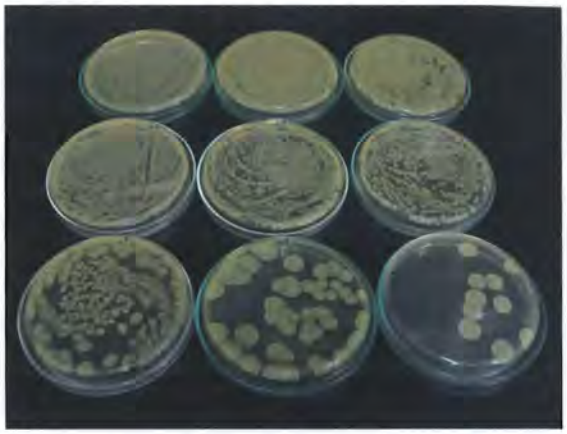
เมื่อได้เชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกบริสุทธิ์แล้ว จึงนำมาคำนวณหากราฟมาตรฐาน โดยทำการเจือจางเชื้อแบบ ๑๐ เท่า (serial ๑๐ fold dilution) ใช้น้ำเกลือ (NaCl) ๑.๕% ทั้งหมด ๙ ระดับความเข้มข้น (ภาพที่ ๑๑) แล้วดูดสารละลายเชื้อจากแต่ละหลอดมา ๐.๑ มิลลิลิตร มาเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA + ๑.๕% NaCl ด้วยวิธี Spread plate technique (ภาพที่ ๑๒) นำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๘-๒๔ ชั่วโมง เพื่อทำการนับจำนวนเชื้อทั้งหมดเป็นหน่วย Colony forming unit/ml. (CFU/ml) พร้อมกับทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density, OD) ที่ความยาวคลื่น ๖๐๐ นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer GENESYS ๒๐ Thermo spectronic, Model ๔๐๐๑/๔, USA. เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหากราฟมาตรฐาน โดยสมการของกราฟมาตรฐานของเชื้อ *V. alginolyticus* ที่คำนวณได้จากการศึกษานี้มีค่าดังนี้ (ภาคผนวก ข.)

$y = ๑.๘๖๘๒x + ๕.๖๑๗๑,$ $R^2 = ๐.๙๑๐๕$

ค่า x หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสง (OD)
ค่า y หมายถึง ค่า log ของความเข้มข้นของแบคทีเรีย

ซึ่งสามารถใช้สมการของกราฟมาตรฐานที่ได้นี้ มาใช้ในการคำนวณความเข้มข้นของเชื้อ *V. alginolyticus* ในแต่ละการทดลองได้

ภาพที่ ๑๑ ทำการเจือจางเชื้อ *V. alginolyticus* แบบ ๑๐ เท่า ในหลอดทดลอง



ภาพที่ ๑๒ เพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA + ๑.๕% NaCl ด้วยวิธี Spread plate technique

<u>การตรวจวิเคราะห์ทางพฤษเคมีของสมุนไพรไทย</u>

เพื่อหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อวิบริโอ โดยใช้เครื่องมือพิเศษ เช่น GC-MS, HPLC ในการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดและปริมาณความชื้น ซึ่งส่งตรวจที่สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพมหานคร, คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์

มหาวิทยาลัย และบริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง จำกัด กรุงเทพมหานคร เพื่อบ่งบอกถึงสาระสำคัญในสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ได้แก่ ฟ้าทะลายโจรผง ข่าผง และใบฝรั่งผง

จากการวิเคราะห์สมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด พบว่า ฟ้าทะลายโจรผงมีปริมาณความชื้น ๗.๗ % ซึ่งไม่เกินข้อกำหนดมาตรฐาน (ไม่เกิน ๑๑.๐ % โดยน้ำหนัก) ส่วนข่าผงและใบฝรั่งผงมีปริมาณความชื้น ๙.๐๑ และ ๑๑.๓๕ % ตามลำดับ ซึ่งยังไม่มีการรายงานค่ามาตรฐานหรือข้อกำหนดที่ชัดเจน ดังแสดงในตารางที่ ๓

**ตารางที่ ๓** ปริมาณความชื้นที่วิเคราะห์ในสมุนไพรไทยผงทั้ง ๓ ชนิด

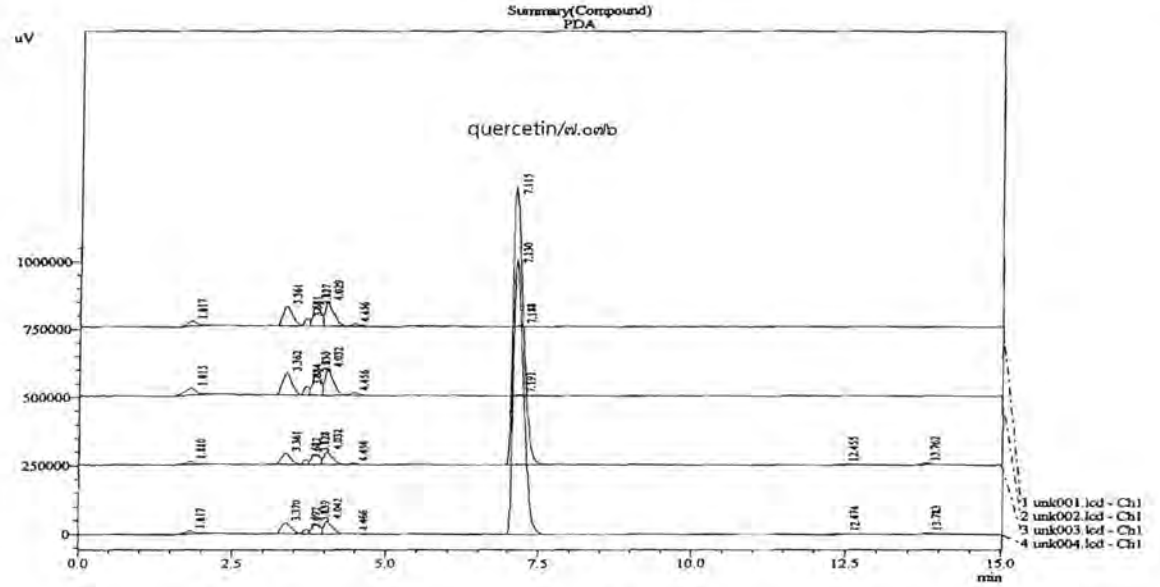
| สมุนไพรไทย | ลักษณะ | ปริมาณความชื้น (%) | ค่ามาตรฐาน/วิธีการวิเคราะห์ |
|---|---|---|---|
| ฟ้าทะลายโจรผง | ผงละเอียดสีเขียว | ๗.๗ | ไม่เกิน ๑๑.๐ % โดยน้ำหนัก / SOP ๑๒ ๐๒ ๐๐๒ based on THP I, ๑๙๙๘ |
| ข่าผง | ผงหยาบสีชมพู | ๙.๐๑ | Loss on drying ตามวิธีการมาตรฐานของศูนย์นวัตกรรมทางยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพ |
| ใบฝรั่งผง | ผงหยาบสีเขียว | ๑๑.๓๕ | Loss on drying ตามวิธีการมาตรฐานของศูนย์นวัตกรรมทางยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพ |

<u>การหาสารสำคัญในสมุนไพรผงทั้ง ๓ ชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อวิบริโอ โดยใช้เครื่องมือพิเศษ</u> ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ ดังนี้

ฟ้าทะลายโจรผง มีปริมาณแลคโตนรวม คำนวณเป็นแอนโดรกราโฟไลด์ มีค่า ๗.๕ % โดยน้ำหนัก ซึ่งไม่เกินข้อกำหนดมาตรฐาน (ไม่น้อยกว่า ๖.๐ % โดยน้ำหนัก) ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี SOP ๑๒ ๐๒ ๐๐๒ based on THP I, ๑๙๙๘

ข่าผง มีปริมาณ Isoeugenol เท่ากับ ๑,๐๕๘.๗๔ มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งวิเคราะห์ตามวิธีของ In house method based on Journal of Aquaculture ๒๙๖ (๒๐๐๙) ๒๐๐ – ๒๐๖ by HPLC-UV

ใบฝรั่งผง มีปริมาณสารฟีนอลิครวม (Total phenolic compound) เท่ากับ ๕๕.๕ มิลลิกรัม GAE/กรัม โดยน้ำหนักแห้ง มีปริมาณน้ำในใบฝรั่ง เท่ากับ ๑๐.๓๓ % และตรวจวิเคราะห์พบว่ามีสาร Quercetin ในใบฝรั่ง โดยวิเคราะห์โครงสร้างด้วยโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS (ภาพที่ ๑๓) ซึ่งมีวิธีการวิเคราะห์ดังรายงานในเอกสารการวิจัยของ Masatake Toyada, *et al.*, ๑๙๙๗ โดยสามารถดูรายละเอียดวิธีการวิเคราะห์ได้ในภาคผนวก ค.




ภาพที่ ๑๓ แสดงโครมาโตแกรมของสาร Quercetin ในใบฝรั่งผง จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

**ผลการศึกษาในแต่ละขั้นตอน ดังนี้**

**<u>ขั้นตอนที่ ๑</u> การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่ทำให้เกิดโรคในหอยหวาน (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) โดยวิธี Broth Dilution Method**

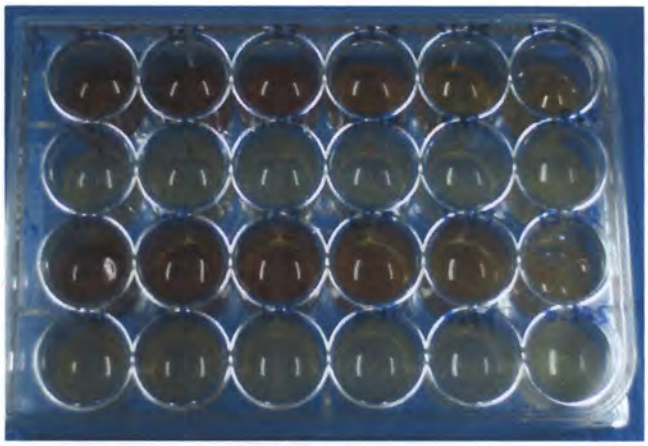
ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร ข่า และใบฝรั่ง ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน ได้แก่ น้ำกลั่น เอธานอล ๙๕% และเอธานอล ๑๐๐% ต่อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* โดยการหาค่า MIC ด้วยวิธี Broth Dilution Method ทำการเจือจางสารละลายจากสารสกัดสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดแบบ ๒-fold dilution ในถาดหลุม ๙๖ หลุม (๙๖-well plate) (ภาพที่ ๑๔) ได้สารละลายสารสกัดสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้น ดังนี้ ๗๐๐.๐๐, ๓๕๐.๐๐, ๑๗๕.๐๐, ๘๗.๕๐, ๔๓.๗๕, ๒๑.๘๘, ๑๐.๙๔, ๕.๔๗, ๒.๗๓, ๑.๓๗, ๐.๖๘, ๐.๓๔ และ ๐.๑๗ มิลลิกรัม/ลิตร กำหนดค่า MIC คือ ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดของหลอดทดลองที่ไม่มีความขุ่น (Oonmetta-aree *et al.*, ๒๐๐๕) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ น้ำกลั่นและยาออกซิเตตร้าซัยคลิน

จากการทดสอบพบว่า สารสกัดสมุนไพรไทยที่สกัดด้วยน้ำกลั่น ด้วยวิธีการต้มนั้น สารสกัดใบฝรั่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *V. alginolyticus* สูงสุด (MIC = ๒.๗๓ mg/L) รองลงมาคือ สารสกัดฟ้าทะลายโจร (MIC = ๕.๔๗ mg/L) และสารสกัดข่า (MIC = ๑๐.๙๔ mg/L)

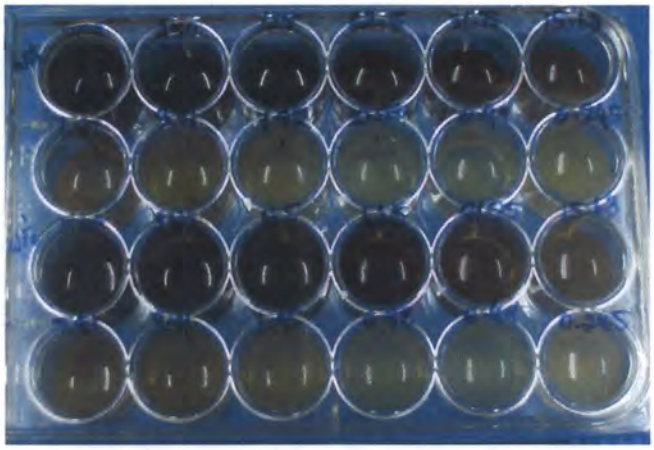
ส่วนสารสกัดสมุนไพรไทยที่สกัดด้วยน้ำกลั่น ด้วยเครื่องระเหย Rotary evaporator นั้น พบว่า สารสกัดข่าและสารสกัดใบฝรั่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *V. alginolyticus* สูงสุด (MIC = ๑๐.๙๔ และ ๑๐.๙๔ mg/L ตามลำดับ) รองลงมาคือ สารสกัดฟ้าทะลายโจร (MIC = ๒๑.๘๘ mg/L)

ส่วนสารสกัดสมุนไพรไทยที่สกัดด้วยเอธานอล ๙๕% ด้วยเครื่องระเหย Rotary evaporator นั้น พบว่า สารสกัดข่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *V. alginolyticus* สูงสุด (MIC = ๒๑.๘๘ mg/L) รองลงมาคือ สารสกัดฟ้าทะลายโจรและสารสกัดใบฝรั่ง (MIC = ๑๗๕.๐๐ และ ๑๗๕.๐๐ mg/L ตามลำดับ)

ส่วนสารสกัดสมุนไพรไทยที่สกัดด้วยเอธานอล ๑๐๐% ด้วยเครื่องระเหย Rotary evaporator นั้น พบว่า สารสกัดข่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *V. alginolyticus* สูงสุด (MIC = ๒.๗๓ mg/L) รองลงมาคือ สารสกัดฟ้าทะลายโจรและสารสกัดใบฝรั่ง (MIC = ๕.๔๗ และ ๕.๔๗ mg/L ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ ๔



ก. ฟ้าทะลายโจร



ข. ข่า

ค. ใบฝรั่ง

ภาพที่ ๑๔ หาค่า MIC ในถาดหลุม ๙๖ หลุม (๙๖-well plate) โดยดูจากความขุ่นใสที่เกิดขึ้นในหลุม

**<u>ขั้นตอนที่ ๒</u> การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดในการกำจัดแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่ทำให้เกิดโรคในหอยหวาน (Minimal Bactericidal Concentration: MBC) โดยวิธี Total plate count**

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร ข่า และใบฝรั่ง ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน ได้แก่ น้ำกลั่น เอธานอล ๙๕% และเอธานอล ๑๐๐% ต่อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ซึ่งการหาค่า MBC จะทำต่อจากการทดลองหาค่า MIC โดยดูหลุมที่ใสไม่เกิดความขุ่น และหลุมที่มีความขุ่นสุดท้ายที่มีความเข้มข้นต่อจากหลุมที่ใส มาทดสอบหาค่า MBC ด้วยวิธี Total plate count (ภาพที่ ๑๕) ค่า MBC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้แบคทีเรียตาย ๙๙.๙% หรือมากกว่านั้น (MBC < ๒๐ cfu/๐.๑ มิลลิลิตร) (ธิดาพร ฉวีภักดิ์ และคณะ, ๒๕๕๐)

จากการทดสอบพบว่า สารสกัดสมุนไพรไทยที่สกัดด้วยน้ำกลั่น ด้วยวิธีการต้มนั้น สารสกัดใบฝรั่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรีย *V. alginolyticus* สูงสุด (MBC = ๒๑.๘๘ mg/L) รองลงมาคือ สารสกัดข่า (MBC = ๔๓.๗๕ mg/L) และสารสกัดฟ้าทะลายโจร (MBC = ๘๗.๕๐ mg/L)

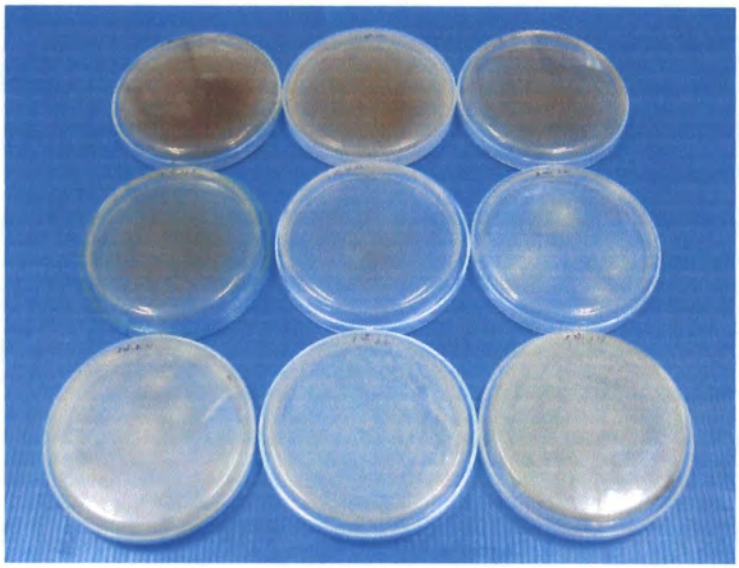
สารสกัดสมุนไพรไทยที่สกัดด้วยน้ำกลั่น ด้วยเครื่องระเหย Rotary evaporator พบว่า สารสกัดข่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรีย *V. alginolyticus* สูงสุด (MBC = ๔๓.๗๕ mg/L) รองลงมาคือ สารสกัดฟ้าทะลายโจรและสารสกัดใบฝรั่ง (MBC = ๑๗๕.๐๐ และ ๑๗๕.๐๐ mg/L ตามลำดับ)

สารสกัดสมุนไพรไทยที่สกัดด้วยเอธานอล ๙๕% ด้วยเครื่องระเหย Rotary evaporator พบว่า สารสกัดข่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรีย *V. alginolyticus* สูงสุด (MBC = ๑๗๕.๐๐ mg/L) รองลงมาคือ สารสกัดฟ้าทะลายโจรและสารสกัดใบฝรั่ง (MBC = ๗๐๐.๐๐ และ ๗๐๐.๐๐ mg/L ตามลำดับ)

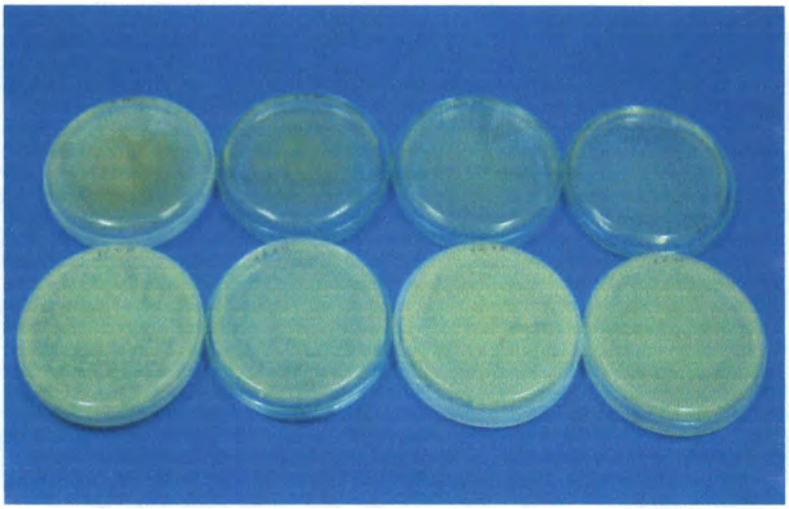
สารสกัดสมุนไพรไทยที่สกัดด้วยเอธานอล ๑๐๐% ด้วยเครื่องระเหย Rotary evaporator พบว่า สารสกัดข่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรีย *V. alginolyticus* สูงสุด (MBC = ๒๑.๘๘ mg/L) รองลงมาคือ สารสกัดฟ้าทะลายโจรและสารสกัดใบฝรั่ง (MBC = ๗๐๐.๐๐ และ ๗๐๐.๐๐ mg/L ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ ๔

ส่วนชุดควบคุมที่ใส่น้ำกลั่นนั้นไม่สามารถยับยั้งและกำจัดแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ได้ แต่ในชุดควบคุมที่ใส่ยาออกซิเตตร้าซัยคลินสามารถยับยั้งและกำจัดแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ได้ โดยเมื่อนำมาหาค่า MBC ด้วยวิธี Total plate count พบว่าเชื้อแบคทีเรียไม่ขึ้นบน TSA agar

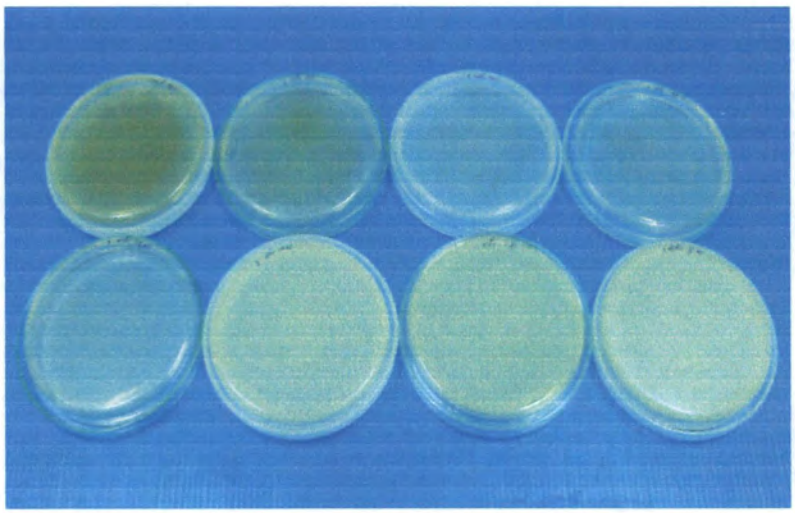
จากผลการทดสอบพบว่า สารสกัดสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดที่สกัดด้วยน้ำกลั่น โดยวิธีการต้มจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ได้สูงสุด ดังนั้นในการทดลองขั้นตอนที่ ๔ และ ๕ จึงทำการศึกษาเฉพาะสารสกัดสมุนไพรไทยที่สกัดด้วยน้ำกลั่น โดยวิธีการต้มเท่านั้น



ก. ฟ้าทะลายโจร



ข. ข่า



ค. ใบฝรั่ง

ภาพที่ ๑๕ หาค่า MBC ด้วยวิธี Spread plate technique เพื่อนับจำนวนโคโลนี

**ตารางที่ ๔** ค่า MIC/MBC ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายและวิธีที่แตกต่างกัน

| สารสกัดหยาบสมุนไพร | ตัวทำละลาย/วิธีการสกัด | ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถยับยั้งและกำจัดเชื้อ (MIC/MBC) | |
|---|---|---|---|
| | | MIC (mg/L) | MBC (mg/L) |
| ฟ้าทะลายโจร | น้ำกลั่น / ต้ม | ๕.๔๗ | ๘๗.๕๐ |
| | น้ำกลั่น / evaporate | ๒๑.๘๘ | ๑๗๕.๐๐ |
| | เอธานอล ๙๕% / evaporate | ๑๗๕.๐๐ | ๗๐๐.๐๐ |
| | เอธานอล ๑๐๐% / evaporate | ๕.๔๗ | ๗๐๐.๐๐ |
| ข่า | น้ำกลั่น / ต้ม | ๑๐.๙๔ | ๔๓.๗๕ |
| | น้ำกลั่น / evaporate | ๑๐.๙๔ | ๔๓.๗๕ |
| | เอธานอล ๙๕% / evaporate | ๒๑.๘๘ | ๑๗๕.๐๐ |
| | เอธานอล ๑๐๐% / evaporate | ๒.๗๓ | ๒๑.๘๘ |
| ใบฝรั่ง | น้ำกลั่น / ต้ม | ๒.๗๓ | ๒๑.๘๘ |
| | น้ำกลั่น / evaporate | ๑๐.๙๔ | ๑๗๕.๐๐ |
| | เอธานอล ๙๕% / evaporate | ๑๗๕.๐๐ | ๗๐๐.๐๐ |
| | เอธานอล ๑๐๐% / evaporate | ๕.๔๗ | ๗๐๐.๐๐ |

**ขั้นตอนที่ ๓** การเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซิส (vibriosis) และหาค่า Median Lethal Dose at ๒๔ hr ($LD_{๕๐}$ at ๒๔ hr)

ผลการทดลองเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีส (vibriosis) ในหอยหวานปกติที่มีขนาดความยาวเปลือกเฉลี่ย ๓.๒๕ ± ๐.๐๕ เซนติเมตร ความกว้างเปลือกเฉลี่ย ๒.๑๑ ± ๐.๐๓ เซนติเมตร และมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย ๘.๒๖ ± ๐.๒๙ กรัม โดยทำการศึกษาความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่ทำให้หอยหวานตายลง ๕๐ เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา ๒๔ ชั่วโมง (Median Lethal Dose at ๒๔ hr: $LD_{๕๐}$ at ๒๔ hr) ด้วยวิธีการฉีดเชื้อเข้ากล้ามเนื้อเท้าของหอยหวาน (Intraperitoneal injection; IP) พบว่า มีค่า $LD_{๕๐}$ เท่ากับ ๑.๔๒๖ x ๑๐$^{๕}$ cfu/ml (ภาคผนวก ง.) ซึ่งหอยหวานที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีส (vibriosis) ด้วยแบคทีเรีย *V. alginolyticus* จะมีอาการปาก (proboscis) บวมแดง (ภาพที่ ๑๖)

ภาพที่ ๑๖ ทดลองเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีส (vibriosis) ในหอยหวาน ซึ่งจะเกิดอาการปากบวมแดง

**<u>ขั้นตอนที่ ๔</u> การทดสอบหาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดที่ทำให้หอยหวานตาย ๕๐ เปอร์เซ็นต์ (Median Lethal Concentration: $LC_{50}$)**

ผลการทดสอบหาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร ข่า และใบฝรั่งที่สกัดด้วยน้ำ โดยนำหอยหวานที่มีขนาดความยาวเปลือกเฉลี่ย ๒.๙๔ ± ๐.๐๒ เซนติเมตร ความกว้างเปลือกเฉลี่ย ๒.๐๔ ± ๐.๐๑ เซนติเมตร และมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย ๖.๐๘ ± ๐.๐๘ กรัม มาทดลองเลี้ยงในสารสกัดหยาบสมุนไพรไทยที่ความเข้มข้นต่างกัน ๑๐ ระดับ ดังนี้ ๙,๖๐๐, ๔,๘๐๐, ๒,๔๐๐, ๑,๒๐๐, ๖๐๐, ๓๐๐, ๑๕๐, ๗๕, ๓๗.๕๐ และ ๑๘.๗๕ มิลลิกรัม/ลิตร และหาระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดที่ทำให้หอยหวานตาย ๕๐ เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา ๙๖ ชั่วโมง โดยนำอัตราการตาย (%) และค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสมุนไพรไทย (มิลลิกรัม/ลิตร) มาสร้างกราฟแสดงแนวโน้มการตายของหอยหวานทดลอง เพื่อหาค่า $LC_{50}$ ๙๖ hr จากความเข้มข้นของแต่ละสารสกัดที่ทำให้หอยหวานตายครึ่งหนึ่ง (๕๐ เปอร์เซ็นต์) ภายใน ๙๖ ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ ๕

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบสมุนไพรไทยต่อหอยหวาน พบว่า หอยหวานที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรจะมีอาการกระวนกระวาย และดิ้นไปดิ้นมาทันทีหลังจากแช่ลงในสารสกัด โดยหอยหวานในสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ ๑,๒๐๐ – ๙,๖๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร จะเริ่มมีการตายประมาณชั่วโมงที่ ๒ และในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ ๒,๔๐๐ – ๙,๖๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร หอยหวานยังคงมีการตายอย่างต่อเนื่องจนตายหมดภายใน ๒๔ ชั่วโมง ส่วนในสารสกัดความเข้มข้น ๑,๒๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร หอยหวานจะมีการตายอย่างต่อเนื่องจนตายหมดภายใน ๙๖ ชั่วโมง เมื่อทดสอบครบ ๙๖ ชั่วโมง หอยหวานที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรที่ระดับความเข้มข้น ๖๐๐.๐๐, ๓๐๐.๐๐, ๑๕๐.๐๐, ๗๕.๐๐, ๓๗.๕๐ และ ๑๘.๗๕ มิลลิกรัม/ลิตร มีอัตราการตายสะสมเท่ากับ ๘๐, ๓๓, ๑๗, ๑๗, ๑๓ และ ๑๐ เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่า $LC_{50}$ ๙๖ hr เท่ากับ ๓๘๕.๒๕ มิลลิกรัม/ลิตร (ภาพที่ ๑๗) (ภาคผนวก จ. ตารางที่ ๑)

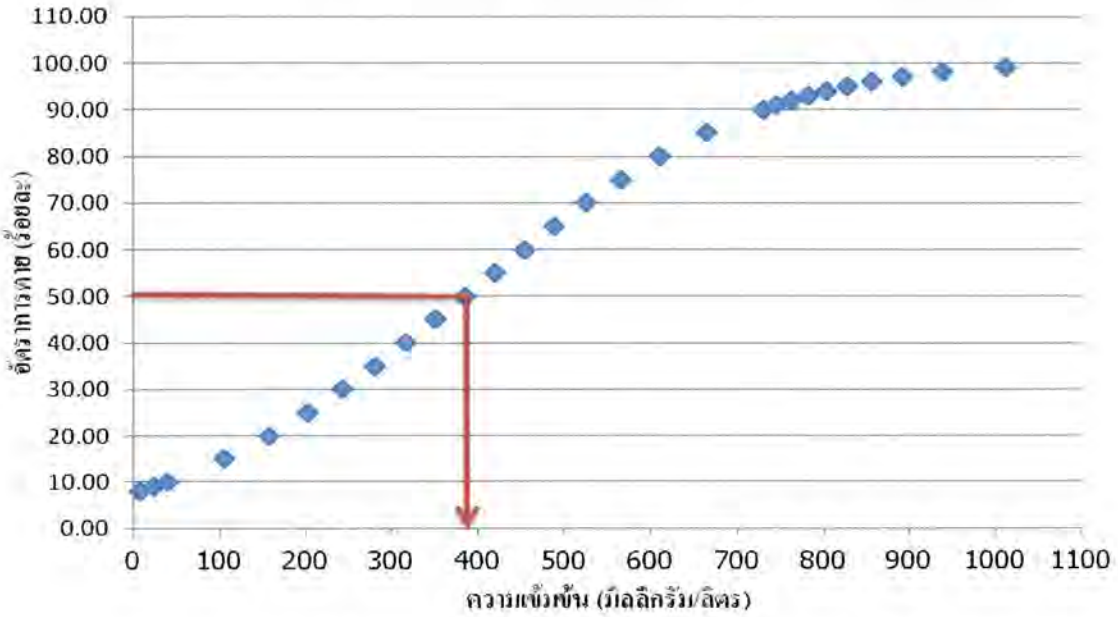
หอยหวานที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบข่าจะมีอาการกระวนกระวาย และดิ้นไปดิ้นมาทันทีหลังจากแช่ลงในสารสกัด โดยหอยหวานไม่มีการตายภายใน ๔ ชั่วโมงแรกหลังจากแช่สารสกัด หอยหวานที่แช่ในสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น ๔,๘๐๐ – ๙,๖๐๐ มิลลิกรัม/ลิตรขึ้นไป จะเริ่มมีการตายประมาณชั่วโมงที่ ๕ และยังคงมีการตายอย่างต่อเนื่องจนตายหมดภายใน ๒๔ ชั่วโมง ส่วนในระดับความเข้มข้น ๒,๔๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร หอยหวานยังคงมีการตายอย่างต่อเนื่องจนตายหมดภายใน ๔๘ ชั่วโมง ส่วนในสารสกัดความเข้มข้น

๓๐๐ - ๑,๒๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร หอยหวานจะมีการตายอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ ๗๒ และหลังจากชั่วโมงที่ ๗๒ หอยหวานจะหยุดตาย เมื่อทดสอบครบ ๙๖ ชั่วโมง หอยหวานที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบข่าที่ระดับความเข้มข้น ๑,๒๐๐, ๖๐๐, ๓๐๐, ๑๕๐, ๗๕, ๓๗.๕ และ ๑๘.๗๕ มิลลิกรัม/ลิตร มีอัตราการตายสะสมเท่ากับ ๗๓, ๒๓, ๓๐, ๑๗, ๒๐, ๑๗ และ ๑๐ เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่า $LC_{50}$ ๙๖ hr เท่ากับ ๘๐๙.๓๙ มิลลิกรัม/ลิตร (ภาพที่ ๑๘) (ภาคผนวก จ. ตารางที่ ๒)

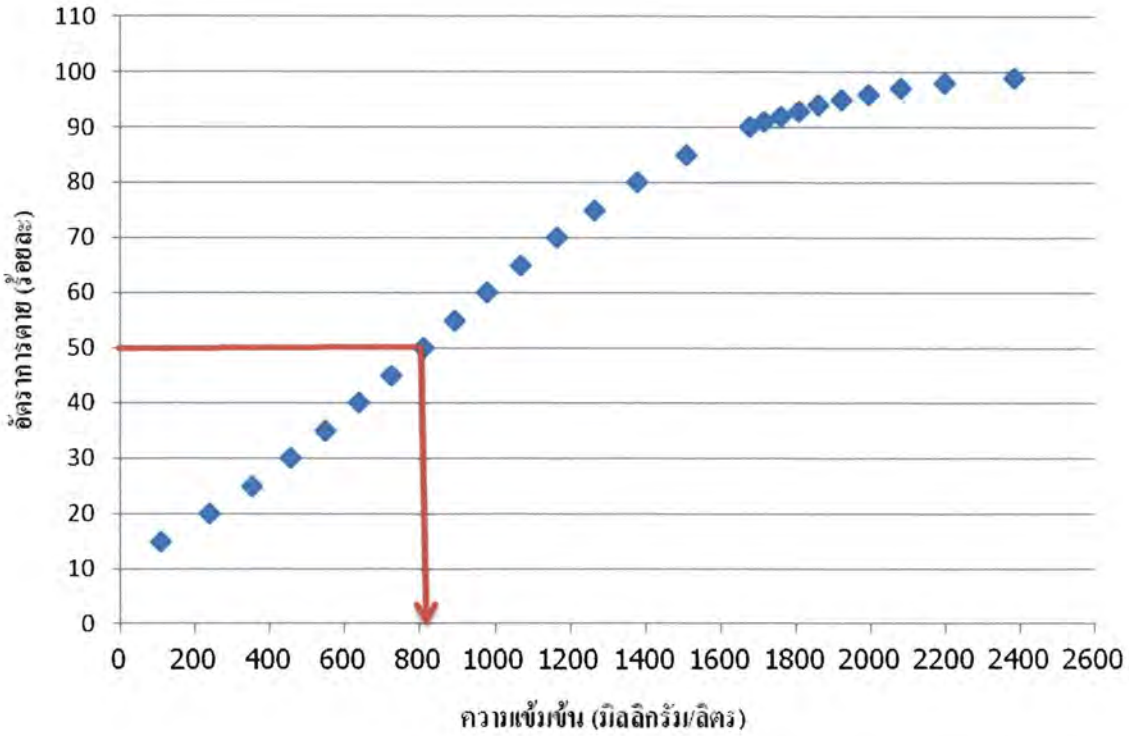
หอยหวานที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบใบฝรั่งจะมีอาการกระวนกระวาย และดิ้นไปดิ้นมาทันทีหลังจากแช่ลงในสารสกัด โดยหอยหวานไม่มีการตายภายใน ๔ ชั่วโมงแรกหลังจากแช่สารสกัด หอยหวานที่แช่ในสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น ๙,๖๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร จะเริ่มมีการตายประมาณชั่วโมงที่ ๖ และยังคงมีการตายอย่างต่อเนื่องจนตายหมดภายใน ๒๔ ชั่วโมง เมื่อทดสอบครบ ๙๖ ชั่วโมง หอยหวานที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบใบฝรั่งที่ระดับความเข้มข้น ๔,๘๐๐, ๒,๔๐๐, ๑,๒๐๐, ๖๐๐, ๓๐๐, ๑๕๐, ๗๕, ๓๗.๕ และ ๑๘.๗๕ มิลลิกรัม/ลิตร มีอัตราการตายสะสมเท่ากับ ๖๓, ๔๗, ๔๓, ๑๗, ๒๓, ๑๗, ๑๗, ๑๐ และ ๑๓ เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่า $LC_{50}$ ๙๖ hr เท่ากับ ๓,๐๑๗.๑๑ มิลลิกรัม/ลิตร (ภาพที่ ๑๙) (ภาคผนวก จ. ตารางที่ ๓)

**ตารางที่ ๕** ค่า $LC_{50}$ ๙๖ hr จากความเข้มข้นของแต่ละสารสกัดสมุนไพรที่ทำให้หอยหวานตายครึ่งหนึ่ง (๕๐ เปอร์เซ็นต์) ภายใน ๙๖ ชั่วโมง

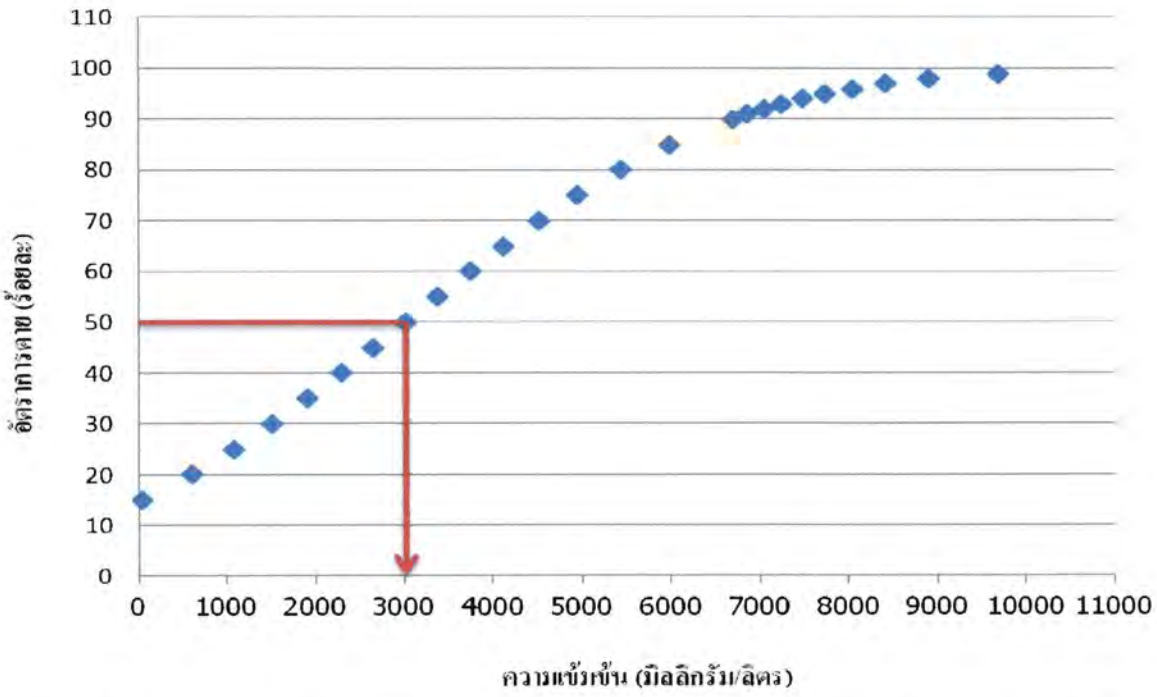
| **สารสกัดหยาบสมุนไพรสกัดด้วยน้ำ** | $LC_{50}$ ๙๖ hr **(มิลลิกรัม/ลิตร)** |
|---|---|
| ฟ้าทะลายโจร | ๓๘๕.๒๕ |
| ข่า | ๘๐๙.๓๙ |
| ใบฝรั่ง | ๓,๐๑๗.๑๑ |




ภาพที่ ๑๗ กราฟแสดงแนวโน้มการตายของหอยหวานทดลองในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรที่ทำให้หอยหวานตาย ๕๐ เปอร์เซ็นต์ ภายใน ๙๖ ชั่วโมง




ภาพที่ ๑๘ กราฟแสดงแนวโน้มการตายของหอยหวานทดลองในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบข่าที่ทำให้หอยหวานตาย ๕๐ เปอร์เซ็นต์ ภายใน ๙๖ ชั่วโมง




ภาพที่ ๑๙ กราฟแสดงแนวโน้มการตายของหอยหวานทดลองในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบฝรั่งที่ทำให้หอยหวานตาย ๕๐ เปอร์เซ็นต์ ภายใน ๙๖ ชั่วโมง

**<u>ขั้นตอนที่ ๕</u> การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ในหอยหวาน**

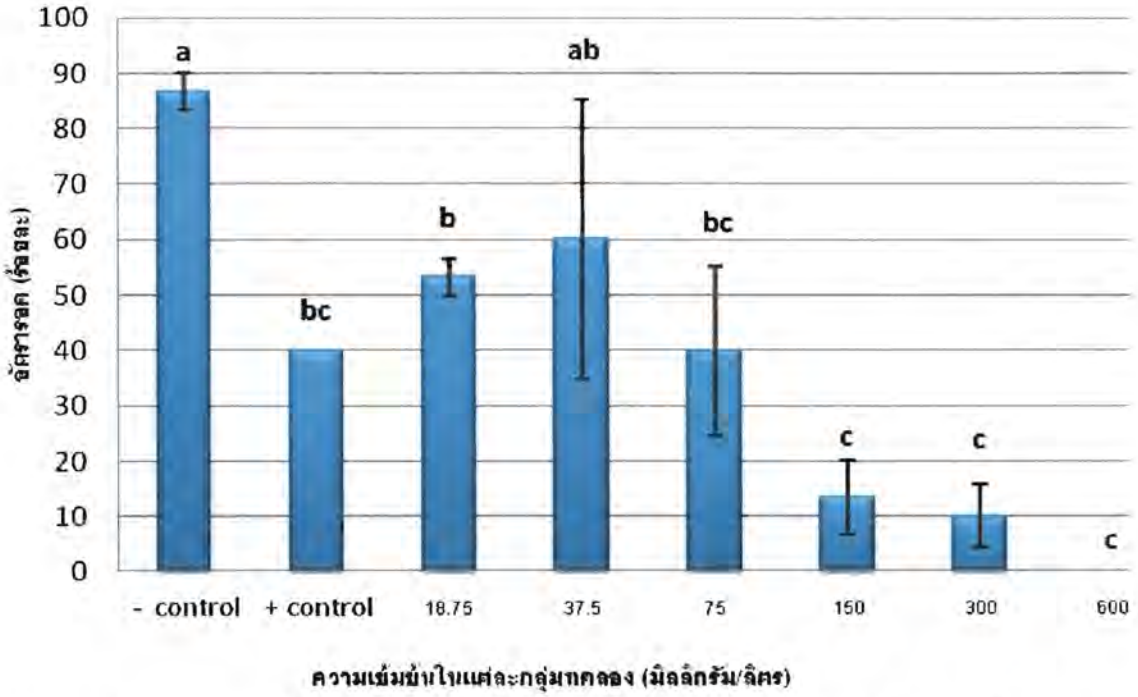
ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร ข่า และใบฝรั่ง ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ในหอยหวานด้วยวิธีการแช่เป็นระยะเวลา ๑๔ วัน โดยหอยหวานที่นำมาทดลองมีขนาดความยาวเปลือกเฉลี่ย ๒.๗๕ ± ๐.๐๒ เซนติเมตร ความกว้างเปลือกเฉลี่ย ๑.๖๗ ± ๐.๐๑ เซนติเมตร และมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย ๔.๐๐ ± ๐.๐๙ กรัม จากนั้นฉีดเชื้อเข้ากล้ามเนื้อเท้าของหอยหวานที่ค่า $LD_{50}$ ซึ่งมีค่าเท่ากับ ๑.๔๒๖ x $๑๐^{๖}$ cfu/ml โดยกลุ่มทดลองประกอบด้วย (๑.) ชุดควบคุมไม่ใส่เชื้อ แต่แช่สารสกัดหยาบสมุนไพร (ชุดควบคุมลบ: negative control) (๒.) ชุดควบคุมใส่เชื้อ แต่ไม่แช่สารสกัดหยาบสมุนไพร (ชุดควบคุมบวก: positive control) (๓.) ชุดทดลองใส่เชื้อ และแช่รักษาด้วยสารสกัดหยาบสมุนไพรไทยที่ความเข้มข้นทั้ง ๖ ระดับ ทำการทดลองเลี้ยงหอยหวานในสารสกัดหยาบสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดเป็นระยะเวลา ๑๔ วัน เฝ้าสังเกตการณ์และบันทึกการตายสะสมของหอยหวานทุกวัน จนครบ ๑๔ วัน หลังจากนั้นจึงมาคำนวณหาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดในการยับยั้งและป้องกันรักษาโรควิบริโอซิส (vibriosis) ในหอยหวาน โดยทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ ๖ และภาพที่ ๒๐ – ๒๒ (ภาคผนวก ฉ.)

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันทั้ง ๖ ระดับ พบว่า ชุดควบคุมลบมีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุมบวกและชุดการทดลองที่ระดับความเข้มข้น ๑๘.๗๕, ๗๕.๐๐, ๑๕๐.๐๐, ๓๐๐.๐๐ และ ๖๐๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<๐.๐๕$) เนื่องจากมีจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* น้อยกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ ๘๖.๖๗ ± ๓.๓๓ โดยหอยหวานที่ทดลองเลี้ยงในสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรที่ระดับความเข้มข้น ๑๘.๗๕, ๓๗.๕๐, ๗๕.๐๐, ๑๕๐.๐๐, ๓๐๐.๐๐ และ ๖๐๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร มีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยร้อยละ ๕๓.๓๓ ± ๓.๓๓, ๖๐.๐๐ ± ๒๕.๑๗, ๔๐.๐๐ ± ๑๕.๒๘, ๑๓.๓๓ ± ๖.๖๗, ๑๐.๐๐ ± ๕.๗๗ และ ๐.๐๐ ± ๐.๐๐ ตามลำดับ และหอยหวานที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรที่ระดับความเข้มข้น ๓๗.๕๐ มิลลิกรัม/ลิตร มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>๐.๐๕$) กับชุดการทดลองที่ระดับความเข้มข้น ๑๘.๗๕ มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนในกลุ่มควบคุมบวกนั้นมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ ๔๐.๐๐ ± ๐.๐๐ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>๐.๐๕$) กับชุดการทดลองที่ระดับความเข้มข้นทั้ง ๖ ระดับ (๑๘.๗๕ - ๖๐๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร) โดยชุดการทดลองที่ระดับความเข้มข้น ๖๐๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อทดลองเลี้ยงจนครบ ๑๔ วัน พบว่า หอยหวานที่ทดลองเลี้ยงตายทั้งหมด ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>๐.๐๕$) กับชุดทดลองที่ระดับความเข้มข้น ๑๕๐.๐๐ และ ๓๐๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร (ภาพที่ ๒๐)

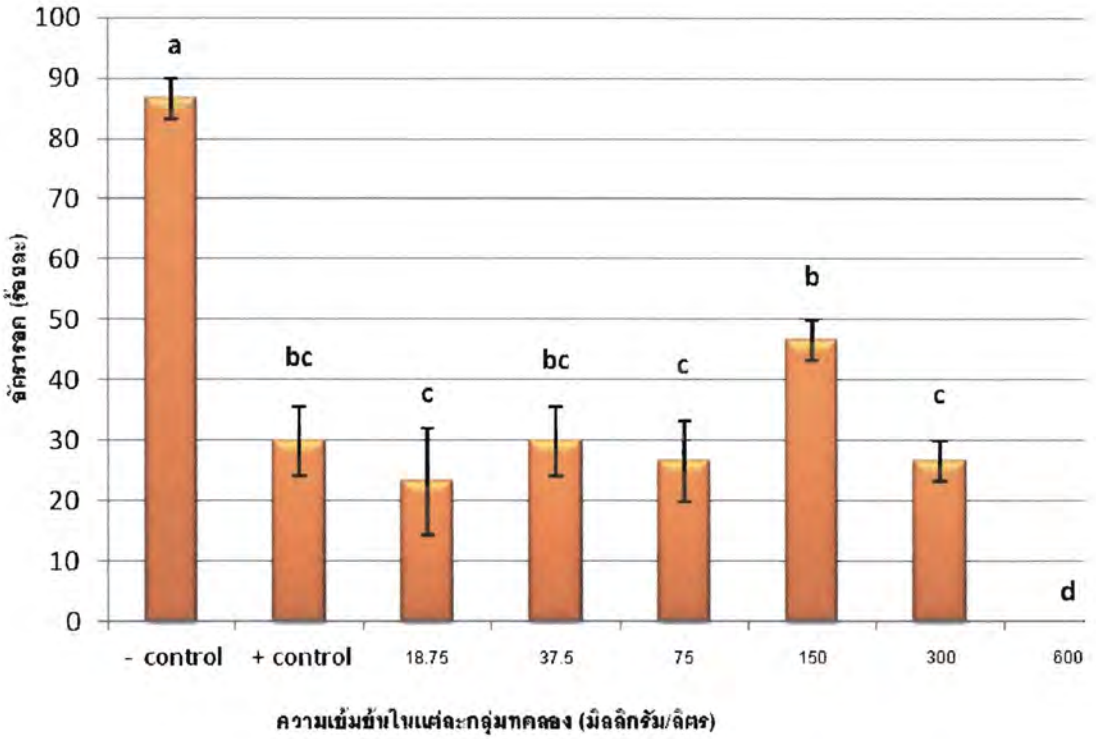
ส่วนผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข่าในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันทั้ง ๖ ระดับ พบว่า ชุดควบคุมลบมีความแตกต่างกันกับชุดควบคุมบวกและชุดการทดลองทุกระดับความเข้มข้นตั้งแต่ ๑๘.๗๕ - ๖๐๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<๐.๐๕$) เนื่องจากมีจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* น้อยกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ ๘๖.๖๗ ± ๓.๓๓ โดยหอยหวานที่ทดลองเลี้ยงในสารสกัดหยาบข่าที่ระดับความเข้มข้น ๑๘.๗๕, ๓๗.๕๐, ๗๕.๐๐, ๑๕๐.๐๐, ๓๐๐.๐๐ และ ๖๐๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร มีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยร้อยละ ๒๓.๓๓ ± ๘.๘๒, ๓๐.๐๐ ± ๕.๗๗, ๒๖.๖๗ ± ๖.๖๗, ๔๖.๖๗ ± ๓.๓๓, ๒๖.๖๗ ± ๓.๓๓ และ ๐.๐๐ ± ๐.๐๐ ตามลำดับ หอยหวานที่

เลี้ยงในสารสกัดหยาบข่าที่ระดับความเข้มข้น ๑๕๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด และมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดการทดลองที่ระดับความเข้มข้น ๑๘.๗๕, ๗๕.๐๐, ๓๐๐.๐๐ และ ๖๐๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนในกลุ่มควบคุมบวกนั้นมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ ๓๐.๐๐ ± ๕.๗๗ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดการทดลองที่ระดับความเข้มข้น ๑๘.๗๕, ๓๗.๕๐, ๗๕.๐๐, ๑๕๐.๐๐ และ ๓๐๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร โดยชุดการทดลองที่ระดับความเข้มข้น ๖๐๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อทดลองเลี้ยงจนครบ ๑๔ วัน พบว่า หอยหวานที่ทดลองเลี้ยงตายทั้งหมด ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดทดลองอื่นๆ (ภาพที่ ๒๑)

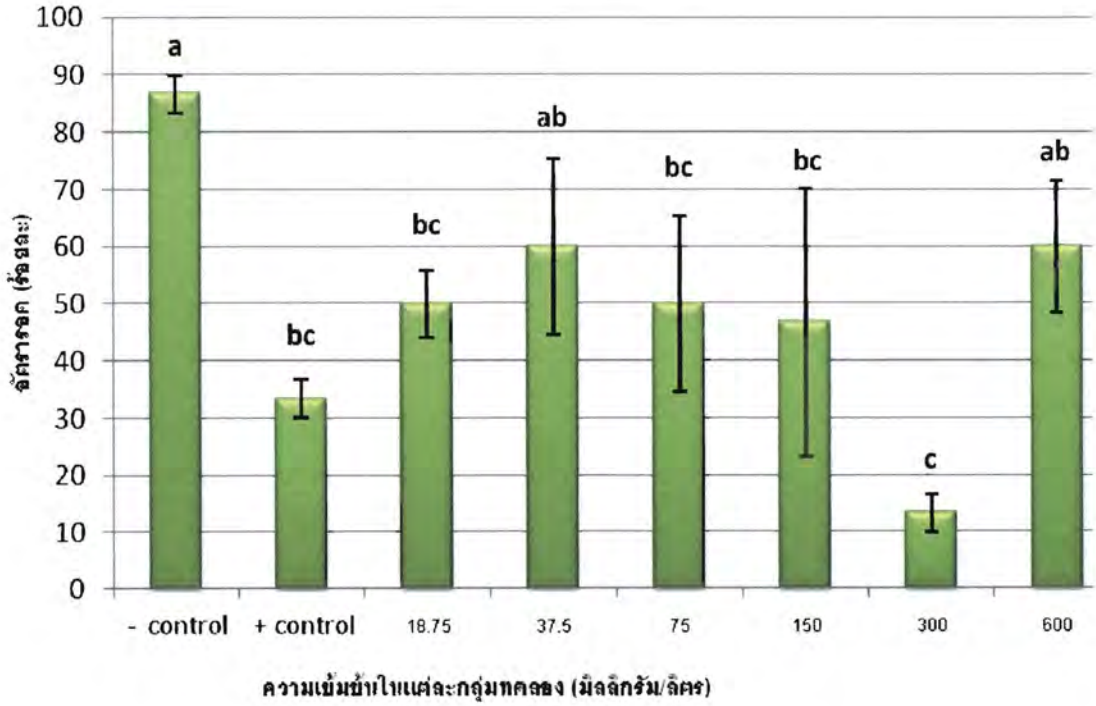
และผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบใบฝรั่งในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันทั้ง ๖ ระดับ พบว่า ชุดควบคุมลบมีความแตกต่างกับชุดควบคุมบวกและชุดการทดลองที่ระดับความเข้มข้น ๑๘.๗๕, ๗๕.๐๐, ๑๕๐.๐๐ และ ๓๐๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ ๘๖.๖๗ ± ๓.๓๓ โดยหอยหวานที่ทดลองเลี้ยงในสารสกัดหยาบใบฝรั่งที่ระดับความเข้มข้น ๑๘.๗๕, ๓๗.๕๐, ๗๕.๐๐, ๑๕๐.๐๐, ๓๐๐.๐๐ และ ๖๐๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร มีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยร้อยละ ๕๐.๐๐ ± ๕.๗๗, ๖๐.๐๐ ± ๑๕.๒๘, ๕๐.๐๐ ± ๑๕.๒๘, ๔๖.๖๗ ± ๒๓.๓๓, ๑๓.๓๓ ± ๓.๓๓ และ ๖๐.๐๐ ± ๑๑.๕๕ ตามลำดับ หอยหวานที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบใบฝรั่งที่ระดับความเข้มข้น ๓๗.๕๐ และ ๖๐๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดการทดลองที่ระดับความเข้มข้น ๑๘.๗๕, ๗๕.๐๐ และ ๑๕๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนในกลุ่มควบคุมบวกนั้นมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ ๓๓.๓๓ ± ๓.๓๓ และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดการทดลองทุกระดับความเข้มข้น (๑๘.๗๕ - ๖๐๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร) โดยชุดการทดลองที่ระดับความเข้มข้น ๓๐๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร มีอัตราการรอดชีวิตต่ำที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดทดลองที่ระดับความเข้มข้น ๓๗.๕๐ และ ๖๐๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร (ภาพที่ ๒๒)




ภาพที่ ๒๐ อัตราการรอดชีวิตของหอยหวานที่ทดลองเลี้ยงด้วยวิธีการแช่ในสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจร หลังจากได้รับเชื้อ *V. alginolyticus* และทดลองเลี้ยงเป็นเวลา ๑๔ วัน




ภาพที่ ๒๑ อัตราการรอดชีวิตของหอยหวานที่ทดลองเลี้ยงด้วยวิธีการแช่ในสารสกัดหยาบข่า หลังจากได้รับเชื้อ *V. alginolyticus* และทดลองเลี้ยงเป็นเวลา ๑๔ วัน




ภาพที่ ๒๒ อัตราการรอดชีวิตของหอยหวานที่ทดลองเลี้ยงด้วยวิธีการแช่ในสารสกัดหยาบใบฝรั่ง หลังจากได้รับเชื้อ *V. alginolyticus* และทดลองเลี้ยงเป็นเวลา ๑๔ วัน

**ตารางที่ ๖** อัตราการรอดชีวิตของหอยหวานที่ทดลองเลี้ยงด้วยวิธีการแช่ในสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ในชุดการทดลองที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน และชุดควบคุม ตลอดระยะเวลาการทดลอง ๑๔ วัน

| ฟ้าทะลายโจร | | ข่า | | ใบฝรั่ง | |
|---|---|---|---|---|---|
| ความเข้มข้น (มก./ล) | อัตรารอดชีวิต (ร้อยละ) | ความเข้มข้น (มก./ล) | อัตรารอดชีวิต (ร้อยละ) | ความเข้มข้น (มก./ล) | อัตรารอดชีวิต (ร้อยละ) |
| ควบคุมลบ | ๘๖.๖๗ ± ๓.๓๓$^{a}$ | ควบคุมลบ | ๘๖.๖๗ ± ๓.๓๓$^{a}$ | ควบคุมลบ | ๘๖.๖๗ ± ๓.๓๓$^{a}$ |
| ควบคุมบวก | ๔๐.๐๐ ± ๐.๐๐$^{bc}$ | ควบคุมบวก | ๓๐.๐๐ ± ๕.๗๗$^{bc}$ | ควบคุมบวก | ๓๓.๓๓ ± ๓.๓๓$^{bc}$ |
| ๑๘.๗๕ | ๕๓.๓๓ ± ๓.๓๓$^{b}$ | ๑๘.๗๕ | ๒๓.๓๓ ± ๘.๘$^{c}$ | ๑๘.๗๕ | ๕๐.๐๐ ± ๕.๗๗$^{bc}$ |
| ๓๗.๕๐ | ๖๐.๐๐ ± ๒๕.๑๗$^{ab}$ | ๓๗.๕๐ | ๓๐.๐๐ ± ๕.๗๗$^{bc}$ | ๓๗.๕๐ | ๖๐.๐๐ ± ๑๕.๒๘$^{ab}$ |
| ๗๕.๐๐ | ๔๐.๐๐ ± ๑๕.๒๘$^{bc}$ | ๗๕.๐๐ | ๒๖.๖๗ ± ๖.๖๗$^{c}$ | ๗๕.๐๐ | ๕๐.๐๐ ± ๑๕.๒๘$^{bc}$ |
| ๑๕๐.๐๐ | ๑๓.๓๓ ± ๖.๖๗$^{c}$ | ๑๕๐.๐๐ | ๔๖.๖๗ ± ๓.๓๓$^{b}$ | ๑๕๐.๐๐ | ๔๖.๖๗ ± ๒๓.๓๓$^{bc}$ |
| ๓๐๐.๐๐ | ๑๐.๐๐ ± ๕.๗๗$^{c}$ | ๓๐๐.๐๐ | ๒๖.๖๗ ± ๓.๓๓$^{c}$ | ๓๐๐.๐๐ | ๑๓.๓๓ ± ๓.๓๓$^{c}$ |
| ๖๐๐.๐๐ | ๐.๐๐ ± ๐.๐๐$^{c}$ | ๖๐๐.๐๐ | ๐.๐๐ ± ๐.๐๐$^{d}$ | ๖๐๐.๐๐ | ๖๐.๐๐ ± ๑๑.๕๕$^{ab}$ |

หมายเหตุ : ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<๐.๐๕$)

**การยืนยันเชื้อแบคทีเรียหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีสและการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ก่อนและหลังการรักษาเป็นเวลา ๑๔ วัน**

ผลจากการเพาะเชื้อแบคทีเรียจากหอยหวานที่ตายหลังจากการทดลอง พบว่า ในทุกตัวอย่างที่สุ่มมาทำการเพาะแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSA และ TCBS ผลการทดลองทางชีวเคมีที่ได้จากชุดทดสอบ API ๒๐E (BIOMERIEUX®) และผลการทดสอบการย้อมแกรม ความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test) และปฏิกิริยา Oxidase test พบว่า เป็นเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ซึ่งให้ผลตรงกับผลทดสอบการเพาะเชื้อและพิสูจน์แยกเชื้อแบคทีเรียก่อนทำการทดลอง

ผลการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria count) โดยการสุ่มตัวอย่างหอยหวานป่วย และหอยหวานปกติ พบว่า หอยหวานปกติมีจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ทั้งหมดเท่ากับ ๑.๔ x ๑๐$^{๒}$ CFU/ml. และหอยหวานป่วยที่รอดชีวิตในวันที่สิ้นสุดการทดลอง มีจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* เท่ากับ ๖.๔ x ๑๐$^{๕}$ CFU/ml.

**การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ**

ผลการตรวจคุณภาพน้ำทะเลผสมสารสกัดหยาบสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดที่ใช้ทดลองเลี้ยงหอยหวานในแต่ละพารามิเตอร์นั้น มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>๐.๐๕$) โดยมีค่าอุณหภูมิของน้ำเฉลี่ยทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง ๒๗.๕๗±๐.๒๙ - ๒๗.๖๖±๐.๒๓ องศาเซลเซียส ค่าความเค็มเฉลี่ยทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง ๓๐±๐.๒๑ - ๓๑±๐.๑๖ psu ค่า pH เฉลี่ยทุกชุดการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง ๘.๐±๐.๐๘ - ๘.๒±๐.๑๙ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ทุกชุดการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง ๕.๗๙±๐.๒๐ - ๕.๘๘±๐.๑๔ มิลลิกรัม/ลิตร และค่าความเป็นด่างของน้ำทะเล (Alkalinity) มีค่าอยู่ในช่วง ๑๑๒±๒.๕๔ - ๑๑๔±

๒.๘๔ มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย (Ammonia) ในน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงหอยหวานตลอดการทดลอง ๑๔ วันมีค่าเพิ่มสูงขึ้นทุกชุดการทดลองเมื่อมีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ (p>๐.๐๕) กับชุดการทดลองอื่นๆ โดยมีปริมาณแอมโมเนียเฉลี่ยทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง ๒.๙๑๔±๑.๙๓ - ๓.๑๙๙±๒.๒๓ µg at N/L ซึ่งพบว่าแต่ละพารามิเตอร์มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>๐.๐๕) ดังแสดงในตารางที่ ๗

**ตารางที่ ๗** ผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำในพารามิเตอร์ต่างๆ ในระยะเวลาการทดลองเลี้ยง ๑๔ วัน

| พารามิเตอร์ (หน่วย) | ค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำที่ตรวจวัดได้ในแต่ละชุดการทดลอง ในระยะเวลาการเลี้ยง ๑๔ วัน | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ชุดควบคุมลบ | ชุดควบคุมบวก | ฟ้าทะลายโจร | ข่า | ใบฝรั่ง |
| อุณหภูมิน้ำ (°C) | ๒๗.๕๗±๐.๒๙[a] | ๒๗.๕๘±๐.๓๒[a] | ๒๗.๖๖±๐.๒๐[a] | ๒๗.๕๖±๐.๒๒[a] | ๒๗.๕๑±๐.๑๗[a] |
| ความเค็ม (psu) | ๓๐±๐.๓๓[a] | ๓๐±๐.๒๑[a] | ๓๐±๐.๓๒[a] | ๓๑±๐.๒๔[a] | ๓๐±๐.๒๔[a] |
| pH | ๘.๐±๐.๐๘[a] | ๘.๑±๐.๐๖[a] | ๘.๑±๐.๐๖[a] | ๘.๐±๐.๐๔[a] | ๘.๑±๐.๐๒[a] |
| DO (mg/l) | ๕.๘๘±๐.๑๔[a] | ๕.๘๔±๐.๑๖[a] | ๕.๗๕±๐.๑๑[a] | ๕.๗๙±๐.๑๒[a] | ๕.๘๑±๐.๐๙[a] |
| Alkalinity (mg/l) | ๑๑๓±๒.๔๔[a] | ๑๑๒±๒.๕๔[a] | ๑๑๒±๑.๘๖[a] | ๑๑๓±๑.๙๕[a] | ๑๑๔±๑.๘๓[a] |
| Ammonia (µg at N/L) | ๒.๑๑๔±๑.๙๓[a] | ๒.๒๓๕±๑.๙๑[a] | ๒.๖๑๖±๐.๓๒[a] | ๒.๔๗๒±๐.๓๓[a] | ๒.๘๑๗±๐.๓๐[a] |

หมายเหตุ : ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<๐.๐๕)

## การอภิปรายผล

การทดลองนี้จะทำการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* จากหอยหวานที่มีอาการป่วยปากบวมแดงออกมาทำการศึกษาต่อ เนื่องจาก วีณา เคยพุดซา และคณะ (๒๕๔๙) ได้ศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* มีความรุนแรงของเชื้อมากที่สุดที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในหอยหวานได้ โดยจะทำการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากบริเวณปาก (proboscis) ของหอยหวานที่บวมแดง จากนั้นทำการพิสูจน์และยืนยันว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ต้องการ พบว่าเชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกได้เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ย้อมติดสีแดงและมีรูปร่างท่อนสั้น โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ มีสีเหลืองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar เนื่องจากการหมักย่อยน้ำตาลซูโครส การศึกษาครั้งนี้สามารถจำแนกเชื้อ *V. alginolyticus* ได้ทั้งหมด ๒ isolates ซึ่งมี % identification ร้อยละ ๙๗.๘ และ ๙๘.๘ ตามลำดับ โดยเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่พบนี้ถือเป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ปกติทั่วไปในน้ำทะเล (ลิลา เรืองแป้น และคณะ, ๒๕๒๘) และเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำกลุ่ม bivalve และ gastropod ได้ และยังมีรายงานอีกว่าหอยหวานจะตาย ๕๐ เปอร์เซ็นต์ ภายใน ๒๔ ชั่วโมง ถ้าหากได้รับเชื้อแบคทีเรียเข้าไปในปริมาณ ๔.๓๒ x $๑๐^{๖}$ - ๑.๕๘ x $๑๐^{๗}$ cfu/ml โดยปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ไม่มีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซิส (vibriosis) ในหอยหวาน การทดลองนี้จะเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีสในหอยหวานปกติ โดยการฉีดเชื้อเข้ากล้ามเนื้อเท้าหอยหวาน พบว่า ค่า $LD_{๕๐}$ ของเชื้อ *V. alginolyticus* ที่ทำให้หอยหวานตายลง ๕๐ เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา ๒๔ ชั่วโมง มีค่า ๑.๔๒๖ x $๑๐^{๗}$ cfu/ml ซึ่งหอยหวานปกติที่ได้รับเชื้อ *V. alginolyticus* นี้จะมีอาการปากบวมแดง

ในการศึกษานี้ได้นำสมุนไพรไทยมาประยุกต์ใช้ในการรักษาและป้องกันโรคในสัตว์น้ำ เพื่อลดปริมาณและ/หรือทดแทนการใช้สารต้านจุลชีพ และลดการเกิดสารตกค้างในตัวสัตว์น้ำที่ใช้สำหรับบริโภค ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีการศึกษาและปฏิบัติกันมากในปัจจุบัน ทั้งในสัตว์บกและสัตว์น้ำที่เป็นสัตว์เศรษฐกิจของไทย ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาสารสำคัญในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจร พบว่ามี Lactone คำนวณเป็นแอนโดรกราโฟไลด์ (Andrographolide) ซึ่ง สถาพร ดิเรกบุษราคัม และคณะ (๒๕๓๙) ได้รายงานไว้ว่า สาร Flavone และ Lactone: Andrographolide; Neo-, Deoxy-Andrographolide ที่ได้จากสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ ๗๐% และ ๘๕% สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae* ได้ ส่วนการวิเคราะห์หาสารสำคัญในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบใบฝรั่ง พบว่ามีสาร quercetin ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ ตามรายงานของ สถาพร ดิเรกบุษราคัม และคณะ (๒๕๓๙); จริยาและคณะ, (๒๕๓๒b) กล่าวว่า quercetin และ quercetin-3-arabinoside ในสารสกัดหยาบใบฝรั่งที่สกัดด้วยน้ำกลั่นสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. splendidus*, *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* ได้ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง ๑.๒๕ - ๕.๐๐ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนการวิเคราะห์หาสารสำคัญในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบข่า พบว่ามี Isoeugenol ซึ่งเป็นสารที่ผลิตมาจาก Eugenol มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ดีหลายชนิด ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ ธิดาพร ฉวีภักดิ์ และคณะ (๒๕๕๐) กล่าวไว้ว่า สาร Eugenol, 1'-acetoxychavicol acetate, 1'-acetoxyeugenol acetate ในสารสกัดหยาบข่าที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเอทานอล ๑๐๐% สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus* และ *V. harveyi* ได้ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง ๐.๗๘ – ๕๐.๐๐ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

I26980290

ในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร ข่า และใบฝรั่ง ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่ทำให้เกิดโรคในหอยหวาน พบว่าสารสกัดหยาบใบฝรั่งที่สกัดด้วยน้ำกลั่น โดยวิธีการต้มมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ได้สูงสุด (MIC = ๒.๗๓ mg/L และ MBC = ๒๑.๘๘ mg/L) ซึ่งตัวทำละลายชนิดอื่นๆ ให้ผลในการยับยั้งและกำจัดเชื้อแบคทีเรียไม่ค่อยดี รองลงมาคือ สารสกัดหยาบข่าที่สกัดด้วยเอธานอล ๑๐๐% โดยวิธีการระเหยตัวทำละลายออก (MIC = ๒.๗๓ mg/L และ MBC = ๒๑.๘๘ mg/L) พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตและกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าการสกัดข่าด้วยน้ำกลั่น (MIC = ๑๐.๙๔ mg/L และ MBC = ๔๓.๗๕ mg/L) อาจเนื่องจากสาร Eugenol เป็นส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยจึงละลายได้ดีในเอธานอล และสารสกัดหยาบข่าที่สกัดด้วยน้ำกลั่น ทั้งแบบวิธีการต้มและวิธีการระเหยสารละลายออกนั้นให้ผลในการยับยั้งและกำจัดเชื้อแบคทีเรียไม่แตกต่างกัน ในการศึกษาของ ธิดาพร ฉวีภักดิ์ และคณะ (๒๕๕๐) พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดในการกำจัดแบคทีเรีย *V. cholerae* ของสารสกัดข่ามีค่าเท่ากับ ๐.๗๘ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และนอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าในการใช้สารสกัดข่าด้วยเอทานอล ๑๐๐% มีผลยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ซึ่งมีค่า MIC และ MBC ของสารสกัดข่าที่ระดับความเข้มข้น ๐.๓๒๕ และ ๑.๓ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Oonmeeta-aree *et al.*, ๒๐๐๕) และสุดท้ายสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ได้ต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่นๆ แล้ว พบว่าสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วยน้ำกลั่น โดยวิธีการต้มมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ได้ดีที่สุด (MIC = ๕.๔๗ mg/L และ MBC = ๘๗.๕๐ mg/L) และการศึกษาของวัชรี สุภาอินทร์ (๒๕๔๓) พบว่าสารสกัดฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus pneumonia* ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ ๐.๒๕ และ ๑.๐๐ มิลลิกรัม

การทดสอบหาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดที่ทำให้หอยหวานตายครึ่งหนึ่ง (๕๐ เปอร์เซ็นต์) ภายใน ๙๖ ชั่วโมง โดยวิธีการแช่ พบว่า หอยหวานที่เลี้ยงในสารสกัดหยาบสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดจะมีอาการกระวนกระวายและดิ้นไปดิ้นมาทันทีหลังจากแช่ลงในสารสกัดหยาบสมุนไพร โดยสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรมีความเป็นพิษระดับสูงที่สุด ($LC_{50}$ ๙๖ hr = ๓๘๕.๒๕ มิลลิกรัม/ลิตร) รองลงมาคือ สารสกัดหยาบข่า ($LC_{50}$ ๙๖ hr = ๘๐๙.๓๙ มิลลิกรัม/ลิตร) และสารสกัดหยาบใบฝรั่งมีความเป็นพิษระดับต่ำที่สุด ($LC_{50}$ ๙๖ hr = ๓,๐๑๗.๑๑ มิลลิกรัม/ลิตร) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ อภินันท์ สุวรรณรักษ์ และจิราพร โรจน์ทินกร (๒๕๔๗) พบว่าน้ำสกัดหยาบใบฝรั่งมีความเป็นพิษน้อย มีผลทำให้กบนามีอัตรารอดสูงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำสกัดหยาบมังคุดและกระเจี๊ยบ แต่น้ำสกัดหยาบใบฝรั่งที่ความเข้มข้นสูงไม่สามารถรักษากบนาที่ติดเชื้อได้ อาจเนื่องมาจากความเป็นพิษของสมุนไพรมีมากเกินไป ส่วนที่ความเข้มข้นต่ำสามารถรักษากบนาหายได้แต่อัตรารอดต่ำ โดยได้สังเกตพบว่าหลังจากที่ใส่สารสกัดหยาบสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดลงไป หอยหวานที่แช่ในสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรจะเริ่มตายภายในเวลา ๒ ชั่วโมง และหอยหวานที่อยู่ในสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรที่ความเข้มข้น ๒,๔๐๐ - ๙,๖๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร จะมีการตายอย่างต่อเนื่องจนตายหมดภายในเวลา ๒๔ ชั่วโมง ส่วนหอยหวานที่แช่ในสารสกัดหยาบข่าและใบฝรั่งไม่มีการตายภายในเวลา ๔ ชั่วโมงแรกหลังจากแช่สารสกัดหยาบสมุนไพร หอยหวานที่แช่ในสารสกัดหยาบข่าที่ความเข้มข้น ๔,๘๐๐ – ๙,๖๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร และหอยหวานที่แช่ในสารสกัดหยาบใบฝรั่งที่ความเข้มข้น ๙,๖๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร จะมีการตายอย่างต่อเนื่องจนตายหมดภายในเวลา ๒๔ ชั่วโมง และได้ทดลองแช่หอยหวานลงในสารสกัดหยาบสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดในระยะเวลาสั้น

แล้วยกขึ้นนำไปเลี้ยงต่อ พบว่าไม่มีผลต่ออัตราการรอดของหอยหวาน หอยหวานสามารถดำรงชีวิตได้ตามปกติ

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ในหอยหวาน ด้วยวิธีการแช่เป็นระยะเวลา ๑๔ วัน พบว่าสารสกัดหยาบสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของหอยหวานที่แตกต่างกัน โดยถ้าเปรียบเทียบในสารสกัดสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด พบว่า สารสกัดหยาบใบฝรั่งมีประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในหอยหวานได้ดีที่สุด ที่ระดับความเข้มข้น ๓๗.๕๐ มิลลิกรัม/ลิตร เพราะมีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด และเมื่อพิจารณาถึงความเป็นพิษต่อหอยหวานพบว่ามีความเป็นพิษต่ำที่สุด อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ได้สูงสุด (MIC = ๒.๗๓ mg/L และ MBC = ๒๑.๘๘ mg/L)

ส่วนระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันรักษาโรคและมีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด คือ ระดับความเข้มข้น ๑๘.๗๕ มิลลิกรัม/ลิตร เพราะมีอัตราการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกับระดับความเข้มข้น ๓๗.๕๐ มิลลิกรัม/ลิตร จึงควรใช้สารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรที่ความเข้มข้นต่ำจะดีกว่าเพื่อลดปัญหาการดื้อยา และจากผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรที่ระดับความเข้มข้น ๑๘.๗๕ มิลลิกรัม/ลิตร พบว่ามีอัตราการตายสะสมน้อยที่สุด (ร้อยละ ๑๐) โดยสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรที่ความเข้มข้นสูงไม่สามารถรักษาหอยหวานที่ติดเชื้อแบคทีเรียได้ หอยหวานที่ทดลองเลี้ยงในความเข้มข้นสูงจะตายหมด อาจเนื่องมาจากความเป็นพิษของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่มากเกินไป ส่วนที่ความเข้มข้นต่ำสามารถรักษาหอยหวานได้แต่อัตราการรอดจะต่ำ ซึ่งจุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์ และสมพร รุ่งกำเนิดวงศ์ (๒๕๕๓) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจรโดยใส่ในอาหารเม็ดสำเร็จรูปใช้เลี้ยงปลากะพงขาว พบว่าฟ้าทะลายโจรสามารถช่วยเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและเพิ่มความต้านทานโรคจากเชื้อแบคทีเรียได้ ส่วนระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบข่าที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันรักษาโรค คือ ระดับความเข้มข้น ๑๘.๗๕ มิลลิกรัม/ลิตร โดยมีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมบวกและกลุ่มที่เลี้ยงในระดับความเข้มข้น ๑๕๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งที่ระดับความเข้มข้น ๑๕๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร พบว่ามีอัตราการตายสะสมน้อยที่สุด (ร้อยละ ๑๗) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ธิดาพร ฉวีภักดิ์ และคณะ (๒๕๕๐) ที่รายงานว่าสารสกัดจากข่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ได้แก่ *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากกุ้งทะเลได้ ส่วนระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบฝรั่งที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันรักษาโรคและมีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด คือ ระดับความเข้มข้น ๓๗.๕๐ มิลลิกรัม/ลิตร เพราะมีอัตราการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกับระดับความเข้มข้น ๖๐๐.๐๐ มิลลิกรัม/ลิตร จึงควรใช้สารสกัดหยาบใบฝรั่งที่ความเข้มข้นต่ำจะดีกว่าเพื่อลดปัญหาการดื้อยา และจากผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบใบฝรั่งที่ระดับความเข้มข้น ๓๗.๕๐ มิลลิกรัม/ลิตร พบว่ามีอัตราการตายสะสมน้อยที่สุด (ร้อยละ ๑๐) จากการศึกษาของ สถาพร ดิเรกบุษราคม และคณะ (๒๕๔๑) พบว่าสารสกัดจากใบฝรั่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงในกุ้งกุลาดำได้ดีเทียบเท่ากับยาอ๊อกซีเตตราซัยคลิน และใบฝรั่งยังมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ในปลาดุกได้ดีเช่นกัน สามารถทำให้ปลามีอัตรารอด ๑๐๐% ในขณะที่อัตรารอดของปลาในชุดควบคุมที่ไม่ใช้สารสกัดใบฝรั่งมีค่าเพียง ๒๐% (สถาพร ดิเรกบุษราคม และคณะ, ๒๕๓๙)

คุณภาพน้ำในกระบะทดลองเลี้ยงหอยหวาน จะทำการตรวจวิเคราะห์ทุกๆ ๓ วันตลอดระยะเวลาการทดลอง พบว่าค่าคุณภาพน้ำในแต่ละพารามิเตอร์นั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิด (ตารางที่ ๑ ในภาคผนวก ช.) และค่าคุณภาพน้ำที่วัดได้ในแต่ละพารามิเตอร์นั้นยังมีค่าไม่เกินค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทะเลเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำด้วย (กรมควบคุมมลพิษ) (ตารางที่ ๒ ในภาคผนวก ช.) อาจเนื่องมาจากมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำในกระบะทดลองทุกวันตลอดระยะเวลาการทดลอง จึงทำให้ค่าคุณภาพน้ำที่ตรวจวัดได้ไม่ต่ำกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนด

# ข้อสรุป

ผลจากการสกัดสมุนไพรไทยทั้ง ๓ ชนิดด้วยตัวทำละลายต่างกัน ๓ ชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอล ๙๕% และเอทานอล ๑๐๐% พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดคือน้ำ โดยพิจารณาจากค่า MIC และ MBC และใช้วิธีการสกัดแบบวิธีการต้ม จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบใบฝรั่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและกำจัดเชื้อ *V. alginolyticus* ได้ดีที่สุด ที่มีระดับความเข้มข้น ๓๗.๕๐ มิลลิกรัม/ลิตร และมีอัตรารอดสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรและข่า โดยสารสกัดหยาบใบฝรั่งมีความเป็นพิษน้อยที่สุด ซึ่งพบว่าหอยหวานมีอัตรารอดสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรและข่า สารสกัดหยาบสมุนไพรไทย เช่น ฟ้าทะลายโจรและข่าที่ระดับความเข้มข้นสูงไม่สามารถรักษาหอยหวานที่ติดเชื้อได้ อาจเนื่องมาจากความเป็นพิษของสารสกัดหยาบสมุนไพรมากเกินไป ส่วนที่ความเข้มข้นต่ำก็สามารถรักษาหอยหวานได้แต่อัตราการรอดชีวิตจะต่ำ

สารสกัดสมุนไพรไทยเหล่านี้จะต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสมกับสัตว์น้ำแต่ละชนิด เนื่องจากความเป็นพิษของสารสกัดหยาบสมุนไพรไทยมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรให้คำแนะนำแก่เกษตรกรให้ใช้สารสกัดหยาบสมุนไพรไทยในระดับความเข้มข้นและรูปแบบการรักษาที่ถูกต้องเหมาะสมต่อการรักษาหอยหวานที่ติดเชื้อ *V. alginolyticus* ซึ่งจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำใบฝรั่งซึ่งเป็นพืชสมุนไพรท้องถิ่นที่หาได้ง่ายและมีราคาไม่แพง มาประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคสัตว์น้ำที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ได้ เพื่อช่วยลดสารตกค้างในสัตว์น้ำ และยังช่วยลดการใช้ยาต้านจุลชีพ อีกทั้งยังเป็นแนวทางในการแนะนำและผลิตสารตัวใหม่มาใช้เพื่อการรักษาโรคสัตว์น้ำ และเป็นการส่งเสริมการเลี้ยงสัตว์น้ำแบบอินทรีย์ให้ปลอดภัยจากโรคและปลอดภัยต่อผู้บริโภคด้วย

# ข้อเสนอแนะ

๑. ในการทดลองขั้นตอนต่างๆ ควรจะทำการทดลองอย่างต่อเนื่อง เพราะเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น ทำให้ความแข็งแรงของเชื้อลดต่ำลง จึงทำให้เสียเวลาในการกระตุ้นให้เชื้อมีความรุนแรงเพิ่มขึ้น

๒. การเก็บรักษาเชื้อวิบริโอ (*Vibrio* spp.) ต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -๒๐ °C (เก็บไว้ได้ประมาณ ๑-๒ ปี) หรือ -๘๐ °C (เก็บไว้ได้ประมาณ ๓ ปี) ไม่ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพราะโปรตีนจะเสียสภาพได้

๓. สารสกัดหยาบสมุนไพรไทยที่ใช้ในการทดลอง อาจจะมีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์แตกต่างจากงานวิจัยอื่นๆ อาจเนื่องจากขั้นตอนวิธีการสกัดสาร ช่วงเวลาการเก็บที่แตกต่างกัน และความอ่อนแก่ของสมุนไพรสดที่นำมาสกัด เป็นต้น

๔. สารสกัดหยาบสมุนไพรไทยที่ใช้ในการทดลองโดยวิธีการแช่ จะต้องทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำใหม่ทุกวัน เพราะค่อนข้างจะเน่าเสียได้ง่าย อาจเนื่องมาจากการขับเมือกของหอยหวาน อีกทั้งสมุนไพรมีองค์ประกอบเป็นอินทรีย์สารที่ถูกย่อยสลายได้ไว จึงทำให้หากนำไปใช้ในระบบฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจริง ก็ต้องมีการเฝ้าระวังและดูแลจัดการเรื่องคุณภาพน้ำควบคู่ไปพร้อมกันด้วย

๕. ควรมีการศึกษาเรื่องการดูดซึมของสารสกัดสมุนไพรว่าหอยหวานได้รับเท่าไหร่ เพื่อเข้าใจกลไกการทำงานของสารสกัดสมุนไพร

๖. ควรพิจารณาศึกษาต่อว่าสารใดในสารสกัดสมุนไพรไทยที่ทำให้หอยหวานตาย อาจใช้เป็นประโยชน์ในการควบคุมหอยเชอรี่ที่ระบาดในนาข้าวได้

# บรรณานุกรม


จริยา สินเดิมสุข และสมเกียรติ ดีกิจเสริมพงศ์. ๒๕๓๒a. ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค ท้องร่วงและกลุ่มแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้. วารสารกรมการแพทย์. ๑๔ (๖): ๔๒๑-๖.

จริยา สินเดิมสุข, สมเกียรติ ดีกิจเสริมพงศ์ และวีณา จารุปรีชาชาญ. ๒๕๓๒b. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการรักษาโรคอุจจาระร่วงระหว่างใบฝรั่งและเปลือกมังคุด. วารสารเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. ๑๖ (๒): ๓๒-๕.

จุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์ และสมพร รุ่งกำเนิดวงศ์. ๒๕๕๓. ผลของสารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) ต่อองค์ประกอบเลือด ระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch, ๑๗๙๐. วารสารการประมงปีที่ ๖๓ ฉบับที่ ๑. ๕๖-๖๕.

ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ์, ๒๕๕๑. คู่มือการตรวจและวินิจฉัยโรคในกุ้งทะเล (ออนไลน์). ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์น้ำ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. สืบค้นจาก www.dld.go.th/niah, V๓ N๒ [๑๒ December ๒๐๐๙]

ธิดาพร ฉวีภักดิ์, ชุติมา ขมวิลัย และลิลา เรืองแป้น. ๒๕๕๐. ประสิทธิภาพของสมุนไพรไทยบางชนิดต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่แยกได้จากกุ้งทะเล. บทคัดย่อการประชุมวิชาการประมง ประจำปี ๒๕๕๐ กรมประมง. ๘๕-๘๖.

นิลนาจ ชัยธนาวิสุทธิ์ และศิรุษา กฤษณะพันธุ์. ๒๕๔๕. คู่มือการเพาะเลี้ยงหอยหวาน: หลักการและแนวทาง. หนังสือในโครงการจัดพิมพ์เผยแพร่รายงานการวิจัย ลำดับที่ ๘. ๑๑๔ หน้า.

ปัญจางค์ ธนังกูล และชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ. ๒๕๓๐. การศึกษาผลทางคลินิกของใบฝรั่งในโรคอุจจาระร่วง. สารศิริราช. ๓๙ (๕): ๒๖๓-๖.

เพ็ญศรี บุญตามช่วย, อรอนงค์ คงทวี และมานพ เห็นดี. ๒๕๔๙. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบฝรั่งด้วยวิธีการต้มต่อการยับยั้งเชื้อวิบริโอในกุ้งกุลาดำ. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง. น. ๕๔.

วีณา เคยพุดซา, จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และมาลินี กิตกำธร. ๒๕๔๙. โครงการวิจัย เรื่องการศึกษาโรคและพาราสิตของหอยหวานระยะต่างๆ รวมถึงสาเหตุของการเกิดโรคและวิธีการรักษาป้องกัน (โครงการต่อเนื่องปีที่ ๒). สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

วันดี กฤษณพันธ์. ๑๙๙๑ (๒๕๓๔). การประเมินคุณภาพสมุนไพร. ใน : ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ภาคที่ ๑ : ความรู้พื้นฐาน. วีณา จิรัจฉริยากูล (บรรณาธิการ) กรุงเทพฯ : ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. ๕๔-๕๙.

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี กรมประมง, ๒๕๔๘. [online] เข้าถึงได้จาก www.fisheries.go.th/cf-chan.

สถาพร ดิเรกบุษราคม. ๒๕๔๐. สมุนไพรกับการเลี้ยงกุ้ง. ข่าวกรมประมง ๒๑ (๔): ๑๑-๑๕.

สถาพร ดิเรกบุษราคม, ชาญเดช วังสะวิบูลย์ และเยาวนิตย์ นพดล. ๒๕๔๑. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบฝรั่งและออกซีเตตราซัยคลินในการกำจัดแบคทีเรียเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ. น. ๑๔๔-๑๕๑. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ ๓๖, ๓-๕กุมภาพันธ์ ๒๕๔๑. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถาพร ดิเรกบุษราคม, สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์ อังคณา หิรัญสาลี และลิลา เรืองแป้น. ๒๕๓๙. ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยบางชนิดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการฉบับที่ ๗/๒๕๓๙, สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา. ๕ หน้า.

สถาพร ดิเรกบุษราคม และอุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์. ๒๕๓๕. ผลของสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งต่อเชื้อวิบริโอที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค. รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี ๒๕๓๕ กรมประมง. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา.

อัญชลี ธำมรงค์คงสถิต. ๒๕๕๐. ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งก้ามกราม. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้. ๑๐๗ หน้า.

อนันต์ชัย เชื่อนธรรม, ๒๕๔๒. หลักการวางแผนการทดลอง. ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. ๓๔๘ หน้า.

APHA (American Public Health Association) (๑๙๙๘). American Water Works Association, and Water Control Federation. Standard Methods for the examination of Water and Wastewater. ๒๐ th Edition, Washington, D.C., ๑๒๖๘ p.

Aynehchi, Y., Salehi Sormaghi, MH., Shirudi, M. and Souri, E. ๑๙๘๒. Screening of Iranian plants for antimicrobial activity. Acta Pharm Suecica ๑๙ (๔): ๓๐๓-๘.

Cheng, W., C. Li and J. Chen. ๒๐๐๔. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Aquculture ๒๓๒: ๑๐๓-๑๑๕.

Ghosh, TK., Sen, T., Das, A., Dutta, AS. and Nag Chaudhuri, AK. ๑๙๙๓. Antidiarrhoeal activity of the methanolic fraction of the extract of unripe fruits of *Psidiun guajava* Linn. Phytotherapy Research. ๗: ๔๓๑-๓.

Grasshoft, K., Kremling, K. and Ehrhardt, M. ๑๙๗๖. Methods of seawater analysis. Verlag Chemie, Weinheim and New York. ๖๓๒ p.

Gritsanapan, W. and Chulasiri, M. ๑๙๘๓. A preliminary study of antidiarrhreal plants: I, antibacterial acitivity. Mahidol J Pharm Sci. ๑๙๘๓; ๑๐ (๔): ๑๑๙-๒๓.

Hamilton-Miller, JMT. ๑๙๙๕. Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.). Antimicrob Agents Chemother. ๓๙ (๑๑): ๒๓๗๕-๗.

Hara, Y. and Ishigami, T. ๑๙๘๙. Studies on antibacterial effects of tea polyphenols. III Antibacterial activities of tea polyphenols against foodborne pathogenic bacteria. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. ๓๖ (๑๒): ๙๙๖-๙.

Toyada, M., Tanaka, K., Hoshino, H., Akiyama, H., Tanimura, A. and Saito, Y. ๑๙๙๗. Profiles of Potentially Antiallergic Flavonoids in ๒๗ kinds of Health Tea and Green Tea Infusions. J. Agric. Food Chem. ๔๕, ๒๕๖๑-๒๕๖๔.

Okazaki, K. and Oshima, S. ๑๙๕๒. Antibacterial activity of higher plants. XX. Antimicrobial effect of essential oils. Clove oil and eugenol. J Pharm Soc Japan ๑๙๕๒; ๗๒: ๕๕๘-๖๐.

Oonmeeta-aree, J., T Suzuki, P. Gasaluck and G. Eumkeb. ๒๐๐๕. Antimicrobial and action of galangal (*Alpinia galangal* Linn.) on *Staphylococus aureus*. Food Science and Tecnology. ๓๙: ๙๕๙-๙๖๕.

Shetty, M., Subbannayya, K. and Shivananda, PG. ๑๙๙๔. Antibacterial activity of tea (*Camellia sinensis*) and coffee (*Coffee arabica*) with special reference to *Salmonella typhimurium*. Commun Dis. ๒๖ (๓): ๑๔๗-๕๐.

Toda, M., Okubo, S., Ikigai, H. and Shimamura, T. ๑๙๙๐. Antibacterial and anti-hemolysin activities of tea catechins and their structural relatives. Nippon Saikingaku Zasshi. ๔๕ (๒): ๕๖๑-๖.

Toda, M., Okubo, S., Ohnishi, R. and Shimamura, T. ๑๙๘๙. Antibacterial and bactericidal activities of Japanese green tea. Nippon Saikingaku Zasshi. ๔๔ (๔): ๖๖๙-๗๒.

Zhang, YG and Lu, FY. ๑๙๘๒ Antibacterial effect of tea tannin and its effect on isolated bowel movement. Yao Hsueh Tung Pao. ๑๗ (๔): ๒๔๘.

# ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก.

<u>ขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test)</u>

๑. เช็ดแผ่นกระจกสไลด์ให้สะอาดด้วย ๗๐% แอลกอฮอล์
๒. หยด sterile water ๑ หยด บนแผ่นกระจกสไลด์
๓. นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเขี่ยลงบนสไลด์ ปิดด้วย cover glass
๔. ตรวจดูการเคลื่อนที่ด้วยกล้องจุลทรรศน์

<u>ขั้นตอนการย้อมสีแกรม (Gram's strain)</u>

๑. เช็ดแผ่นกระจกสไลด์ให้สะอาดด้วย ๗๐% แอลกอฮอล์
๒. หยด sterile water ๑หยด บนแผ่นกระจก
๓. นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ Smear ให้ทั่วสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้ง
๔. ทำการฟิก (fix) เชื้อโดยการผ่านความร้อนเปลวไฟ ๒-๓ ครั้ง หลังจากนั้นทำตามขั้นตอนการย้อมสี
๕. หยดสี crystal violet ลงให้ท่วมบนแผ่นกระจกเป็นเวลา ๑ นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด
๖. หยดสี gram's iodine ให้ท่วมแผ่นกระจกเป็นเวลา ๑ นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด
๗. หยด decolorizer ให้ท่วมแผ่นกระจกเป็นเวลา ๑๕ วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด
๘. หยดสี saffranin ให้ท่วมแผ่นกระจกเป็นเวลา ๓๐ วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด
๙. เช็ดเบาๆ ด้วยกระดาษชำระ ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

<u>การทดสอบความสามารถในการสร้างน้ำย่อยออกซิเดส (Oxidase test)</u> (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, ๒๕๕๑)

Oxidase test เป็นการทดสอบการผลิตเอนไซม์ออกซิเดสของแบคทีเรีย ตามปกติแล้วแบคทีเรียกลุ่มที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน (Aerobic bacteria) และแบคทีเรียกลุ่มที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobic bacteria) จะมีการหายใจโดยใช้กระบวนการ Oxidative phospholation ซึ่งอาศัยไซโทโครม (Cytochrome) ต่างๆ เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ทำให้ได้น้ำเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ในการทดสอบการผลิตเอนไซม์ออกซิเดสจะต้องใช้สารรีเอเจนต์ที่ไม่มีสี คือ Tetramethyl-*p*-phenylene diamine dihydrochloride หรือ Dimethyl- *p*-phenylene diamine dihydrochloride ถ้าแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดส จะทำให้สารทั้งสองชนิดนี้ถูกออกซิไดส์กลายเป็นสารประกอบที่มีสีม่วง เรียกว่า Indophenol แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ เช่น แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่หมักย่อยน้ำตาลกลูโคส

<u>การเตรียมรีเอเจนต์</u>

N, N, N, N- Tetramethyl-*p*-phenylene diamine dihydrochloride ($C_{10}H_{18}Cl_2N_2$) ๑.๐ กรัม
Distilled water ๑๐๐ มิลลิลิตร
ละลายสารนี้ในน้ำกลั่นปริมาตร ๑๐๐ มิลลิลิตร ผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เก็บในขวดสีชา (ห้ามถูกแสง)

การทดสอบ

๑. เช็ดแผ่นกระจกสไลด์ให้สะอาดด้วย ๗๐% แอลกอฮอล์
๒. นำกระดาษกรองที่ตัดเป็นแผ่นเล็กๆ วางลงบนสไลด์
๓. ใช้ loob ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงบนกระดาษกรอง
๔. หยดน้ำยา Oxidase reagent (N, N, N, N- Tetramethyl-*p*-phenylene diamine dihydrochloride) ๑ หยด ลงบนเชื้อที่อยู่บนแผ่นกระดาษกรองให้ท่วมแล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ ๕ นาที บันทึกผลของสีที่เปลี่ยนไป

การอ่านผล

ผลบวก โคโลนีจะค่อยเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้ม
ผลลบ ไม่เปลี่ยนสี

**ขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ API ๒๐E**

๑. ทำการเจือจางเชื้อที่ต้องการทดสอบก่อนในน้ำเกลือ ๐.๕% NaCl ทำให้ได้สารละลายที่ระดับความเข้มข้น McFarland No ๐.๐๕
๒. เติมสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ลงในหลุมชุดทดสอบ API ๒๐E Test kit (Biomerieux, France) โดยการเติมสารละลายจะมี

ONPG, TDA, IND ใส่สารละลายแค่ขอบ

ADH, LDC, ODC ใส่สารละลายเต็มขอบ แล้วเติม mineral oil ให้เต็มหลุม

CIT , VP, GEL ใส่สารละลายเต็มหลุม

๓. หลังจากนั้นนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๐°C เป็นเวลา ๑๘-๒๔ ชั่วโมง จึงนำสารละลายมาหยดลงในหลุมต่างๆ ดังนี้

TDA หยดสารละลาย TDA ๑ หยด ดูสีทันที
IND หยดสารละลาย JAMES ๑ หยด ดูสีทันที
VP หยดสารละลาย VP๑ ๑หยด ตามด้วย VP๒ ๑ หยด ทิ้งไว้ ๑๐ นาที ดูสี

**ตารางที่ ๑** การตรวจและอ่านผลของ API ๒๐ E หลังจาก ๑๘-๒๔ ช.ม (นันทริกา ชันซื่อ, ๒๕๓๙)

| หลอด | ผลบวก (positive) | ผลลบ (negative) | ผลที่ได้จากการทดสอบ |
|---|---|---|---|
| ONPG | สีเหลือง | ไม่มีสี | สีค่อนไปทางเหลืองเป็นบวก<br>ใช้หลอด VP ก่อนเติม reagent เป็น negative control |
| ADH | สีแดงหรือสีส้ม | สีเหลือง | สีส้ม ๓๖-๔๘ ช.ม. เป็นลบ |
| LDC | สีแดงหรือสีส้ม | สีเหลือง | สีส้มในเวลา ๒๔ ช.ม. เป็นบวก |
| ODC | สีแดงหรือสีส้ม | สีเหลือง | สีส้ม ๓๖-๔๘ ช.ม. เป็นผลลบ |
| CIT | สีน้ำเงินเข้ม | สีเหลืองหรือเขียวอ่อน | เติมสารละลายเชื้อแบคทีเรียทั้งส่วน tube และ cupule,<br>อ่านปฏิกิริยาในส่วน cupule (aerobic) |
| $H_2S$ | ตะกอนสีดำ | ไม่มีตะกอนสีดำ | สีน้ำตาลของอาหารถือเป็นผลลบ |
| URE | สีแดงหรือสีส้ม | สีเหลือง | |
| TDA | เติม ๑ หยด ๑๐% Ferric chloride (TDA) | | สังเกตผลทันที<br>จุลินทรีย์ที่มี indole positive อาจจะได้สารละลายสีส้มทอง ถือว่าเป็นผลลบ |
| | สีน้ำตาลแดง | สีเหลือง | |
| IND | เติม ๑ หยด Kovac's reagent (IND) | | อ่านผลใน ๒ นาทีหลังจากเติม Kovac's reagent |
| | วงแหวนสีแดงหรือชมพู | สีเหลือง | |
| VP | เติม ๑ หยด ๔๐% Potassium hydroxide (VP๑) แล้ว ๑ หยด alpha-naphtol (VP๒) | | รอ ๑๐ นาทีก่อนตัดสินว่า ผลเป็นลบ<br>สีชมพูอ่อนหลัง ๑๐ นาทีเป็นลบ |
| | สีแดงหรือชมพู | ไม่มีสี | |
| GEL | การแพร่กระจายของสารสี | ไม่มีการแพร่กระจาย | ไม่ว่าจะมีการแพร่กระจายมากน้อย ถือเป็นบวก |
| GLU<br>MAN<br>INO<br>SOR<br>RHA<br>SAC<br>MEL<br>AMY<br>ARA | สีเหลือง | สีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียว | **Fermentation**<br>Fermentation ของ carbohydrate เริ่มในส่วน anaerobic (ก้นหลอด) ดังนั้นให้อ่านผลจากส่วนท้ายไปบน<br><br>**Oxidation**<br>การ oxidize ของคาร์โบไฮเดรท เริ่มจากส่วน aerobic (ส่วนบนหลอด) ให้อ่านปฏิกิริยาจากบนลงล่าง |
| Nitrate reduction | หลังจากอ่าน GLU แล้วให้เติม ๒ หยด ๐.๘% sulfanilic acid (NIT๑)<br>และ ๒ หยด ๐.๕% N,N, dimethyl-alpha-naphthylamine (NIT๒) | | ๑) ก่อนเติม reagent ให้สังเกต GLU ว่า มีฟองอากาศหรือไม่ ฟองอากาศบ่งถึง reduction ของ nitrate เป็น $N_2$ gas<br>๒) ผลบวกจะใช้เวลา ๒-๓ นาที |

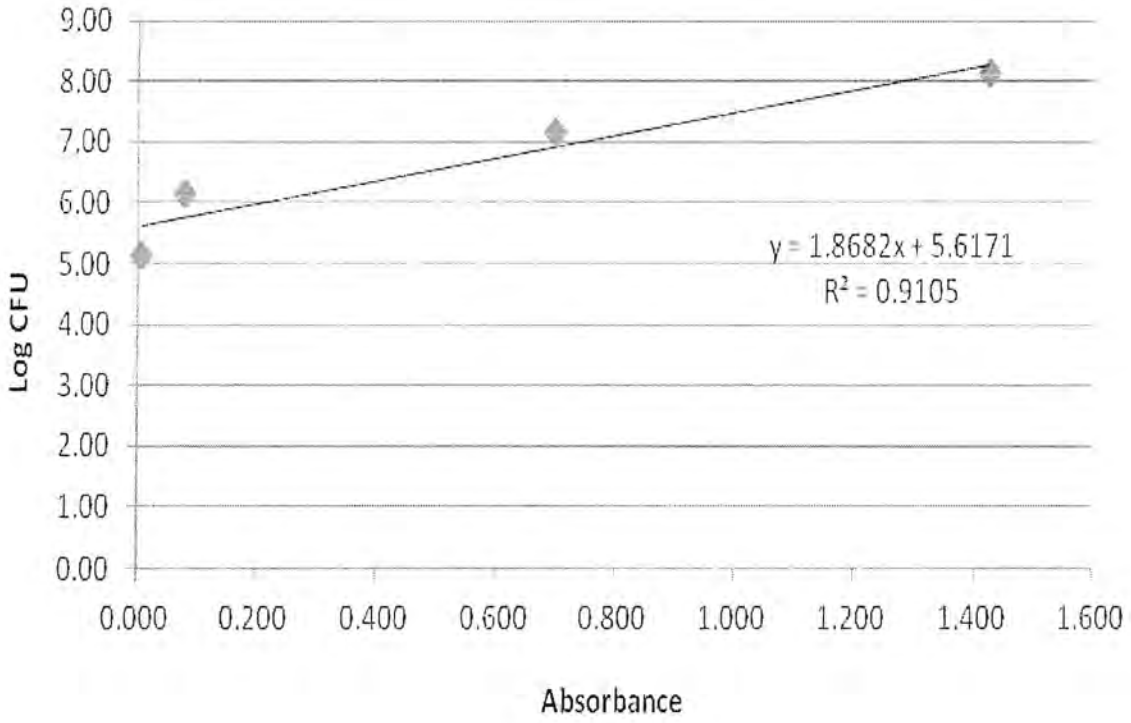
| หลอด | ผลบวก (positive) | ผลลบ (negative) | ผลที่ได้จากการทดสอบ |
|---|---|---|---|
| | สีแดง<br>มีแกส<br>(สีเหลืองหลังเติม<br>reagent และผง zinc) | สีเหลือง<br>(สีส้มหลังเติม reagent<br>และผง zinc) | จึงจะเห็นสีแดงเกิดขึ้น<br>๓) ยืนยันว่าเป็นผลลบโดยการเติมผง zinc<br>สีส้มชมพูหลัง ๑๐ นาทีเป็นผลลบ<br>สีเหลืองบ่งถึง reduction ของ nitrate<br>เป็น $N_2$ gas |
| catalase | หลังจากอ่าน carbohydrate reaction แล้ว<br>ให้เติม ๑ หยด ๑.๕% $H_2O_2$ ลงใน MAN, INO, SOR | | สังเกตผลภายใน ๑-๒ นาที |
| | ฟองอากาศ | ไม่เกิดฟองอากาศ | |

ภาคผนวก ข.

กราฟมาตรฐาน

OD = ๖๐๐ นาโนเมตร

*V. alginolyticus*



ภาคผนวก ค.

๑) การวิเคราะห์สาร quercetin ในใบฝรั่ง

<u>ขั้นตอนการวิเคราะห์</u>

๑. การเตรียมสารละลายสารมาตรฐาน quercetin ในเมทานอล (ความเข้มข้นเริ่มต้น ๑ mg/ml)

ชั่ง quercetin ๑๐ mg ใน volumetric flask ขนาด ๑๐ ml

↓

ละลายและปรับปริมาตรให้ครบด้วย methanol

↓

กรองด้วย syringe filter เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์

↓

บรรจุใส่ vial เพื่อเตรียมไปใช้ฉีด HPLC

๒. การเตรียมสารสกัดตัวอย่างในเมทานอล

ชั่งสารตัวอย่าง ๒๕๐ mg ใน volumetric flask ๑๐ ml

↓

สกัดสารตัวอย่างด้วย methanol และปรับปริมาตรให้ครบ

↓

Sonicate นาน ๑ ชั่วโมง

↓

กรองด้วย syringe filter เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์

↓

บรรจุใส่ vial เพื่อนำไปใช้ฉีด HPLC

๓. การเตรียมสารสกัดตัวอย่างในเมทานอล (แบบ spike peak)

ปิเปตสารสกัดตัวอย่างในข้อ ๒ มา ๕๐๐ ไมโครลิตร

↓

เติมสารละลายสารมาตรฐาน quercetin อีก ๕๐๐ ไมโครลิตร

↓

กรองด้วย syringe filter เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์

↓

บรรจุใส่ vial เพื่อเตรียมไปใช้ฉีด HPLC

๔. การวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสาร quercetin โดยใช้ HPLC

Mobile phase: Methanol: ๐.๕% Phosphoric acid ในน้ำ (๑:๑)

Stationary phase: Kinetex™ ๒.๖ µM C๑๘ LC Column ๑๕๐ x ๓ mm

Flow rate: ๑ ml/min

Injection volume: ๕ ไมโครลิตร

Detector: PDA, วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ๓๔๙ nm

ตั้งโปรแกรมสำหรับการฉีดสารแบบอัตโนมัติ โดยใช้โปรแกรม LC Solution

↓

กำหนด พารามิเตอร์ ข้างต้น

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ๓๔๙ นาโนเมตร

**๒) การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (Loss on drying)**

ตามวิธีการมาตรฐานของศูนย์นวัตกรรมทางยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพ

เครื่องมือที่ใช้: ๔-digit balace (Mettler Toledo, XP ๑๐๕ DR)

Hot air oven (Memmert)

## ภาคผนวก ง.

ตารางที่ ๑ ผลการหาค่า Lethal dose ($LD_{๕๐}$) ของเชื้อ *V. alginolyticus* โดยการคำนวณด้วยวิธี probit analysis (SPSS version ๑๕ ๐)

Confidence Limits

| Probability | | ๙๕% Confidence Limits for LD bact | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Estimate | Lower Bound | Upper Bound |
| PROBIT[a] | ๐๑๐ | ๔.๕๘๔ | ๓.๗๖๔ | ๕.๑๘๑ |
| | .๐๒๐ | ๕.๐๐๓ | ๔.๒๖๓ | ๕.๕๔๕ |
| | .๐๓๐ | ๕.๒๖๘ | ๔.๕๗๘ | ๕.๗๗๖ |
| | .๐๔๐ | ๕.๔๖๘ | ๔.๘๑๕ | ๕.๙๕๑ |
| | .๐๕๐ | ๕.๖๓๐ | ๕.๐๐๗ | ๖.๐๙๔ |
| | .๐๖๐ | ๕.๗๖๘ | ๕.๑๗๐ | ๖.๒๑๕ |
| | .๐๗๐ | ๕.๘๙๐ | ๕.๓๑๓ | ๖.๓๒๒ |
| | .๐๘๐ | ๕.๙๙๘ | ๕.๔๔๑ | ๖.๔๑๘ |
| | .๐๙๐ | ๖.๐๙๗ | ๕.๕๕๗ | ๖.๕๐๖ |
| | .๑๐๐ | ๖.๑๘๘ | ๕.๖๖๓ | ๖.๕๘๖ |
| | .๑๕๐ | ๖.๕๖๔ | ๖.๑๐๑ | ๖.๙๒๓ |
| | .๒๐๐ | ๖.๘๖๓ | ๖.๔๔๖ | ๗.๑๙๕ |
| | .๒๕๐ | ๗.๑๑๙ | ๖.๗๓๙ | ๗.๔๓๑ |
| | .๓๐๐ | ๗.๓๔๙ | ๖.๙๙๘ | ๗.๖๔๖ |
| | .๓๕๐ | ๗.๕๖๓ | ๗.๒๓๔ | ๗.๘๕๐ |
| | .๔๐๐ | ๗.๗๖๕ | ๗.๔๕๕ | ๘.๐๔๖ |
| | .๔๕๐ | ๗.๙๖๑ | ๗.๖๖๕ | ๘.๒๔๐ |
| Dimension๑ | **.๕๐๐** | **๘.๑๕๔** | **๗.๘๖๘** | **๘.๔๓๕** |
| | .๕๕๐ | ๘.๓๔๗ | ๘.๐๖๗ | ๘.๖๓๔ |
| | .๖๐๐ | ๘.๕๔๓ | ๘.๒๖๔ | ๘.๘๔๐ |
| | .๖๕๐ | ๘.๗๔๕ | ๘.๔๖๔ | ๙.๐๕๗ |
| | .๗๐๐ | ๘.๙๕๙ | ๘.๖๗๐ | ๙.๒๙๑ |
| | .๗๕๐ | ๙.๑๘๙ | ๘.๘๘๙ | ๙.๕๔๗ |
| | .๘๐๐ | ๙.๔๔๖ | ๙.๑๒๘ | ๙.๘๓๗ |
| | .๘๕๐ | ๙.๗๔๔ | ๙.๔๐๒ | ๑๐.๑๗๙ |
| | .๙๐๐ | ๑๐.๑๒๑ | ๙.๗๔๑ | ๑๐.๖๑๕ |
| | .๙๑๐ | ๑๐.๒๑๑ | ๙.๘๒๒ | ๑๐.๗๒๑ |
| | .๙๒๐ | ๑๐.๓๑๐ | ๙.๙๑๐ | ๑๐.๘๓๗ |
| | .๙๓๐ | ๑๐.๔๑๙ | ๑๐.๐๐๖ | ๑๐.๙๖๔ |
| | .๙๔๐ | ๑๐.๕๔๐ | ๑๐.๑๑๔ | ๑๑.๑๐๖ |
| | .๙๕๐ | ๑๐.๖๗๘ | ๑๐.๒๓๖ | ๑๑.๒๖๙ |

ตารางที่ ๑ ผลการหาค่า Lethal dose ($LD_{๕๐}$) ของเชื้อ *V. alginolyticus* โดยการคำนวณด้วยวิธี probit analysis (SPSS version ๑๕.๐)

**Confidence Limits**

| Probability | ๙๕% Confidence Limits for LD bact | | |
|---|---|---|---|
| | Estimate | Lower Bound | Upper Bound |
| .๙๖๐ | ๑๐.๘๔๐ | ๑๐.๓๗๙ | ๑๑.๔๖๑ |
| .๙๗๐ | ๑๑.๐๔๐ | ๑๐.๕๕๔ | ๑๑.๖๙๗ |
| .๙๘๐ | ๑๑.๓๐๕ | ๑๐.๗๘๖ | ๑๒.๐๑๒ |
| .๙๙๐ | ๑๑.๗๒๔ | ๑๑.๑๕๑ | ๑๒.๕๑๐ |

a. A heterogeneity factor is used.

## ภาคผนวก จ.

ตารางที่ ๑ ค่า $LC_{๕๐}$ ๙๖ hr ของสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรที่ทำให้หอยหวานตายครึ่งหนึ่ง (๕๐ เปอร์เซ็นต์) ภายใน ๙๖ ชั่วโมง

Confidence Limits

| Probability | | ๙๕% Confidence Limits for conc | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Estimate | Lower Bound | Upper Bound |
| PROBIT[a] | .๐๑๐ | -๒๔๑.๔๗๓ | -๓๑๐.๘๘๔ | -๑๘๕.๙๗๔ |
| | .๐๒๐ | -๑๖๘.๐๓๔ | -๒๒๘.๑๕๐ | -๑๑๙.๕๖๕ |
| | .๐๓๐ | -๑๒๑.๔๔๐ | -๑๗๕.๘๔๖ | -๗๗.๒๔๔ |
| | .๐๔๐ | -๘๖.๓๘๘ | -๑๓๖.๖๓๐ | -๔๕.๒๗๖ |
| | .๐๕๐ | -๕๗.๘๗๗ | -๑๐๔.๘๓๗ | -๑๙.๑๖๗ |
| | .๐๖๐ | -๓๓.๖๐๙ | -๗๗.๘๖๖ | ๓.๑๔๖ |
| | .๐๗๐ | -๑๒.๓๓๑ | -๕๔.๒๙๙ | ๒๒.๗๙๒ |
| | .๐๘๐ | ๖.๗๒๑ | -๓๓.๒๗๒ | ๔๐.๔๕๗ |
| dimension๑ | .๐๙๐ | ๒๔.๐๔๘ | -๑๔.๒๒๐ | ๕๖.๕๙๒ |
| | .๑๐๐ | ๓๙.๙๙๘ | ๓.๒๕๒ | ๗๑.๕๑๒ |
| | .๑๕๐ | ๑๐๖.๐๓๓ | ๗๔.๗๓๒ | ๑๓๔.๑๓๙ |
| | .๒๐๐ | ๑๕๘.๕๑๖ | ๑๓๐.๒๔๘ | ๑๘๕.๒๐๗ |
| | .๒๕๐ | ๒๐๓.๕๔๒ | ๑๗๖.๗๑๓ | ๒๓๐.๑๘๒ |
| | .๓๐๐ | ๒๔๓.๙๗๖ | ๒๑๗.๔๓๙ | ๒๗๑.๕๗๒ |
| | .๓๕๐ | ๒๘๑.๔๔๕ | ๒๕๔.๓๕๙ | ๓๑๐.๗๔๔ |
| | .๔๐๐ | ๓๑๖.๙๙๙ | ๒๘๘.๗๔๕ | ๓๔๘.๕๖๒ |
| | .๔๕๐ | ๓๕๑.๓๙๘ | ๓๒๑.๕๑๐ | ๓๘๕.๖๕๖ |
| | **.๕๐๐** | **๓๘๕.๒๕๑** | **๓๕๓.๓๖๓** | **๔๒๒.๕๕๔** |
| | .๕๕๐ | ๔๑๙.๑๐๕ | ๓๘๔.๙๐๕ | ๔๕๙.๗๖๓ |
| | .๖๐๐ | ๔๕๓.๕๐๓ | ๔๑๖.๗๐๔ | ๔๙๗.๘๒๒ |
| | .๖๕๐ | ๔๘๙.๐๕๗ | ๔๔๙.๓๖๒ | ๕๓๗.๓๖๘ |
| | .๗๐๐ | ๕๒๖.๕๒๖ | ๔๘๓.๕๙๙ | ๕๗๙.๒๒๔ |
| | .๗๕๐ | ๕๖๖.๙๖๐ | ๕๒๐.๓๘๕ | ๖๒๔.๕๕๔ |
| | .๘๐๐ | ๖๑๑.๙๘๖ | ๕๖๑.๑๙๕ | ๖๗๕.๑๘๓ |
| | .๘๕๐ | ๖๖๔.๔๖๙ | ๖๐๘.๖๑๒ | ๗๓๔.๓๕๑ |
| | .๙๐๐ | ๗๓๐.๕๐๔ | ๖๖๘.๐๙๙ | ๘๐๘.๙๗๑ |
| | .๙๑๐ | ๗๔๖.๔๕๔ | ๖๘๒.๔๔๔ | ๘๒๗.๐๑๗ |

Confidence Limits

| Probability | ๙๕% Confidence Limits for conc | | |
|---|---|---|---|
| | Estimate | Lower Bound | Upper Bound |
| .๙๒๐ | ๗๖๓.๗๘๑ | ๖๙๘.๐๑๙ | ๘๔๖.๖๓๐ |
| .๙๓๐ | ๗๘๒.๘๓๓ | ๗๑๕.๑๓๖ | ๘๖๘.๒๐๕ |
| .๙๔๐ | ๘๐๔.๑๑๑ | ๗๓๔.๒๔๒ | ๘๙๒.๓๑๒ |
| .๙๕๐ | ๘๒๘.๓๗๙ | ๗๕๖.๐๑๙ | ๙๑๙.๘๑๘ |
| .๙๖๐ | ๘๕๖.๘๙๐ | ๗๘๑.๕๙๐ | ๙๕๒.๑๔๙ |
| .๙๗๐ | ๘๙๑.๙๔๒ | ๘๑๓.๐๐๗ | ๙๙๑.๙๑๖ |
| .๙๘๐ | ๙๓๘.๕๓๖ | ๘๕๔.๗๔๐ | ๑๐๔๔.๘๐๙ |
| .๙๙๐ | ๑๐๑๑.๙๗๕ | ๙๒๐.๔๖๐ | ๑๑๒๘.๒๓๑ |

a. A heterogeneity factor is used.

**ตารางที่ ๒** ค่า $LC_{๕๐}$ ๙๖ hr ของสารสกัดหยาบข่าที่ทำให้หอยหวานตายครึ่งหนึ่ง (๕๐เปอร์เซ็นต์) ภายใน ๙๖ ชั่วโมง

Confidence Limits

| Probability | | ๙๕% Confidence Limits for conc | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Estimate | Lower Bound | Upper Bound |
| PROBIT[a] | .๐๑๐ | -๗๖๕.๑๐๕ | -๑๐๒๘.๒๘๙ | -๕๗๕.๖๙๕ |
| | .๐๒๐ | -๕๘๐.๖๐๘ | -๘๐๗.๒๖๑ | -๔๑๕.๙๑๔ |
| | .๐๓๐ | -๔๖๓.๕๕๐ | -๖๖๗.๕๗๕ | -๓๑๓.๙๘๘ |
| | .๐๔๐ | -๓๗๕.๔๙๒ | -๕๖๒.๘๘๕ | -๒๓๖.๙๒๓ |
| | .๐๕๐ | -๓๐๓.๘๖๔ | -๔๗๘.๐๔๕ | -๑๗๓.๙๑๙ |
| | .๐๖๐ | -๒๔๒.๘๙๗ | -๔๐๖.๑๑๑ | -๑๒๐.๐๑๕ |
| | .๐๗๐ | -๑๘๙.๔๔๑ | -๓๔๓.๒๙๒ | -๗๒.๔๙๙ |
| dimension๑ | .๐๘๐ | -๑๔๑.๕๗๘ | -๒๘๗.๒๘๑ | -๒๙.๗๑๗ |
| | .๐๙๐ | -๙๘.๐๔๘ | -๒๓๖.๕๖๗ | ๙.๔๑๗ |
| | .๑๐๐ | -๕๗.๙๗๘ | -๑๙๐.๑๐๔ | ๔๕.๖๕๘ |
| | .๑๕๐ | ๑๐๗.๙๑๙ | -.๖๕๑ | ๑๙๘.๖๒๖ |
| | .๒๐๐ | ๒๓๙.๗๗๐ | ๑๔๕.๒๑๘ | ๓๒๔.๙๐๑ |
| | .๒๕๐ | ๓๕๒.๘๘๖ | ๒๖๕.๘๐๖ | ๔๓๗.๗๘๙ |
| | .๓๐๐ | ๔๕๔.๔๖๗ | ๓๖๙.๙๘๗ | ๕๔๓.๒๗๗ |
| | .๓๕๐ | ๕๔๘.๕๙๘ | ๔๖๓.๑๐๘ | ๖๔๔.๔๔๕ |
| | .๔๐๐ | ๖๓๗.๙๑๘ | ๕๔๘.๘๐๒ | ๗๔๓.๑๑๒ |
| | .๔๕๐ | ๗๒๔.๓๓๗ | ๖๒๙.๖๙๓ | ๘๔๐.๕๙๔ |
| | **.๕๐๐** | **๘๐๙.๓๘๖** | **๗๐๗.๗๘๒** | **๙๓๘.๐๔๙** |
| | .๕๕๐ | ๘๙๔.๔๓๔ | ๗๘๔.๗๑๒ | ๑๐๓๖.๖๖๒ |
| | .๖๐๐ | ๙๘๐.๘๕๓ | ๘๖๑.๙๗๖ | ๑๑๓๗.๗๗๐ |
| | .๖๕๐ | ๑๐๗๐.๑๗๔ | ๙๔๑.๑๐๔ | ๑๒๔๓.๐๐๓ |
| | .๗๐๐ | ๑๑๖๔.๓๐๔ | ๑๐๒๓.๘๘๒ | ๑๓๕๔.๕๑๕ |
| | .๗๕๐ | ๑๒๖๕.๘๘๖ | ๑๑๑๒.๖๗๗ | ๑๔๗๕.๓๘๙ |
| | .๘๐๐ | ๑๓๗๙.๐๐๒ | ๑๒๑๑.๐๖๐ | ๑๖๑๐.๔๘๒ |
| | .๘๕๐ | ๑๕๑๐.๘๕๒ | ๑๓๒๕.๒๔๗ | ๑๗๖๘.๔๓๙ |
| | .๙๐๐ | ๑๖๗๖.๗๕๐ | ๑๔๖๘.๓๗๗ | ๑๙๖๗.๗๒๙ |
| | .๙๑๐ | ๑๗๑๖.๘๒๐ | ๑๕๐๒.๘๗๖ | ๒๐๑๕.๙๓๕ |
| | .๙๒๐ | ๑๗๖๐.๓๔๙ | ๑๕๔๐.๓๒๙ | ๒๐๖๘.๓๒๙ |

| | | | |
|---|---|---|---|
| ๒๑๒๕.๙๖๙ | ๑๕๘๑.๔๘๒ | ๑๘๐๘.๒๑๓ | .๙๓๐ |
| ๒๑๙๐.๓๗๖ | ๑๖๒๗.๔๑๐ | ๑๘๖๑.๖๖๙ | .๙๔๐ |
| ๒๒๖๓.๘๗๑ | ๑๖๗๙.๗๕๔ | ๑๙๒๒.๖๓๖ | .๙๕๐ |
| ๒๓๕๐.๒๖๔ | ๑๗๔๑.๒๐๕ | ๑๙๙๔.๒๖๔ | .๙๖๐ |
| ๒๔๕๖.๕๓๒ | ๑๘๑๖.๖๙๑ | ๒๐๘๒.๓๒๒ | .๙๗๐ |
| ๒๕๙๗.๘๘๖ | ๑๙๑๖.๙๔๘ | ๒๑๙๙.๓๗๙ | .๙๘๐ |
| ๒๘๒๐.๘๔๔ | ๒๐๗๔.๘๐๐ | ๒๓๘๓.๘๗๗ | .๙๙๐ |

a. A heterogeneity factor is used.

**ตารางที่ ๓** ค่า $LC_{๕๐}$ ๙๖ hr ของสารสกัดหยาบใบฝรั่งที่ทำให้หอยหวานตายครึ่งหนึ่ง (๕๐เปอร์เซ็นต์) ภายใน ๙๖ ชั่วโมง

Confidence Limits

| Probability | | | ๙๕% Confidence Limits for conc | |
|---|---|---|---|---|
| | | Estimate | Lower Bound | Upper Bound |
| PROBIT[a] | | .๐๑๐ | -๓๖๕๖.๘๘๒ | -๔๘๕๙.๒๗๙ | -๒๘๑๕.๕๗๑ |
| | | .๐๒๐ | -๒๘๗๔.๘๓๐ | -๓๙๐๖.๘๕๙ | -๒๑๔๖.๕๒๕ |
| | | .๐๓๐ | -๒๓๗๘.๖๔๔ | -๓๓๐๔.๖๖๑ | -๑๗๑๙.๙๕๓ |
| | | .๐๔๐ | -๒๐๐๕.๓๘๒ | -๒๘๕๓.๑๔๖ | -๑๓๙๗.๕๖๕ |
| | | .๐๕๐ | -๑๗๐๑.๗๖๒ | -๒๔๘๗.๑๐๖ | -๑๑๓๔.๐๙๔ |
| | | .๐๖๐ | -๑๔๔๓.๓๓๔ | -๒๑๗๖.๖๓๖ | -๙๐๘.๗๕๒ |
| | | .๐๗๐ | -๑๒๑๖.๗๔๓ | -๑๙๐๕.๔๑๘ | -๗๑๐.๑๖๘ |
| | dimension๑ | .๐๘๐ | -๑๐๑๓.๘๕๘ | -๑๖๖๓.๕๒๓ | -๕๓๑.๔๑๐ |
| | | .๐๙๐ | -๘๒๙.๓๔๒ | -๑๔๔๔.๔๔๘ | -๓๖๗.๙๑๙ |
| | | .๑๐๐ | -๖๕๙.๔๙๕ | -๑๒๔๓.๖๘๙ | -๒๑๖.๕๒๖ |
| | | .๑๕๐ | ๔๓.๗๑๗ | -๔๒๔.๙๑๓ | ๔๒๒.๗๐๖ |
| | | .๒๐๐ | ๖๐๒.๖๐๘ | ๒๐๔.๗๑๗ | ๙๕๑.๘๕๓ |
| | | .๒๕๐ | ๑๐๘๒.๐๘๗ | ๗๒๓.๐๕๒ | ๑๔๒๗.๖๔๖ |
| | | .๓๐๐ | ๑๕๑๒.๖๗๔ | ๑๑๖๗.๙๖๖ | ๑๘๗๕.๔๘๙ |
| | | .๓๕๐ | ๑๙๑๑.๖๗๗ | ๑๕๖๒.๙๕๓ | ๒๓๐๗.๗๗๖ |
| | | .๔๐๐ | ๒๒๙๐.๒๙๑ | ๑๙๒๔.๔๖๐ | ๒๗๓๑.๒๗๐ |
| | | .๔๕๐ | ๒๖๕๖.๖๐๕ | ๒๒๖๔.๔๗๒ | ๓๑๕๐.๗๕๖ |
| | | **.๕๐๐** | **๓๐๑๗.๑๑๒** | **๒๕๙๒.๐๑๓** | **๓๕๗๐.๖๗๑** |
| | | .๕๕๐ | ๓๓๗๗.๖๑๘ | ๒๙๑๔.๓๓๖ | ๓๙๙๕.๘๐๕ |
| | | .๖๐๐ | ๓๗๔๓.๙๓๒ | ๓๒๓๗.๘๙๔ | ๔๔๓๑.๗๔๕ |
| | | .๖๕๐ | ๔๑๒๒.๕๔๗ | ๓๕๖๙.๒๐๔ | ๔๘๘๕.๔๓๖ |
| | | .๗๐๐ | ๔๕๒๑.๕๕๐ | ๓๙๑๕.๘๐๔ | ๕๓๖๖.๑๐๙ |
| | | .๗๕๐ | ๔๙๕๒.๑๓๖ | ๔๒๘๗.๖๕๐ | ๕๘๘๗.๐๒๑ |
| | | .๘๐๐ | ๕๔๓๑.๖๑๕ | ๔๖๙๙.๗๒๘ | ๖๔๖๙.๐๗๐ |
| | | .๘๕๐ | ๕๙๙๐.๕๐๖ | ๕๑๗๘.๑๑๐ | ๗๑๔๙.๔๖๗ |
| | | .๙๐๐ | ๖๖๙๓.๗๑๙ | ๕๗๗๗.๘๘๘ | ๘๐๐๗.๖๙๕ |
| | | .๙๑๐ | ๖๘๖๓.๕๖๖ | ๕๙๒๒.๔๗๘ | ๘๒๑๕.๒๕๘ |
| | | .๙๒๐ | ๗๐๔๘.๐๘๒ | ๖๐๗๙.๔๕๔ | ๘๔๔๐.๘๔๙ |

| | | | |
|---|---|---|---|
| .๙๓๐ | ๗๒๕๐.๙๖๗ | ๖๒๕๑.๙๔๖ | ๘๖๘๙.๐๐๙ |
| .๙๔๐ | ๗๔๗๗.๕๕๘ | ๖๔๔๔.๔๖๗ | ๘๙๖๖.๒๙๐ |
| .๙๕๐ | ๗๗๓๕.๙๘๖ | ๖๖๖๓.๘๙๓ | ๙๒๘๒.๖๗๖ |
| .๙๖๐ | ๘๐๓๙.๖๐๖ | ๖๙๒๑.๕๑๔ | ๙๖๕๔.๕๖๖ |
| .๙๗๐ | ๘๔๑๒.๘๖๗ | ๗๒๓๗.๙๙๖ | ๑๐๑๑๑.๙๘๖ |
| .๙๘๐ | ๘๙๐๙.๐๕๔ | ๗๖๕๘.๓๖๙ | ๑๐๗๒๐.๓๘๒ |
| .๙๙๐ | ๙๖๙๑.๑๐๕ | ๘๓๒๐.๒๙๘ | ๑๑๖๗๙.๙๒๒ |

a. A heterogeneity factor is used.

## ภาคผนวก ฉ.

ตารางที่ ๑ อัตราการรอดชีวิตของหอยหวานที่รักษาด้วยสารสกัดฟ้าทะลายโจร ตลอดระยะเวลา ๑๔ วัน

| ความเข้มข้นสารสกัด (ppm) | ซ้ำที่ | จำนวนหอยที่เลี้ยงเริ่มต้น | วันที่ ๑ | วันที่ ๒ | วันที่ ๓ | วันที่ ๔ | วันที่ ๕ | วันที่ ๖ | วันที่ ๗ | วันที่ ๘ | วันที่ ๙ | วันที่ ๑๐ | วันที่ ๑๑ | วันที่ ๑๒ | วันที่ ๑๓ | วันที่ ๑๔ | อัตราการรอดชีวิต (%) | ค่าเฉลี่ย |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| -ve control | ๑ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙๐ | ๘๖.๖๗ ± ๓.๓๓[a] |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙๐ | |
| +ve control | ๑ | ๑๐ | ๘ | ๗ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๕ | ๕ | ๔ | ๔ | ๔ | ๔๐ | ๔๐.๐๐ ± ๐.๐๐[bc] |
| | ๒ | ๑๐ | ๙ | ๗ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๕ | ๕ | ๕ | ๔ | ๔ | ๔ | ๔ | ๔ | ๔๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๙ | ๖ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๔ | ๔ | ๔ | ๔ | ๔ | ๔๐ | |
| ๑๘.๗๕ | ๑ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๗ | ๖ | ๖ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕๐ | ๕๓.๓๓ ± ๓.๓๓[b] |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๘ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๖ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕๐ | |
| ๓๗.๕ | ๑ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘๐ | ๖๐.๐๐ ± ๒๕.๑๗[ab] |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๘ | ๘ | ๕ | ๑ | ๑๐ | |
| ๗๕ | ๑ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๗ | ๗ | ๖ | ๖ | ๖ | ๕ | ๕ | ๕๐ | ๔๐.๐๐ ± ๑๕.๒๘[bc] |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๘ | ๗ | ๗ | ๗ | ๖ | ๓ | ๓ | ๓ | ๒ | ๒ | ๑ | ๑๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๘ | ๗ | ๗ | ๖ | ๕ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖๐ | |

| ความเข้มข้นสารสกัด (ppm) | ซ้ำที่ | จำนวนหอยที่เลี้ยงเริ่มต้น | วันที่ ๑ | วันที่ ๒ | วันที่ ๓ | วันที่ ๔ | วันที่ ๕ | วันที่ ๖ | วันที่ ๗ | วันที่ ๘ | วันที่ ๙ | วันที่ ๑๐ | วันที่ ๑๑ | วันที่ ๑๒ | วันที่ ๑๓ | วันที่ ๑๔ | อัตราการรอดชีวิต (%) | ค่าเฉลี่ย |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ๑๕๐ | ๑ | ๑๐ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗ | ๖ | ๕ | ๔ | ๒ | ๒ | ๒ | ๒๐ | ๑๓.๓๓ ± ๖.๖๗$^{c}$ |
| | ๒ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๘ | ๗ | ๖ | ๕ | ๔ | ๒ | ๒ | ๒๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๗ | ๗ | ๕ | ๔ | ๓ | ๑ | ๑ | ๐ | ๐ | |
| ๓๐๐ | ๑ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๘ | ๖ | ๕ | ๕ | ๔ | ๒ | ๒ | ๒ | ๒ | ๒ | ๒ | ๒ | ๒๐ | ๑๐.๐๐ ± ๕.๗๗$^{c}$ |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๗ | ๕ | ๔ | ๔ | ๒ | ๒ | ๑ | ๑ | ๑ | ๑ | ๑ | ๑๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๗ | ๖ | ๕ | ๔ | ๓ | ๓ | ๒ | ๑ | ๑ | ๑ | ๐ | ๐ | |
| ๖๐๐ | ๑ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๖ | ๓ | ๑ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐.๐๐ ± ๐.๐๐$^{c}$ |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๗ | ๕ | ๒ | ๑ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๘ | ๕ | ๑ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | |

หมายเหตุ : ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<๐.๐๕$)

ตารางที่ ๒ อัตราการรอดชีวิตของหอยหวานที่รักษาด้วยสารสกัดข่า ตลอดระยะเวลา ๑๔ วัน

| ความเข้มข้นสารสกัด (ppm) | ซ้ำที่ | จำนวนหอยที่เลี้ยงเริ่มต้น | วันที่ ๑ | วันที่ ๒ | วันที่ ๓ | วันที่ ๔ | วันที่ ๕ | วันที่ ๖ | วันที่ ๗ | วันที่ ๘ | วันที่ ๙ | วันที่ ๑๐ | วันที่ ๑๑ | วันที่ ๑๒ | วันที่ ๑๓ | วันที่ ๑๔ | อัตราการรอดชีวิต (%) | ค่าเฉลี่ย |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| -ve control | ๑ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘๐ | ๘๖.๖๗ ± ๓.๓๓[a] |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙๐ | |
| +ve control | ๑ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๘ | ๗ | ๖ | ๕ | ๕ | ๕ | ๔ | ๔ | ๓ | ๓ | ๓๐ | ๓๐.๐๐ ± ๕.๗๗[bc] |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๘ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗ | ๖ | ๕ | ๔ | ๓ | ๒ | ๒๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๖ | ๖ | ๕ | ๕ | ๔ | ๔๐ | |
| ๑๘.๗๕ | ๑ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๗ | ๖ | ๔ | ๔ | ๔ | ๔ | ๔ | ๔ | ๔๐ | ๒๓.๓๓ ± ๘.๘๒[c] |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๗ | ๖ | ๕ | ๔ | ๓ | ๑ | ๑๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๘ | ๗ | ๗ | ๖ | ๕ | ๓ | ๒ | ๒๐ | |
| ๓๗.๕ | ๑ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๗ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๕ | ๕ | ๔ | ๔ | ๔๐ | ๓๐.๐๐ ± ๕.๗๗[bc] |
| | ๒ | ๑๐ | ๘ | ๗ | ๗ | ๖ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๔ | ๔ | ๓ | ๓๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๘ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗ | ๕ | ๓ | ๒ | ๒ | ๒๐ | |
| ๗๕ | ๑ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๗ | ๗ | ๖ | ๕ | ๔ | ๔ | ๔ | ๔ | ๔๐ | ๒๖.๖๗ ± ๖.๖๗[c] |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๗ | ๗ | ๖ | ๖ | ๖ | ๔ | ๒ | ๒๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗ | ๖ | ๖ | ๖ | ๕ | ๔ | ๓ | ๒ | ๒๐ | |

| ความเข้มข้นสารสกัด (ppm) | ซ้ำที่ | จำนวนหอยที่เลี้ยงเริ่มต้น | วันที่ ๑ | วันที่ ๒ | วันที่ ๓ | วันที่ ๔ | วันที่ ๕ | วันที่ ๖ | วันที่ ๗ | วันที่ ๘ | วันที่ ๙ | วันที่ ๑๐ | วันที่ ๑๑ | วันที่ ๑๒ | วันที่ ๑๓ | วันที่ ๑๔ | อัตราการรอดชีวิต (%) | ค่าเฉลี่ย |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ๑๕๐ | ๑ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๘ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗ | ๖ | ๖ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕๐ | ๔๖.๖๗ ± ๓.๓๓[b] |
| | ๒ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗ | ๕ | ๕ | ๔ | ๔ | ๔ | ๔ | ๔ | ๔๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๗ | ๗ | ๖ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕๐ | |
| ๓๐๐ | ๑ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๘ | ๗ | ๖ | ๖ | ๕ | ๓ | ๓ | ๓ | ๓ | ๓ | ๓ | ๓๐ | ๒๖.๖๗ ± ๓.๓๓[c] |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๖ | ๕ | ๕ | ๕ | ๔ | ๔ | ๔ | ๔ | ๔ | ๓ | ๓ | ๓๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๖ | ๖ | ๕ | ๕ | ๓ | ๓ | ๓ | ๓ | ๒ | ๒ | ๒ | ๒๐ | |
| ๖๐๐ | ๑ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๗ | ๖ | ๖ | ๔ | ๓ | ๒ | ๑ | ๑ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐.๐๐ ± ๐.๐๐[d] |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๘ | ๗ | ๕ | ๔ | ๓ | ๒ | ๑ | ๑ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๗ | ๕ | ๕ | ๕ | ๔ | ๓ | ๑ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | ๐ | |

หมายเหตุ : ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ ๓ อัตราการรอดชีวิตของหอยหวานที่รักษาด้วยสารสกัดใบฝรั่ง ตลอดระยะเวลา ๑๔ วัน

| ความเข้มข้นสารสกัด (ppm) | ซ้ำที่ | จำนวนหอยที่เลี้ยงเริ่มต้น | วันที่ ๑ | วันที่ ๒ | วันที่ ๓ | วันที่ ๔ | วันที่ ๕ | วันที่ ๖ | วันที่ ๗ | วันที่ ๘ | วันที่ ๙ | วันที่ ๑๐ | วันที่ ๑๑ | วันที่ ๑๒ | วันที่ ๑๓ | วันที่ ๑๔ | อัตราการรอดชีวิต (%) | ค่าเฉลี่ย |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| -ve control | ๑ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙๐ | ๘๖.๖๗ ± ๓.๓๓$^{a}$ |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘๐ | |
| +ve control | ๑ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๘ | ๗ | ๖ | ๖ | ๖ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕ | ๔ | ๔ | ๔๐ | ๓๓.๓๓ ± ๓.๓๓$^{bc}$ |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๘ | ๗ | ๖ | ๖ | ๕ | ๕ | ๔ | ๔ | ๓ | ๓ | ๓ | ๓ | ๓๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๘ | ๘ | ๖ | ๕ | ๕ | ๕ | ๔ | ๔ | ๓ | ๓ | ๓ | ๓ | ๓๐ | |
| ๑๘.๗๕ | ๑ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๘ | ๗ | ๗ | ๗ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖๐ | ๕๐.๐๐ ± ๕.๗๗$^{bc}$ |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๗ | ๖ | ๖ | ๖ | ๕ | ๕ | ๕ | ๕๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๗ | ๗ | ๕ | ๕ | ๕ | ๔ | ๔ | ๔๐ | |
| ๓๗.๕ | ๑ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๗ | ๗ | ๕ | ๔ | ๓ | ๓ | ๓๐ | ๖๐.๐๐ ± ๑๕.๒๘$^{ab}$ |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗๐ | |
| ๗๕ | ๑ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗๐ | ๕๐.๐๐ ± ๑๕.๒๘$^{bc}$ |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๘ | ๘ | ๗ | ๔ | ๒ | ๒ | ๒ | ๒ | ๒ | ๒ | ๒๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๘ | ๘ | ๘ | ๗ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖๐ | |

| ความเข้มข้นสารสกัด (ppm) | ซ้ำที่ | จำนวนหอยที่เลี้ยงเริ่มต้น | วันที่ ๑ | วันที่ ๒ | วันที่ ๓ | วันที่ ๔ | วันที่ ๕ | วันที่ ๖ | วันที่ ๗ | วันที่ ๘ | วันที่ ๙ | วันที่ ๑๐ | วันที่ ๑๑ | วันที่ ๑๒ | วันที่ ๑๓ | วันที่ ๑๔ | อัตราการรอดชีวิต (%) | ค่าเฉลี่ย |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ๑๕๐ | ๑ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๗ | ๗ | ๗๐ | ๔๖.๖๗ ± ๒๓.๓๓[bc] |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗ | ๗๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๗ | ๗ | ๕ | ๔ | ๒ | ๐ | ๐ | |
| ๓๐๐ | ๑ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๘ | ๖ | ๕ | ๕ | ๔ | ๔ | ๓ | ๒ | ๒ | ๒๐ | ๑๓.๓๓ ± ๓.๓๓[c] |
| | ๒ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๘ | ๗ | ๗ | ๗ | ๕ | ๔ | ๓ | ๓ | ๒ | ๒ | ๑ | ๑๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๘ | ๘ | ๘ | ๕ | ๔ | ๓ | ๒ | ๒ | ๑ | ๑ | ๑ | ๑๐ | |
| ๖๐๐ | ๑ | ๑๐ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘๐ | ๖๐.๐๐ ± ๑๑.๕๕[ab] |
| | ๒ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๘ | ๖ | ๔ | ๔๐ | |
| | ๓ | ๑๐ | ๑๐ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๙ | ๘ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖ | ๖๐ | |

หมายเหตุ : ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

## ภาคผนวก ช.

ตารางที่ ๑ คุณภาพน้ำในพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ทำการสุ่มตรวจวัดตลอดระยะเวลาการทดลอง

| พารามิเตอร์ (หน่วย) | ค่าเฉลี่ยที่ตรวจวัดคุณภาพน้ำในแต่ละชุดการทดลอง | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | สารสกัดฟ้าทะลายโจร | | | | | สารสกัดข่า | | | | | สารสกัดใบฝรั่ง | | | | |
| วันที่เก็บตัวอย่างน้ำ | ๑ | ๓ | ๖ | ๙ | ๑๒ | ๑ | ๓ | ๖ | ๙ | ๑๒ | ๑ | ๓ | ๖ | ๙ | ๑๒ |
| อุณหภูมิน้ำ (°C) | ๒๘.๐๕ | ๒๗.๕๕ | ๒๗.๑๐ | ๒๘.๑๕ | ๒๗.๔๕ | ๒๗.๐๕ | ๒๘.๑๐ | ๒๗.๕๐ | ๒๗.๑๐ | ๒๘.๐๕ | ๒๗.๕๐ | ๒๗.๑๕ | ๒๘.๑๕ | ๒๗.๕๐ | ๒๗.๒๕ |
| ความเค็ม (psu) | ๒๙ | ๓๐ | ๓๑ | ๓๐ | ๓๐ | ๓๑ | ๓๐ | ๓๑ | ๓๑ | ๓๐ | ๓๐ | ๓๑ | ๓๐ | ๓๐ | ๓๑ |
| pH | ๘.๒๐ | ๘.๐๐ | ๗.๙๐ | ๘.๒๐ | ๘.๑๐ | ๘.๐๐ | ๘.๒๐ | ๘.๐๐ | ๘.๐๐ | ๘.๐๐ | ๘.๑๐ | ๘.๐๐ | ๘.๑๐ | ๘.๐๐ | ๘.๑๐ |
| DO (mg/l) | ๕.๔๔ | ๕.๘๓ | ๖.๐๒ | ๕.๕๔ | ๕.๙๑ | ๖.๐๗ | ๕.๕๔ | ๕.๘๔ | ๖.๐๐ | ๕.๔๙ | ๕.๗๔ | ๕.๙๙ | ๕.๕๐ | ๕.๘๔ | ๖.๐๐ |
| Alkalinity (mg/l) | ๑๐๗ | ๑๑๒ | ๑๑๘ | ๑๐๙ | ๑๑๒ | ๑๑๗ | ๑๑๐ | ๑๑๒ | ๑๑๘ | ๑๐๘ | ๑๑๐ | ๑๑๕ | ๑๐๙ | ๑๑๘ | ๑๑๗ |
| Ammonia (µg at N/L) | ๑.๔๐๙ | ๒.๙๓๒ | ๒.๕๐๒ | ๓.๑๒๒ | ๓.๑๑๓ | ๑.๕๗๐ | ๒.๑๙๐ | ๒.๑๓๖ | ๓.๒๔๙ | ๓.๒๑๓ | ๑.๘๑๙ | ๒.๕๖๖ | ๓.๐๓๒ | ๓.๕๙๐ | ๓.๐๗๗ |

ตารางที่ ๒ ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทะเลตามประเภทการใช้ประโยชน์

| พารามิเตอร์ | หน่วย | วิธีการตรวจสอบ | ประเภทการใช้ประโยชน์ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ประเภทที่ ๑ | ประเภทที่ ๒ | ประเภทที่ ๓ | ประเภทที่ ๔ | ประเภทที่ ๕ | ประเภทที่ ๖ |
| ๑.อุณหภูมิ (Temperature) | องศาเซลเซียส | ๑) Thermometer<br>๒) Electrical Sensor Method | เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นไม่เกิน ๑ | ไม่เปลี่ยนแปลง | เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นไม่เกิน ๑ | เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นไม่เกิน ๒ | | |
| ๒.ความเป็นกรดและด่าง (pH) | - | pH meter | ๗.๐ - ๘.๕ | | | | | |
| ๓.ความเค็ม (Salinity) | | ๑) Argentometric<br>๒) Electrical Conductivity Method<br>๓) Density<br>๔) Refractometer | เปลี่ยนแปลงได้ไม่เกินกว่า ๑๐% ของค่าต่ำสุด | | | | | |
| ๔.ออกซิเจนละลาย (DO) | mg/l | ๑) Azide Modification Method<br>๒) Membrane Electrode Method<br>๓) Wrinkler Method | ไม่น้อยกว่า ๔ | ไม่น้อยกว่า ๖ | ไม่น้อยกว่า ๔ | | | |
| ๕.ไนเตรท-ไนโตรเจน ($NO_3$-N) | ug - N/l | Cadmium Reduction Method เป็น NO ๒- แล้วใช้ Colorimetric Method | ไม่เกิน ๒๐ | ไม่เกิน ๖๐ | | | | |
| ๖.ฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส ($PO_4$-P) | ug - P/l | Colorimetric Method | ไม่เกิน ๑๕ | | ไม่เกิน ๔๕ | ไม่เกิน ๑๕ | ไม่เกิน ๔๕ | |
| ๗.แอมโมเนียไนโตรเจน ($NH_3$-N) | ug - N/l | Phenol-Hypochlorite Method | ไม่เกิน ๗๐ | | ไม่เกิน ๑๐๐ | ไม่เกิน ๗๐ | | |

แหล่งที่มา: ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ ๒๗ (พ.ศ. ๒๕๔๙) กรมควบคุมมลพิษ

# ประวัตินักผู้วิจัยและคณะ

นักวิจัยหลัก :

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวทิพวรรณ ตัณฑวณิช
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Tippawan Tantawanich
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน ๓ ๘๑๙๙ ๐๐๐๔๒ ๐๔๐
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย P๗
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

   สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง ๑๔๙ หมู่ ๓ ตำบลท่าเทววงษ์ อำเภอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี โทรศัพท์ ๐๓๘-๒๑๖-๑๙๘ โทรสาร ๐๓๘-๒๑๖-๓๕๐

   สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารสถาบัน ๓ ชั้น ๙ แขวงวังใหม่ ถนนพญาไท เขตปทุมวัน จังหวัดกรุงเทพฯ ๑๐๓๓๐

   โทรศัพท์ ๐๒-๒๑๘-๘๑๖๐ โทรสาร ๐๒-๒๕๔-๔๒๕๙

   E-mail: tippawan.t@chula.ac.th, ttippawan.๕๐@gmail.com
5. ประวัติการศึกษา

| มหาวิทยาลัย | ปริญญา | สาขาวิชา | ปีที่ได้รับ |
|---|---|---|---|
| Asian Institute of Technology (AIT) | M.Sc. | Aquaculture and Aquatic Resources Management | ๒๕๔๙ |
| มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ | วท.บ (ประมง) | ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ | ๒๕๔๕ |

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) สาขาวิชาการ เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และนิเวศวิทยา
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

   ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -

   หัวหน้าโครงการวิจัย :

   โครงการวิจัย "Effect of stocking density and shelter surface area on growth and survival of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) in a semi-flow through system"

   โครงการวิจัย "ประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อวิบริโอ (*Vibrio* spp.) ที่ทำให้เกิดโรคในหอยเป๋าฮื้อไทยชนิด *Haliotis asinina* LINNAEUS ๑๗๕๘"

   แหล่งทุน : คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) งบแผ่นดิน ประจำปี ๒๕๕๒

**งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน**

**Tantawanich, T.,** Jongjareanjai, M. and Koeypudsa, W. ๒๐๐๙. Efficiency of Antibiotics Against *Vibrio* spp. Isolated from Diseased Tropical Abalone *Haliotis asinina* LINNAEAUS ๑๗๕๘. The ๗th International Abalone Symposium ๑๙-๒๔ July, ๒๐๐๙. Napalai E room, Dusit Thani Pattaya, Chonburi, Thailand. Reference code number P-๐๓, Proceeding page : ๖๓.

W. Koeypudsa, M. Kitkamthorn, N. Chaitanawisuti, A. Kritsanapuntu, **T. Tantawanich** and J. Tangtrongptros. ๒๐๐๘. Natural Infection on Farmed Spotted Babylon (*Babylonia areolata* Link ๑๘๐๗). The ๑๕th Congress of the Federation of Asian Veterinary Associations, FAVA & OIE Symposium ๒๗-๓๐ October ๒๐๐๘. Regency room, ๔th floor, Sofitel Centara Grand & Bangkok Convention Center, Bangkok ๑๐๙๐๐, Thailand. Reference code number PC๑๐๑, Proceeding pages : ๑๓๗-๑๓๘.

**Tantawanich, T.,** Wenresti, G.G., Ikejima, K., Ganmanee, M. and Jarayabhand, P. ๒๐๐๗. Effect of stocking density and shelter surface area on growth and survival of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) in a semi-flow through system. Journal of Fisheries Technology Research, Maejo University. ๑(๒); p ๑๐๐-๑๑๑.

โครงการวิจัย "ครุวิจัย-วิทยาศาสตร์ทางทะเล ปี ๔๙-๕๒" แหล่งทุน: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

โครงการวิจัย "การจัดทำกลยุทธ์และแนวทางการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและพืชน้ำเศรษฐกิจของประเทศไทย" แหล่งทุน : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

โครงการวิจัย "ผลของความหนาแน่นและวัสดุหลบซ่อนที่มีต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของหอยเป๋าฮื้อไทย *Haliotis asinina* LINNAEUS ๑๗๕๘ ที่เลี้ยงในระบบการทำฟาร์มบนบกในระบบน้ำหมุนเวียนแบบกึ่งปิด" แหล่งทุน: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

**งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด**

โครงการวิจัย "ความหลากหลายและการกระจายของฟองน้ำ เพรียงหัวหอมและปะการังอ่อน บริเวณเกาะสีชัง" แหล่งทุน: คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) งบแผ่นดิน ประจำปี ๒๕๕๒
สถานภาพโครงการ: ๘๐%

โครงการวิจัยย่อย "การศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายของสัตว์ทะเลหน้าดินและสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็กในบริเวณเกาะแสมสารและเกาะสีชัง" ภายใต้ชุดโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) สนองพระราชดำริ แหล่งทุน: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี ๒๕๕๓
สถานภาพโครงการ: ๓๐%

ผู้ร่วมวิจัย :

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวมาลินี จงเจริญใจ
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Malinee Jongjareanjai
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

   ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพ ๑๐๓๓๐

   หมายเลขโทรศัพท์ ๐-๒๒๑๘-๙๕๑๒

   หมายเลขโทรศัพท์ ๐-๒๒๕๑-๘๘๘๗

   E-mail : malinee๑๐@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

| ปริญญา | สาขาวิชา | มหาวิทยาลัย | ปี พ.ศ. ที่ได้รับ |
|---|---|---|---|
| วท.บ. | วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีชีวภาพ | มหาวิทยาลัยขอนแก่น | ๒๕๓๖ |
| วท.ม. | วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีชีวภาพ | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี | ๒๕๔๐ |

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

สุขภาพสัตว์น้ำ, จุลชีววิทยา

๗. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน

Koeypudsa,W. and **Jongjareanjai, M.** (๒๐๑๐) Effect of Water Temperature on Hematology and Virulence of *Aeromonas hydrophila* in Hybrid Catfish (Clarias gariepinus Burchell x C.macrocephalus Gunther) Thai J.Vet. Med. ๔๐(๒) : ๑๗๙-๑๘๖.

**Jongjareanjai, M.**, Assawawongkasem,N.,Chansue,N.,๒๐๐๙ (๒๕๕๒) In vitro Antibiotic Susceptibility of Aeromonas hydrophila Isolated from Disease Ornamental Fish. TJVM.๓๙(๓) : ๒๒๕-๒๒๙.

Koeypudsa, W., **Kitkamthorn, M.** and Tangtrongpiros, J. ๒๐๐๖ (๒๕๔๙). Impact of Acute Anoxia on Stress in Hybrid Catfish (*Clarias gariepinus Burchell* x *C.macrocephalus Gunther*). J. Sci. Res. Chula. Univ., ๓๑(๒) : ๑๒๗-๑๓๒.

Koeypudsa, W., Sailasuta, A., **Kitkamthorn, M.** and Sadu, K. ๒๐๐๖ (๒๕๔๙). Histopathological Studies on Anoxia and Hypoxia in Catfish. Proceeding Ann. Con. Vet. Sci. Chula., Meeting ๒๗-๒๘ April, ๒๐๐๖. T. J.V.M. ๓๖(๑): ๘๐.

อรัญญา พลพรพิสิฐ จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ อัจฉริยา ไศละสูต นันทริกา ชันซื่อ วีณา เคยพุดซา ชาญณรงค์ รอดคำ สุภาพ เหมืองแก้ว ประพฤติดี ปิยะวิริยะกุล สุจินต์ ศิริสวัสดิ์ ชัยรัตน์ ชุ้มกอทอง **มาลินี กิตกำธร** นพดล พิฬารัตน์. ๒๐๐๗ (๒๕๕๐). การศึกษาสาเหตุการตายของปลาน้ำจืดที่เกิดจากภาวะมลพิษในแม่น้ำเจ้าพระยา. การประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ ๓๓ โดยสัตวแพทยสมาคมฯ ๓๑ ต.ค.-๒ พ.ย. ๒๕๕๐ โรงแรมโซฟิเทล เซนทารา แกรนด์ กรุงเทพฯ หน้า ๒๑๓.

Koeypudsa, W., **Kitkamthorn, M.**, Sadu, K., and Salisuta, A. ๒๐๐๗ (๒๕๕๐). Effect of short term Anoxia (DO ๐ ppm, ๓ hours) and long term Hypoxia (DO ๓-๔ ppm, ๙๐ days) on hematology of catfish. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์, ๒๑ (๑): ๑๓-๒๓.

วีณา เคยพุดซา **มาลินี กิตกำธร** จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และ นิลนาจ ชัยธนาวิสุทธิ์. ๒๐๐๘ (๒๕๕๑). ปริมาณแบคทีเรียจากการเลี้ยงหอยหวาน (*Babylonia areolata*) ระยะพ่อ-แม่พันธุ์ในบ่อซีเมนต์. สัตวแพทยสาร ๕๙(๑-๒), ๔๗-๕๗.

วีณา เคยพุดซา **มาลินี กิตกำธร** จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และ นิลนาจ ชัยธนาวิสุทธิ์. ๒๐๐๙ (๒๕๕๒). ปริมาณแบคทีเรียจากการเลี้ยงหอยหวาน (*Babylonia areolata*) ในบ่อซีเมนต์. *In-press* (Accepted for publication)

วีณา เคยพุดซา **มาลินี กิตกำธร** จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และ นิลนาจ ชัยธนาวิสุทธิ์. ๒๐๐๙ (๒๕๕๒). ปริมาณแบคทีเรียจากการเลี้ยงหอยหวาน (*Babylonia areolata*) วัยอ่อน-ขนาดตลาดในบ่อซีเมนต์. *In-press* (Accepted for publication)

**งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด**

โครงการการพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูปในการแยกเพศปลาอะโรวาน่า **แหล่งทุน:** สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (สวก.) ปี ๒๕๕๒-๒๕๕๕

โครงการ เรื่องการแก้ไขปัญหาโรคขี้ขาวในกุ้งทะเลเลี้ยง **แหล่งทุน:** คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปี ๒๕๕๔-๒๕๕๕

ผู้ร่วมวิจัย :

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ผศ.ดร.วีณา เคยพุดซา
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Assist.Prof.Dr. Weena Koeypudsa
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน ๕๒๐๐๑๐๐๐๐๔๐๖๖
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ระดับ ๘
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพ ๑๐๓๓๐

Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn Univerisity, Bangkok ๑๐๓๓๐.

หมายเลขโทรศัพท์ ๖๖๒-๒๕๑๘๘๘๗, ๖๖๒-๒๕๒๙๕๗๕, ๖๖๒-๒๑๘๙๕๑๐, ๖๖๒-๒๑๘๙๔๑๒

หมายเลขโทรสาร ๖๖๒-๒๕๑๘๘๘๗, ๖๖๒-๒๕๒๙๕๗๕

E-mail: kweena@hotmail.com, kweena@chula.ac.th

๕. ประวัติการศึกษา

| มหาวิทยาลัย | ปริญญา | สาขาวิชา | ปีที่ได้รับ |
|---|---|---|---|
| Asian Institute of Technology (AIT) | D.Tech.Sc. | Aquaculture and Agriculture Resources Management | ๒๕๔๘ |
| มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ | วท.ม (ประมง) | ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ | ๒๕๓๙ |
| มหาวิทยาลัยบูรพา (มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ) | วท.บ | ชีววิทยา | ๒๕๒๘ |

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

สุขภาพสัตว์น้ำ, คุณภาพน้ำและดินในการเพาะเลี้ยง และPond dynamic

๗. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

**วีณา เคยพุดซา**, นันทริกา อิศรศักดิ์ ณ อยุธยา และ จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. (๒๕๓๒). การศึกษาคุณภาพของน้ำทะเลทางฟิสิกส์-เคมี เมื่อผ่านการเติมก๊าซโอโซนในระบบปิดแบบหมุนเวียน. ประมวลประชุมทางวิชาการเรื่องโรคใหม่ที่ทำความเสียหายในกุ้งกุลาดำ. ๖๔-๖๗.

**วีณา เคยพุดซา** และ จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. (๒๕๓๘). ประสิทธิภาพของยาฆ่าเชื้อ ($I_2$ ๒.๐ + PVP ๐.๕) ในการหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย. ข่าวสารริมบ่อ บริษัทไลฟ์สต๊อกอกรีคัลเจอรัล บิซิเนส อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด ฉบับที่ ๓. ๒-๕.

**วีณา เคยพุดซา,** นนทวิทย์ อารีย์ขน และ จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. (๒๕๓๙). การศึกษาการใช้วัคซีนป้องกันโรควิบริโอซีสในปลากะพงขาว. ประมวลประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ครั้งที่ ๒๓ สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ๒๗-๒๙ พฤศจิกายน ๒๕๓๙ โรงแรมเรดิสัน. ๒๑๕-๒๒๓.

**วีณา เคยพุดซา,** จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, นันทริกา ชันซื่อ และเจนนุช ว่องธวัชชัย. (๒๕๔๒). การศึกษาชนิดและปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากลำไส้ใหญ่ส่วนท้ายของตะพาบน้ำ. ประชุมวิชาการ ครั้งที่ ๓๗ ณ อาคารอินทรีย์จันทรสถิตย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ๓-๕ กุมภาพันธ์ ๒๕๔๒. ๒๐๘-๒๑๓.

**วีณา เคยพุดซา.** (๒๕๔๗). การศึกษาชนิดตะกอนดินและคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งและบ่อพักน้ำจากจังหวัดฉะเชิงเทรา. วารสารการประมง ๕๗(๓), ๒๑๓-๒๑๗.

**Koeypudsa, Weena**, Amararatne Yakupitiyage and Jirasak Tangtrongpiros. (๒๐๐๕). The fate of chlortetracycline residues in a simulated chicken-fish integrated farming system. Aquaculture Research, ๓๖(๖), ๕๗๐-๕๗๗.

**7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน**

Tangtrongpiros, Jirasak and **Weena Koeypudsa.** (๑๙๘๙). The use of Flumiquine for treatment of bacterail infection in Giant Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*) and Seabass (*Lates calcarifer*). Thai J. Vet. Med. ๑๓(๔); ๑๘๑-๑๙๓.

นันทริกา อิศรศักดิ์ ณ อยุธยา, **วีณา เคยพุดซา,** วรพงษ์ วงษ์สำราญ, สุจิตรา แซ่ตัน และจิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. (๒๕๓๒). การศึกษาผลทางเชื้อแบคทีเรียของน้ำทะเลที่ผ่านก๊าซโอโซน: แนวทางการนำไปใช้ในฟาร์มเพาะฟักกุ้งกุลาดำ. ประมวลประชุมทางวิชาการ เรื่อง โรคใหม่ที่ทำความเสียหายในกุ้งกุลาดำ. ๓๙-๕๔.

นันทริกา อิศรศักดิ์ ณ อยุธยา, **วีณา เคยพุดซา** และจิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. (๒๕๓๒). ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำและอัตรารอดของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนในการเพาะเลี้ยงโดยยระบบปิดผ่านก๊าซโอโซนแบบหมุนเวียน. ประมวลประชุมทางวิชาการเรื่องโรคใหม่ที่ทำความเสียหายในกุ้งกุลาดำ. ๕๕-๖๓.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, **วีณา เคยพุดซา,** อรัญญา พลพรพิสิฐ และ นราทิพย์ ม่วงแสง. (๒๕๓๔). โรคที่เกิดจากเชื้อไมโครสปอริเดียนในกุ้งกุลาดำ. รายงานวิจัยประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ครั้งที่ ๑๘ สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ๔-๖ พย. ๓๔ โรงแรมเอเชีย. ๑๙๑-๑๙๘.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, นันทริกา อิศรศักดิ์ ณ อยุธยา, **วีณา เคยพุดซา** และ อรัญญา พลพรพิสิฐ. (๒๕๓๔). ผลของเบซิเตซิน เมทิลีนไดซาลิไซเลท ซิงค์เบซิเตซิน (BMD) และแอสต้าแซนทีน (AS) ต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ. รายงานวิจัยประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ครั้งที่ ๑๘ สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ๔-๖ พย. ๓๔ โรงแรมเอเชีย. ๒๐๑-๒๑๓

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, สมภพ รุ่งสุภา, **วีณา เคยพุดซา** และ เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต. (๒๕๓๔). การเพิ่มผลผลิตปลากะพงขาวโดยใช้วิธีป้องกันโรคด้วยวัคซีนต้านเชื้อแบคทีเรีย I: ชนิดของเชื้อ

แบคทีเรีย. ประมวลประชุมวิชาการเรื่องทรัพยากรสิ่งมีชีวิตทางน้ำครั้งที่ ๓ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ๑๗-๑๘ มค. ๓๔. ๔๔๗-๔๕๓.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, สมภพ รุ่งสุภา, **วีณา เคยพุดซา** และ เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต. (๒๕๓๔). การเพิ่มผลผลิตปลากะพงขาวโดยใช้วิธีป้องกันโรคด้วยวัคซีนต้านเชื้อแบคทีเรีย II: การใช้วัคซีนป้องกันโรควิบริโอซีสในลูกปลากะพงขาว. ประมวลประชุมวิชาการเรื่องทรัพยากรสิ่งมีชีวิตทางน้ำครั้งที่ ๓ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ๑๗-๑๘ มค. ๓๔. ๔๕๔-๔๖๑.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, นันทริกา อิศรศักดิ์ ณ อยุธยา, **วีณา เคยพุดซา** และ อรัญญา พลพรพิสิฐ. (๒๕๓๔). คุณภาพน้ำทางจุลชีววิทยาของน้ำทะเลรอบเกาะภูเก็ต (๒๕๓๓-๒๕๓๔). ประมวลประชุมวิชาการเรื่อง การจัดการสภาวะแวดล้อมในทศวรรษหน้า. สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ๒๑-๒๒ พฤศจิกายน ๒๕๓๔. อาคารปาฐศาลา. เอกสารหมายเลข ๒๔ หน้า ๑-๑๓.

Issarasak, Nantarika, Jirasak Tangtrongpiros, **Weena Koeypudsa** and Aranya Ponpornpisit. (๑๙๙๒) Bacterial flora in normal *Peneaus monodon* broodstock. Proc. of International Association for Aquatic Animal Medicine ๑๙๙๒ Conference. Ocean Park, Hong Kong; ๕๔-๕๙.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และ **วีณา เคยพุดซา**. (๒๕๓๕). โรคขาแดงในกบ. ประมวลประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ครั้งที่ ๑๙ ประจำปี ๒๕๓๕. โรงแรม สยามซิตี. ๘๘-๘๙.

นันทริกา โพธิปักษ์, จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, **วีณา เคยพุดซา** และ อรัญญา พลพรพิสิฐ. (๒๕๓๕). การศึกษาเปรียบเทียบอัตราการกลืนทำลาย (Phagocytosis) ระหว่างยีสต์เป็นและยีสต์ตายของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ (*Peneaus monodon*) ประมวลประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ครั้งที่ ๑๙ ประจำปี ๒๕๓๕. โรงแรมสยามซิตี. ๑๐๘-๑๐๙.

อรัญญา พลพรพิสิฐ, **วีณา เคยพุดซา** และ จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. (๒๕๓๕). ค่าโลหิตวิทยาเปรียบเทียบระหว่างปลาดุกปกติและปลาดุกตัวเหลือง. วารสารโรคสัตว์น้ำ ๑๓(๑); ๙-๑๔.

ระบิล รัตนพานี และ **วีณา เคยพุดซา**. (๒๕๓๖). จุลกายวิภาคของโรคที่เกิดจากเชื้อวิบริโอในกุ้งกุลาดำ. วารสารโรคสัตว์น้ำ ๑๔(๑); ๓๒-๓๙.

Tangtrongpiros, Jirasak, **Weena Koeypudsa** and Mati Nitibhon. (๑๙๙๓). Vaccination of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus & C. gariepinus*) against Aeromonas infection: preliminary results. Second Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. ๒๕-๒๙ Oct. ๑๙๙๓. ๙๒.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, ระบิล รัตนพานี, นิคม ชัยศิริ, วรา พานิชเกรียงไกร, สุมลยา กาญจนพังคะ, สุพัตรา ศรีชัยรัตน์, นันทริกา ชันชื่อ, **วีณา เคยพุดซา**, อัจฉรา ธวัชสิน, ภาณุมาศ เรือนทองดี, สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล และ สมภพ รุ่งสุภา. (๒๕๓๗). ผลของมลภาวะแวดล้อมต่อกุ้งและปลาทะเลที่เพาะเลี้ยงที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย. เทคโนโลยีชีวภาพกับความหลากหลายทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ วันที่ ๘-๙ กย. ๓๗. โรงแรมรอยัลออร์คิด เชอราตัน. ๒-๔๑.

Tangtrongppiros, Jirasak, Somkiat Piyatiratitivorakul, Rabin Rattanapphanee, Nikom Chaisiri, Vara Panichkriengkrai, Sumolya Kanchanapangka, Supatra Srichairat, Nantarika Chansue, Achara Tawatsin, **Weena Koeypudsa**, Panumas

Ruantongdee and Sompop Rungsupa. (๑๙๙๗). Effects of Methyl Parathion on Shellfish Culture Important to Economy of Thailand. Shrimp Biotechnology in Thailand. BIOTEC Publication ๒/๒๕๔๐. ๒๒๙-๒๔๔.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์,นันทริกา ขันซื่อ และ**วีณา เคยพุดซา**. (๒๕๔๑). การศึกษาผลของฟอร์มาลิน ,คอปเปอร์ซัลเฟต และมาลาไคท์กรีนในระดับต่างๆกันต่อลูกกุ้งกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) อายุ ๔๐ วัน. ประมวลการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ ๒๔ และการประชุมวิชาการบำบัดโรคสัตว์เล็ก ครั้งที่ ๔ ประจำปี ๒๕๔๑ ในวาระฉลอง ๕๐ ปี สัตวแพทยสมาคมฯ. ๕-๗ สิงหาคม ๒๕๔๑. ณ บางกอกคอนเวนชั่นเซนเตอร์ โรงแรมเซนทรัลพลาซ่า ลาดพร้าว กทม. ๑๑๗-๑๒๓.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์,นันทริกา ขันซื่อ และ**วีณา เคยพุดซา**. (๒๕๔๑). การใช้ Oxytetracycline, Ampicillin, Chloramphenicol, Erythromycin และ Trimethroprim & Sulfadiazine ในการป้องกันโรคในลูกกุ้งกุลาดำ. ประมวลการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ ๒๔ และการประชุมวิชาการบำบัดโรคสัตว์เล็ก ครั้งที่ ๔ ประจำปี ๒๕๔๑ ในวาระฉลอง ๕๐ ปี สัตวแพทยสมาคมฯ. ๕-๗ สิงหาคม ๒๕๔๑. ณ บางกอกคอนเวนชั่นเซนเตอร์ โรงแรมเซนทรัลพลาซ่า ลาดพร้าว กทม. ๑๒๔-๑๓๑.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์,นันทริกา ขันซื่อ และ**วีณา เคยพุดซา**. (๒๕๔๑). การตรวจหายาออกโซลินิกแอซิดและออกซีเตตร้าซัยคลีนในเนื้อกุ้งก้ามกราม กุ้งแชบ๊วย และกุ้งกุลาดำ. ประมวลการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ ๒๔ และ การประชุมวิชาการบำบัดโรคสัตว์เล็ก ครั้งที่ ๔ ประจำปี ๒๕๔๑ ในวาระฉลอง ๕๐ ปี สัตวแพทยสมาคมฯ. ๕-๗ สิงหาคม ๒๕๔๑. ณ บางกอกคอนเวนชั่นเซนเตอร์ โรงแรมเซนทรัลพลาซ่า ลาดพร้าว กทม. ๑๓๒-๑๔๐.

นันทริกา ขันซื่อ,จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และ**วีณา เคยพุดซา**. (๒๕๔๑). ความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงและสารปราบศัตรูพืชที่มีผลต่ออัตราการตายของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน. ประมวลการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ ๒๔ และ การประชุมวิชาการบำบัดโรคสัตว์เล็ก ครั้งที่ ๔ ประจำปี ๒๕๔๑ ในวาระฉลอง ๕๐ ปี สัตวแพทยสมาคมฯ. ๕-๗ สิงหาคม ๒๕๔๑. ณ บางกอกคอนเวนชั่นเซนเตอร์ โรงแรมเซนทรัลพลาซ่า ลาดพร้าว กทม. ๑๔๖-๑๕๒.

ชลิดา ชมานนท์, สมภพ รุ่งสุภา, มณฑิรา ถาวรยุติการต์ และ**วีณา เคยพุดซา**. (๒๕๔๑). การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดง ดวงขาวในกุ้งกุลาดำ ประชุมวิชาการ ครั้งที่๓๖ ณ อาคารอินทรีย์จันทรสถิตย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (CD)

Tangtrongppiros, Jirasak, Nantarika Chansue and **Weena Koeypudsa**. (๑๙๙๘) The effect of methyl parathion on Immune response of giant black tiger shrimp (*Peneas monodon*). The First Seminar between Japan & Thailand in Fisheries Science: Special reference to fish diseases, ๙-๑๐ November ๑๙๙๘ Kasetsart University, Bangkok, Thailand. ๑๒๕-๑๓๐p.

นันทริกา ขันซื่อ, จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ **วีณา เคยพุดซา,** และเจนนุช ว่องธวัชชัย. (๒๕๔๒). พยาธิวิทยาคลินิกของปลาทองที่มีอาการของโรคท้องบวม. ประชุมวิชาการ ครั้งที่ ๓๗ ณ อาคารอินทรีย์จันทรสถิตย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ๓-๕ กุมภาพันธ์ ๒๕๔๒. ๑๑๙-๒๐๓.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, นันทริกา ชันซื่อ, **วีณา เคยพุดซา,** และเจนนุช ว่องธวัชชัย. (๒๕๔๒). อัตรารอดของกุ้งกุลาดำในน้ำที่มีความเค็มต่ำ. ป ระชุมวิชาการ ครั้งที่ ๓๗ ณ อาคารอินทรีย์จันทรสถิตย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ๓-๕ กุมภาพันธ์ ๒๕๔๒. ๒๐๔-๒๐๗.

ชลิดา ชมานนท์, สมภพ รุ่งสุภา, มณฑิรา ถาวรยุติการต์ และ**วีณา เคยพุดซา**. (๒๕๔๒). การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ. ประชุมวิชาการ ครั้งที่ ๓๗ ณ อาคารอินทรีย์จันทรสถิตย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ๓-๕ กุมภาพันธ์ ๒๕๔๒. ๒๓๓-๒๓๙.

**7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด**

7.4.1 การใช้ใบหูกวาง(*Terminalia catappa)* เพื่อรักษาโรคในปลากัด*(Betta splendens)* และปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*)

7.4.2 ค่าทางโลหิตวิทยาและจุลพยาธิวิทยาของปลาดุกเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนในน้ำต่ำ

7.4.3 ผลของคุณภาพน้ำที่ก่อให้เกิดความเครียดต่อปลา

7.4.4 โครงการสร้างระบบการจัดการเลี้ยงสัตว์น้ำด้วยกระบวนการเกษตรอินทรีย์