รายงานการวิจัย

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเสม็ดขาวในการควบคุมเชื้อก่อโรคในการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopeneaus vannamei*

Efficacy of cajuputi tree (*Melaleuca cajuputi*) extracts for controlling pathogenic microorganisms in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) pond culture

สุนันทา ข้องสาย Sunanta Khongsai
ชาคริยา ฉลาด Chakriya Chalad
ปรีดา ภูมี Preeda Phumee
เนตรนภา สุจริต Netnapa Sutjarit

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบประมาณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม
ประจำปี พ.ศ. 2565

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณเงินกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ประจำปี พ.ศ. 2565 เป็นงานวิจัยพื้นฐานเพื่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ในการประเมินความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาสารสกัดจากใบเสม็ดขาวเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ ตลอดจนผลการวิจัยสามารถใช้เป็นแนวทางส่งเสริมให้เกิดนวัตกรรมทางความรู้เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มของเกษตรด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ขอขอบคุณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัยนี้ ขอขอบคุณสาขาศึกษาทั่วไป สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์ประมง ศูนย์วิสาหกิจศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง ที่ให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือวิเคราะห์ ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์พื้นที่งานฟาร์มในการวิจัย ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยที่อุทิศกำลังกายและกำลังใจช่วยให้การทำวิจัยครั้งนี้ลุล่วงได้ด้วยดี ตลอดจนครอบครัวและผองเพื่อนที่ให้ความห่วงใย เป็นกำลังใจให้เสมอมา ประโยชน์อันใดที่เกิดจากงานวิจัยนี้ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของท่านและหน่วยงานดังกล่าว ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

สุนันทา ข้องสาย
ชาคริยา ฉลาด
ปรีดา ภูมี
เนตรนภา สุจริต
กุมภาพันธ์ 2566

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเสม็ดขาวในการควบคุมเชื้อก่อโรคในการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopeneaus vannamei*)

สุนันทา ข้องสาย[1*] ชาคริยา ฉลาด[1] ปรีดา ภูมี[2] และเนตรนภา สุจริต[3]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดใบเสม็ดขาวในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในการเลี้ยงกุ้งขาว ศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ในการป้องกันโรคในการเลี้ยงกุ้งขาวเพื่อพัฒนาการเลี้ยงกุ้งโดยใช้สารธรรมชาติที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม โดยทำการสกัดใบเสม็ดขาวด้วยตัวทำละลายเอทานอล ระเหยตัวทำละลาย และทำแห้งด้วยเทคนิค freeze dry นำผงสารสกัดที่ได้มาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ระดับความเข้มข้น 300 ppm พบว่าสารสกัดที่ละลายด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลกับน้ำในอัตราส่วน 8:2 สามารถละลายได้ดีที่สุด มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ นำมาเลี้ยงกุ้งโดยผสมกับอาหารสำเร็จรูปในอัตราส่วน 50 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ผลการตรวจติดตามคุณภาพน้ำในระบบเลี้ยงและสุขภาพกุ้งขาวพบว่าคุณภาพน้ำในระบบเลี้ยงทั้ง 2 ชุดการทดลองอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด สุขภาพกุ้งขาวชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมสกัดมีความสมบูรณ์ของตับ มีเม็ดไขมันในตับที่สมบูรณ์ มีปริมาณเม็ดเลือดรวม และค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดสมากกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้ให้อาหารเสริมสารสกัด พบปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคโลนีสีเขียว และโคโลนีสีเหลืองน้อยกว่าชุดควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างในการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และอัตราการแลกเปลี่ยนเนื้อ แสดงว่าสารสกัดเสม็ดขาวส่งผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว สามารถลดการติดเชื้อก่อโรคกลุ่มวิบริโอ และสามารถนำมาพัฒนาเป็นสารเสริมอาหารเพื่อเสริมสุขภาพกุ้งขาวที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมได้

คำสำคัญ : เสม็ดขาว, กุ้งขาว, ภูมิคุ้มกัน, เชื้อก่อโรคในกุ้ง

---

[1] สาขาศึกษาทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง

[2] สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์ประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง

[3] ศูนย์วิสาหกิจศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง

Efficacy of cajuputi tree (*Melaleuca cajuputi*) extracts for controlling pathogenic microorganisms in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) pond culture

Sunanta Khongsai [1*] Chakriya Chalad [1] Preeda Phumee [2] and Netnapa Sutjarit[3]

Abstract

The purpose of this research was to study the efficacy of *Melaleuca cajuputi* leaves extract for controlling pathogenic microorganisms in *Litopenaeus vannamei* pond culture, feasibility study on the development of biopharmaceutical product for the prevention of white shrimp disease and to develop white shrimp farming using environmentally natural substances. *M. cajuputi* leaves were extracted with ethanol and powered by freeze dry technique. The extract powder was prepared as a dietary supplement at a concentration of 300 ppm. The result was found that solvent – soluble extracts mixed with ethanol and water in a ratio of 8:2 is the best soluble including the highest of total phenolic content, total flavonoid content, DPPH and ABTS free radical scavenging and inhibition of *V. parahaemolyticus* significantly. The results of water quality and white shrimp health monitoring in the aquaculture showed that the chemical water quality in both systems was within the specified criteria. The results of white shrimp health monitoring showed that the experimental unit with extracted supplements have the integrity of the liver and fat tablets in the complete liver with a higher total hemocyte and phenoloxidase activity than a control unit that does not provide extracted supplements. The amount of *Vibrio* spp. green colonies and yellow colonies of the experimental unit were less than the control unit, but there was no difference in growth, survival rates and feed conversion rate indicated that *M. cajuputi* extract affects the immune response of white shrimp. It can be developed as a dietary supplement to enhance health and reduce infection causing *Vibrio* pathogens.

Keywords: *Melaleuca cajuputi*, *Litopenaeus vannamei*, immune, *Vibrio* pathogens

[1] Department of General Education, Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang Campus.

[2] Department of Aquaculture and Fishery Product, Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang Campus.

[3] Enterprise Education Center, Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang Campus.

สารบัญเรื่อง

เรื่อง **หน้า**

กิตติกรรมประกาศ ก
บทคัดย่อภาษาไทย ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ค
สารบัญเรื่อง ง
สารบัญภาพ จ
สารบัญตาราง ฉ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย 1
1.2 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 3
1.3 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 19
1.4 วัตถุประสงค์ 25
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 25
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงานวิจัย 26
2.1 วัสดุและอุปกรณ์ 26
2.2 เครื่องมือ 26
2.3 สารเคมี เชื้อทดสอบ และอาหารเลี้ยงเชื้อ 27
2.4 การสกัดและการวิเคราะห์คุณภาพของสารสกัด 28
2.5 การใช้สารสกัดเสม็ดขาวเพื่อเสริมสุขภาพกุ้งขาว 34
2.6 สถานที่ทำการทดลอง และระยะเวลาการทดลอง 37
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 38
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 52
บรรณานุกรม 53
ภาคผนวก ก การเตรียมตัวอย่างสารสกัด 62
ภาคผนวก ข การเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์ 63
ภาคผนวก ค การนับจำนวนเม็ดเลือดรวม 64
ภาคผนวก ง การเตรียมอาหารและการเลี้ยงกุ้งขาว 65

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
ภาพที่ 1.1	โครงสร้างพื้นฐาน การกำหนดตำแหน่งและบริเวณที่แสดงสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์แบบต่างๆ	16
ภาพที่ 3.1	กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก	39
ภาพที่ 3.2	กราฟมาตรฐานของรูติน	40
ภาพที่ 3.3	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง	44
ภาพที่ 3.4	ความสมบูรณ์ของเม็ดไขมันในตับเมื่อกุ้งอายุ 30 วัน	47
ภาพที่ 3.5	ความสมบูรณ์ของเม็ดไขมันในตับเมื่อกุ้งอายุ 60 วัน	47
ภาพที่ 3.6	ความสมบูรณ์ของเม็ดไขมันในตับเมื่อกุ้งอายุ 90 วัน	48
ภาพผนวกที่ ก1	การเตรียมสารสกัดเอทานอล	61
ภาพผนวกที่ ก2	การเตรียมผงสารสกัดใบเสม็ดขาว	61
ภาพผนวกที่ ข1	การทดสอบการละลายของสารสกัด	62
ภาพผนวกที่ ค1	การนับจำนวนเม็ดเลือด	63
ภาพผนวกที่ ง1	การเตรียมอาหาร	64
ภาพผนวกที่ ง2	การเตรียมระบบ และการเลี้ยงกุ้ง	65
ภาพผนวกที่ ง3	การติดตามการเลี้ยงและการเก็บเกี่ยวผลผลิต	66

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 1.1	คุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งทะเล	7
ตารางที่ 1.2	การใช้ยาต้านจุลชีพกลุ่มยาควิโนโลน	13
ตารางที่ 1.3	การใช้ยาต้านจุลชีพกลุ่มยาเตตราซัยคลิน	14
ตารางที่ 1.4	การใช้ยาต้านจุลชีพกลุ่มยาซัลฟา	14
ตารางที่ 1.5	การใช้ยาต้านจุลชีพกลุ่มเบ็ดเตล็ด	15
ตารางที่ 3.1	ความสามารถในการละลายของผงสารสกัดเสม็ดขาว	38
ตารางที่ 3.2	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง	40
ตารางที่ 3.3	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง	41
ตารางที่ 3.4	ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง	42
ตารางที่ 3.5	ความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง	43
ตารางที่ 3.6	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง	45
ตารางที่ 3.7	การตรวจติดตามคุณภาพน้ำตลอดระยะการทดลอง	46
ตารางที่ 3.8	จำนวนเม็ดเลือดรวมและค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส	49
ตารางที่ 3.9	การเจริญเติบโตของกุ้งที่เลี้ยงตลอดระยะการทดลอง	50

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

กุ้งขาวแวนนาไมเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่ทำรายได้ให้กับประเทศและเกษตรกรได้เป็นอย่างดี มีผู้นิยมเลี้ยงเป็นจำนวนมากในหลายพื้นที่ของประเทศไทย เช่น ภาคตะวันออก ภาคกลาง ภาคใต้ จากข้อมูลสถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2554 พบว่าประเทศไทยมีผลผลิตกุ้งทะเลประมาณ 611,437 ตัน เป็นผู้ผลิตและส่งออกกุ้งทะเลรายใหญ่ของโลก (FAO, 2015) แต่ปัญหาและอุปสรรคของการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่สำคัญที่สุดคือปัญหาด้านการผลิตที่ประกอบด้วยปัญหาโรคระบาด เมื่อกุ้งเป็นโรคระบาดจะทำให้การเลี้ยงกุ้งในรุ่นนั้นๆ ขาดทุน ซึ่งโรคระบาดที่พบมากคือโรคไวรัสตายด่วน (EMS; Early Mortality Syndrome) (เอกพล, 2562 จากสถิติปริมาณผลผลิตสัตว์น้ำรวมของประเทศเริ่มมีอัตราการเปลี่ยนแปลงที่ลดลงตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549 พบว่ามีอัตราการเปลี่ยนแปลงระหว่างปี พ.ศ. 2549 - 2554 ลดลงเฉลี่ยร้อยละ 5.55 ต่อปี โดยมีสาเหตุหนึ่งมาจากการเกิดโรค (Srithaworn, *et. al*., 2015 สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรได้รายงานสถานการณ์การผลิตกุ้งจากการเพาะเลี้ยงของไทยในช่วงปี 2554 – 2558 พบว่ามีแนวโน้มลดลงร้อยละ 23.38 ต่อปี เนื่องจากช่วงปลายปี 2554 ผลผลิตของไทยประสบปัญหาโรคกุ้งตายด่วน แต่ภาครัฐโดยกรมประมงร่วมกับภาคเอกชนก็สามารถแก้ปัญหาและควบคุมการระบาดของโรคได้ระดับหนึ่ง ในปี 2556 เป็นต้นมาโรคอีเอ็มเอส (EMS) ได้สร้างความเสียหายต่อผลผลิตกุ้งในประเทศไทยอย่างรุนแรง (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2559) โดยเฉพาะในปี 2557 ผลผลิตกุ้งของประเทศไทยลดลงจากปีที่ผ่านมากว่าร้อยละ 50 (สมาคมแช่เยือกแข็งไทย, 2557) ส่งผลให้การส่งออกกุ้งของประเทศไทยลดลงจากอันดับหนึ่งของโลกเป็นอันดับสามของโลก ส่งผลต่อส่วนแบ่งทางการตลาดของประเทศไทยลดลงจากร้อยละ 20 เหลือร้อยละ 8 (Global Trade Atlas, 2016) ซึ่งคาดว่าจะต้องใช้ระยะเวลานานในการกลับมาเป็นผู้ส่งออกกุ้งอันดับหนึ่งได้อีกครั้ง สำหรับแนวโน้มสถานการณ์การเลี้ยงกุ้งในขณะนี้มีการพัฒนาขึ้นมาอย่างเป็นลำดับ โดยเกษตรกรมีการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดโดยมีรูปแบบการเลี้ยงที่แตกต่างออกไปจากเดิมมาก ตั้งแต่การออกแบบบ่อ การเตรียมบ่อ การลดพื้นที่การเลี้ยง การอนุบาลลูกกุ้งก่อนลงเลี้ยง ไปจนถึงระบบการให้อาหาร เป็นต้น จากรูปแบบและวิธีการเลี้ยงที่มีการปรับเปลี่ยนส่งผลให้ต้นทุนและผลตอบแทนในการเลี้ยงใน การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม มีความแตกต่างไปจากเดิม หน่วยงานภาครัฐมีความพยายามแก้ไขปัญหาเรื่องโรคกุ้งอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะการพัฒนาสายพันธุ์และการดำเนินการฝึกอบรมเพื่อให้ความรู้แก่เกษตรกรมากยิ่งขึ้น ทำให้ในปี 2559 ผลผลิตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีการปรับตัวและการบริหารจัดการการเลี้ยงที่ดีขึ้น สถานการณ์การผลิตเริ่มฟื้นตัวและมีปริมาณผลผลิตกุ้งเพิ่มขึ้นในช่วงปลายปี (สำนักส่งเสริมการใช้ประโยชน์, 2556

การที่เกษตรกรทำการเลี้ยงกุ้งและเกิดปัญหาหลายด้านโดยเฉพาะการเกิดโรค ส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียเนื่องจากการคับแคบของบ่อเลี้ยง และสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมทำให้กุ้งในบ่อเลี้ยงเกิดความอ่อนแอและอยู่ในภาวะของการเครียดทำให้แบคทีเรียเข้าทำอันตรายได้ง่าย ซึ่งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคในกุ้งที่พบบ่อยได้แก่แบคทีเรียที่อยู่ในสกุล Vibrio (ณัฏสรัณย์, 2550 ดังนั้นนักวิจัยจึงได้ค้นคว้าหาแนวทางในการป้องกันการติดเชื้อ โดยนำสมุนไพรหรือสารธรรมชาติมาใช้เพื่อป้องกันรักษาโรคในกุ้ง การใช้สมุนไพรนอกจากสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคแล้ว ยังสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและความสามารถต่อต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (พงศ์ศักดิ์, 2553 สารเคมีที่พบในสมุนไพรจำนวนมากได้รับการพิสูจน์และยืนยันว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน การกำจัดอนุมูลอิสระ การลดความเครียด และการป้องกันการเกิดโรค ตัวอย่างของสารดังกล่าว เช่น alkaloids, flavonoids, phenolics, terpenoids, steroids และ essential oils (อัครวิทย์, 2554 จากสาเหตุต่างๆ ทำให้นักวิจัยหลายกลุ่มเริ่มศึกษาสมุนไพรเพื่อเป็นแนวทางในการลดการใช้ยาปฏิชีวนะ เนื่องจากสมุนไพรส่วนใหญ่มีสรรพคุณทางยาและเป็นสารที่ได้มาจากธรรมชาติไม่ก่อให้เกิดการตกค้าง

เสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi*) อยู่ในวงศ์ Myrtaceae มีชื่อสามัญ Cajuput tree, Milk wood และ Paper bark tree เป็นไม้ยืนต้นที่พบมากบริเวณป่าชายเลน ป่าพรุ มีองค์ประกอบทางพฤกษเคมีที่น่าสนใจ ได้แก่ anthraquinines, terpenoids, flavonoids, saponinss, tannins และ alkaloids (สุนันทา, 2560 จากการนำสารสกัดจากใบเสม็ดขาวที่สกั ดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอทธิลอะซิเตต เอทานอล และเมทานอล ไปศึกษาเพิ่มเติมพบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio harveyi* ได้ดี (สุนันทา, 2562 มีรายงานว่าสารพฤกษเคมีที่พบในน้ำมันสกัดจากเสม็ดมีคุณสมบัติเป็น anti-inflammatory, anticancer, antioxidant, antimicrobial and insecticide เมื่อนำมาศึกษาโดยใช้เทคนิค GCMS พบว่าองค์ประกอบทางเคมีที่พบประกอบด้วย caryophyllene (20.16%), α - terpinolene (17.0%), α - humulene (11.91%), β - elemene (7.62%) และ γ - terpinene (5.62%) ทั้งนี้องค์ประกอบทางเคมีอาจมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่ต่างกัน (Sharif, *et al*., 2019) ซึ่งการนำสารสกัดดังกล่าวมาพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์เพื่อใช้ประโยชนเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งการระบาดหรือการติดเชื้อจากโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในกุ้งเป็นวิธีการหนึ่งที่เกษตรกรจะสามารถนำสิ่งที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ในเกิดประโยชน์สูงสุดเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี ลดต้นทุนการผลิต เพิ่มมูลค่าให้แก่ผลผลิตกุ้งของไทย และปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น

ดังนั้นนักวิจัยจึงได้ศึกษาแนวทางในการป้องกันการติดเชื้อ โดยนำสมุนไพรหรือสารธรรมชาติมาใช้เพื่อป้องกันรักษาโรคในกุ้ง และด้วยคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง มีพื้นที่ตั้งอยู่บริเวณชายฝั่งอันดามันและมีการดำเนินกิจกรรมเลี้ยงกุ้งขาวจึงมีความเหมาะสมและมีศักยภาพในการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาการเลี้ยงกุ้งแบบอินทรีย์ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคและลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ให้

เป็นพื้นที่ที่เหมาะสมในการเป็นแหล่งเรียนรู้แก่ผู้สนใจต่อไป งานวิจัยนี้จึงนำสารสกัดจากเสม็ดขาวมาพัฒนาการต่อยอดเพื่อเตรียมสารสกัด และทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งเป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะเพื่อนำไปพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์และใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงกุ้งได้จริง ซึ่งเสม็ดขาวเป็นสมุนไพรหนึ่งที่มีภายในประเทศและมีสรรพคุณทางยาจึงถูกนำมาทดสอบการออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในกุ้ง แต่สำหรับการศึกษาการใช้ในสภาพการเลี้ยงจริงนั้นยังมีการศึกษาน้อยและยังขาดข้อมูลเพื่อระบุประโยชน์ที่แท้จริงของเสม็ดขาวทำให้ต้องมีการศึกษาถึงผลการใช้อย่างจริงจังเพื่อประโยชน์แก่เกษตรกรและพัฒนาการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภคต่อไป

1.2 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ประเทศไทยมีพื้นที่การเลี้ยงกุ้งทะเลขยายตัวอย่างมากนับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2531 เป็นต้นมาในช่วงของการเปลี่ยนแปลงสูงสุด พบว่ามีอัตราเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 90 โดยมีเนื้อที่การเลี้ยงกุ้งทะเลทั้งประเทศในปี พ.ศ. 2550 จำนวนทั้งสิ้น 427,551 ไร่ ซึ่งพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงแบบพัฒนาจำนวน 351,049 ไร่ คิดเป็นร้อยละ 82.1 ของเนื้อที่การเลี้ยงกุ้งทั้งหมด ในด้านผลผลิตกุ้งทะเล จากการสำรวจพบว่า ในปี พ.ศ. 2556 กุ้งที่มีผลผลิตมากเป็นอันดับที่ 1 และ 2 ได้แก่ กุ้งขาวแวนนาไมและกุ้งกุลาดำ มีปริมาณผลผลิตเท่ากับ 310,700 และ 14,800 ตัน คิดเป็นเงิน 55,781.9 และ 3,246.6 ล้านบาท ตามลำดับ ดังนั้นกุ้งขาวแวนนาไมและกุ้งกุลาดำ จึงเป็นกุ้งทะเลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยคาดว่าผลผลิตกุ้งขาวแวนนาไมจะมีปริมาณการส่งออกเพิ่มสูงขึ้นในอนาคต (กรมประมง, 2550 ; กรมประมง, 2556 ; วัฒนา และคณะ, 2563

กุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) หรือที่เรียกกันทั่วไปว่า white leg shrimp มีการนำเข้ามาเลี้ยงในทวีปเอเชียครั้งแรกในประเทศไต้หวันปี พ.ศ. 2539 และต่อมาได้นำเข้าไปในประเทศจีนในปี พ.ศ. 2541 สำหรับประเทศไทยได้มีการนำกุ้งขาวเข้ามาทดลองเลี้ยงในปี พ.ศ. 2541 แต่การทดลองในครั้งนั้นไม่ ประสบความสำเร็จมากนัก จนกระทั่งเดือนมีนาคม พ.ศ. 2545 กรมประมงได้อนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ (Specific Pathogen Free, SPF) จากต่างประเทศเข้ามาทดลองเลี้ยง ระยะเวลาการนำเข้าพ่อ แม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อจากเดือนมีนาคม 2545-กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2546 ซึ่งเป็นช่วงเวลาเดียวกันที่การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยกำลังประสบปัญหากุ้งโตช้าโดยเฉพาะในขณะที่จับกุ้งจะพบว่ามีกุ้งขนาดเล็กน้ำหนัก ประมาณ 3-5 กรัม เป็นจำนวนมาก ทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่ประสบปัญหาขาดทุน ในขณะเดียวกัน เกษตรกรบางส่วนได้ทดลองเลี้ยงกุ้งขาว ซึ่งส่วนใหญ่ให้ผลค่อนข้างดี จากกระแสการเลี้ยงกุ้งขาวที่ได้ผลดีกว่ากุ้งกุลาดำ ทำให้เกษตรกรจำนวนมากหันมาเลี้ยงกุ้งขาวกันมากขึ้น แต่เนื่องจากกุ้งขาวเป็นกุ้งชนิดใหม่ที่ไม่เคยเลี้ยงในประเทศไทยมาก่อน รายละเอียดเกี่ยวกับพฤติกรรมการเลี้ยง การให้อาหาร ตลอดจนปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลเกี่ยวกับการ

เลี้ยงยังไม่มีการศึกษามาก่อน ทำให้เกษตรกรบางส่วนมีปัญหาในเรื่องของกุ้งเป็นโรค ในเรื่องของลูกพันธุ์ที่มีคุณภาพไม่ดีหลังจากเลี้ยงไปแล้วมีปัญหากุ้งโตช้า และมีลักษณะผิดปกติบางอย่างเกิดขึ้น

ลักษณะทั่วไป

กุ้งขาวแวนนาไมเป็นสายพันธุ์ในกลุ่มกุ้งขาวแปซิฟิกมีลักษณะผิวมันเกลี้ยง และเรียบ ลำตัวมี 8 ปล้อง และมีสีขาวโปร่ง ส่วนหัวมี 1 ปล้อง มีกรีอยู่ในระดับยาวประมาณ 0.8 เท่าของความยาวเปลือกหัวสันกรีสูง ปลายกรีแคบ ส่วนของกรีมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมมีสีแดงอมน้ำตาล กรีด้านบนมี 8 ฟัน กรีด้านล่างมี 2 ฟัน ร่องบนกรีมองเห็นได้ชัดเปลือกหัวสีขาวอมชมพูถึงแดง ขาเดินมีสีขาวเป็นลักษณะที่โดดเด่น หนวดแดง 2 เส้นยาว ตาแดงเข้ม ส่วนตัวมี 6 ปล้อง เปลือกตัวสีขาวอมชมพูถึงแดงเปลือกบาง ขาว่ายน้ำ 5 คู่ มีสีขาวข้างในที่ปลายมีสีแดง ส่วนหางมี 1 ปล้อง ปลายหางมีสีแดงเข้ม แพนหางมี 4 ใบ และ 1 กรีหาง หากินทุกระดับความลึกของน้ำ ชอบว่ายล่องน้ำแก่ง ลอกคราบเร็วทุกๆ สัปดาห์ ไม่หมกตัว กุ้งสายพันธุ์นี้เป็นสัตว์ที่มีความแข็งแรง และทนทานจึงมีการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติได้กว้างไกล ในแถบแนวชายฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก ตั้งแต่เม็กซิโกถึงเปรู เนื่องจากภูมิภาคในแถบนี้ที่ระดับความลึกจากเส้นแนวชายฝั่งลงไปประมาณ 72 เมตร หรือ 235 ฟุต มีพื้นท้องทะเลเป็นเหมือนโคลนที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโต และเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ (ประจวบ, 2527 : นรสิงห์ และคณะ, 2562 โดยปกติกุ้งขาวแวนนาไมเป็นสัตว์ที่หากินตอนกลางคืน และกินซากพืชซากสัตว์เป็นอาหาร แต่ธรรมชาติแล้วกุ้งเป็นสัตว์กินเนื้อซึ่งกินสัตว์ในกลุ่มครัสตาเชียน (crustaceans) ขนาดเล็ก แอมฟิพอด และโพลีชีดที่อาศัยอยู่ในดินหรือบนพื้นผิวดินก้นบ่อ โดยจะกินพืชและซากพืชบ้างในช่วง juvenile กุ้งจะกินอาหารได้ดีตั้งแต่เวลา 8.00 - 20.00 น. โดยเฉพาะในช่วงบ่าย กุ้งจะกินสาหร่ายเมื่ออาหารไม่เพียงพอ และมีรายงานว่ากุ้งสามารถย่อยอาหารได้เร็ว และย่อยอาหารได้สมบูรณ์ ในเวลา 4 – 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ซึ่งในระบบการเลี้ยงแบบพัฒนาแล้ว อาหารธรรมชาติที่มีในบ่อไม่เพียงพอต่อปริมาณกุ้ง ดังนั้นจึงต้องมีการให้อาหารเพิ่ม ซึ่งกุ้งขาวแวนนาไมต้องการอาหารที่มีโปรตีนประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ (นรสิงห์ และคณะ, 2562)

อาหารและการให้อาหาร

อาหารมีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโต ความต้านทานโรค และอัตราการรอด จึงต้องมีคุณภาพถูกสุขลักษณะและปลอดภัยต่อกุ้งที่เลี้ยง ไม่ผสมยาสัตว์และสารเคมีที่ไม่ได้รับอนุญาต การพิจารณาเลือกใช้อาหารสัตว์น้ำสำเร็จรูปที่ขึ้นทะเบียนถูกต้อง มีข้อแนะนำดังนี้

(1) เลือกใช้อาหารสำเร็จรูปที่มีเลขทะเบียนอาหารสัตว์ อาหารสัตว์สำเร็จรูปที่ขึ้นทะเบียนแล้วจะได้รับอนุญาตให้พิมพ์เลขทะเบียนอาหารสัตว์บนฉลากได้ โดยเลขทะเบียนนี้มี 2 ลักษณะ คือ ก) เลขทะเบียน ที่มีอักษร “ป” และตามด้วยเลข 10 หลัก เป็นเลขทะเบียนที่ออกให้โดยกรมประมง และ ข) เลขทะเบียนที่มีเลข 10 หลัก ไม่มีอักษร “ป” นาหน้า เป็นเลขทะเบียนที่ออกให้โดยกรมปศุสัตว์

(2) เลือกใช้อาหารสัตว์น้ำให้ตรงกับชนิดและขนาดของสัตว์น้ำ โดยสามารถดูได้จากฉลากที่ระบุว่าเป็นอาหารสำหรับสัตว์น้ำชนิดและขนาดใด เช่น อาหารสำหรับกุ้งอายุไม่เกิน 1 เดือน อาหารสำหรับกุ้งอายุ 1 – 2 เดือน

(3) วันที่ผลิตและวันหมดอายุที่ปรากฏบนฉลาก โดยปกติแล้วอาหารสัตว์น้ำที่ได้รับการขึ้นทะเบียนและมีจำหน่ายในท้องตลาด มีการกำหนดอายุอาหารไว้ 3 เดือนนับจากวันผลิต ดังนั้น การใช้อาหารสัตว์น้ำจึงควรพิจารณาถึงวันผลิตและวันหมดอายุบนฉลาก ไม่ใช้อาหารสัตว์น้ำที่หมดอายุ เนื่องจากอาจมีการเสื่อมคุณค่าทางโภชนาการซึ่งจะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ รวมถึงอาจมีเชื้อราหรือเชื้อที่อาจก่อให้เกิดโรค

(4) ควรตรวจดูภาชนะบรรจุอาหาร ต้องไม่อยู่ในสภาพชำรุด เปื่อยยุ่ย ฉีกขาด ทะลุ หรือดูว่าไม่มีการปิดภาชนะอย่างเหมาะสม และก่อนที่จะนาอาหารไปเลี้ยงสัตว์น้า ควรตรวจสอบสภาพอาหารต้องไม่เป็นเชื้อรา ไม่มีกลิ่นเหม็นหืน หรือมีสีผิดปกติไปจากเดิม เพื่อป้องกันการใช้อาหารที่เสื่อมสภาพหรือคุณภาพไม่เหมาะสม

การให้อาหารที่ไม่มีประสิทธิภาพ เช่น ให้อาหารมากเกินไป เกิดความสิ้นเปลือง มีอาหารเหลือและเกิดของเสียมากขึ้นในบ่อเลี้ยง ส่งผลสภาพแวดล้อมของบ่อเลี้ยงเสื่อมโทรม ความต้องการใช้ออกซิเจนในบ่อเลี้ยงมากขึ้นซึ่งก่อให้เกิดปัญหาด้านสวัสดิภาพและสุขภาพกุ้งตามมา

เมื่อปล่อยกุ้งแล้วเกษตรกรควรให้อาหารในปริมาณที่เหมาะสมขึ้นกับความหนาแน่นและปริมาณอาหารธรรมชาติในบ่อ เช่น กุ้งขาวแวนนาไม ให้อาหารในอัตรา 0.5 – 1.5 กิโลกรัมต่อกุ้ง 100,000 ตัวต่อวัน และปรับเพิ่มอาหารตามที่กำหนดไว้ในคู่มือ เช่น ปรับปริมาณอาหารกุ้งขาวแวนนาไมเพิ่มขึ้นในอัตราคงที่ 0.25 – 0.6 กิโลกรัมต่อกุ้ง 100,000 ตัวต่อวัน จนกุ้งมีอายุ 15 – 20 วัน หรือปรับในอัตราส่วนอื่นๆ ที่เหมาะสมเพื่อให้การให้อาหารมีประสิทธิภาพ เมื่อกุ้งเข้ามากินอาหารในยอแล้ว จึงเริ่มตรวจสอบและปรับปริมาณการให้อาหารตามความต้องการกินอาหารของกุ้งในแต่ละมื้อ โดยควรมีการตรวจสอบและบันทึกอัตราการเติบโตของกุ้ง (ค่าเฉลี่ยการเติบโตรายวัน หรือ Average Daily Gain; ADG) ในแต่ละช่วงของการเลี้ยงไว้ เพื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยการเติบโตทั่วไปประจำฟาร์ม ซึ่งหากมีค่าต่ำกว่าค่าเฉลี่ยควรรีบหาสาเหตุและแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นโดยเร็ว ในกรณีใช้เครื่องให้อาหารอัตโนมัติ ต้องหมั่นตรวจสอบอาหารเหลือในยอและอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งให้สอดคล้องกับปริมาณอาหารที่ให้ รวมถึงตรวจสอบคุณภาพน้ำบริเวณที่ให้อาหารว่ามีปริมาณออกซิเจนเพียงพอต่อการกระตุ้นให้กุ้งมีความอยากกินอาหาร (ระดับ 5 – 6 มิลลิกรัมต่อลิตร) คำนวณค่าอัตราการแลกเนื้อ (Feed Conversion Ratio; FCR) หลังจากการจับกุ้งเพื่อให้ทราบประสิทธิภาพรวมในการให้อาหาร การจัดการอาหารที่ไม่มีประสิทธิภาพ FCR จะมีค่ามากกว่า 1.5 ทำให้มีต้นทุนการผลิตสูงและมีอาหารเหลือในสิ่งแวดล้อมมากเกินไป (สินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558

ข้อแนะนำเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการให้อาหารกุ้ง (สำนักส่งเสริมการใช้ประโยชน์, 2556

การให้อาหารกุ้งต้องคำนึงถึงตัวแปรสิ่งแวดล้อมในบ่อที่กำหนดการกินอาหารและกิจกรรมในตัวกุ้ง เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม และปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ

- อุณหภูมิน้ำในช่วง 26 – 32 องศาเซลเซียส จะทำให้กุ้งกินอาหารเพิ่มขึ้น หากอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าช่วงดังกล่าวจะทำให้กุ้งกินอาหารลดลง ดังนั้นในระหว่างการเลี้ยงหากสภาพอากาศแปรปรวนจะส่งผลให้อุณหภูมิน้ำในบ่อมีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งสามารถประมาณการกินอาหารของกุ้งได้ล่วงหน้า

- ในบ่อเลี้ยงควรมีปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำประมาณ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือใกล้จุดอิ่มตัว (6.5 – 7.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตลอดเวลา โดยเฉพาะบริเวณติดตั้งเครื่องให้อาหารอัตโนมัติซึ่งมีอาหารสะสมและมีกุ้งเข้ามากินอาหารมาก

- เกษตรกรสามารถเพิ่มออกซิเจนในบริเวณที่ให้อาหารโดยใช้ท่อจ่ายออกซิเจนหรือเครื่องเติมอากาศ แต่ควรระมัดระวังไม่ให้กระแสน้ำแรงเกินไป เพราะจะทำให้กุ้งไม่สามารถว่ายน้ำจับอาหารกินได้

- ในเวลากลางคืน หากไม่สามารถควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม ควรลดปริมาณการให้อาหารตามสัดส่วน

- การเลี้ยงกุ้งในความเค็มต่ำต้องคำนึงถึงปริมาณโปแตสเซียม แมกนีเซียม ซึ่งมักขาดแคลนในน้ำที่ความเค็มต่ำ นอกจากนี้เกษตรกรต้องคำนึงถึงคุณค่าทางอาหารที่เหมาะสม โดยเลือกอาหารที่มีพลังงานจากคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนสูง จะทำให้กุ้งมีการเติบโตเต็มที่

การจัดการฟาร์ม

การปล่อยลูกกุ้งในอัตราความหนาแน่นที่มากเกินกว่าที่ระบบการเลี้ยงจะรองรับได้ อาจทำให้กุ้งเกิดความเครียด การให้อาหารในปริมาณมากทำให้เกิดการหมักหมมของอาหารที่เหลือและสิ่งขับถ่ายของกุ้ง ทำให้น้ำมีคุณภาพไม่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้ง ควรปล่อยลูกกุ้งเพียงชนิดและขนาดเดียวกันในอัตราความหนาแน่นที่เหมาะสม เช่น

- หากต้องการเลี้ยงกุ้งให้มีขนาดประมาณ 50 – 60 ตัวต่อกิโลกรัม ในระยะเวลาประมาณ 4 เดือน ควรปล่อยลูกกุ้งระยะหลังวัยอ่อน (Post Larvae หรือ PL) PL12 จำนวน 100,000 – 150,000 ตัวต่อไร่

- หากต้องการเลี้ยงกุ้งให้มีขนาดประมาณ 40 – 50 ตัวต่อกิโลกรัม ในระยะเวลาประมาณ 4 เดือน ควรปล่อยลูกกุ้งระยะ PL12 จำนวน 80,000 – 100,000 ตัวต่อไร่

- หากต้องการเลี้ยงกุ้งให้มีขนาดประมาณ 30 ตัวต่อกิโลกรัม ในระยะเวลาประมาณ 4 เดือน ควรปล่อยลูกกุ้งระยะ PL12 จำนวน 50,000 – 60,000 ตัวต่อไร่

คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งมีผลกระทบต่อสุขภาพ อัตารอด และอัตราการเติบโต คุณภาพน้ำอาจมีการเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพภูมิอากาศและสภาพแวดล้อม ดังนั้น จึงควรมีการตรวจวิเคราะห์

คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งอย่างสม่ำเสมอ พิจารณาตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำโดยเลือกเฉพาะตัวชี้วัดที่สอดคล้องกับความเสี่ยงที่มีอยู่ในพื้นที่เท่าที่จำเป็น เช่น อุณหภูมิน้ำ ออกซิเจนละลายน้ำ ความเป็นกรด-เบส ความเค็ม และแร่ธาตุต่างๆ ความเป็นด่างรวม สารประกอบไนโตรเจน สารแขวนลอย บีโอดี เชื้อโคลิฟอร์ม และฟีคอลโคลิฟอร์ม โดยกำหนดวิธีการตรวจ ความถี่ และจุดเก็บตัวอย่างน้ำในบ่ออย่างชัดเจน และเก็บบันทึกผลที่ได้จากตรวจคุณภาพน้ำ

ตารางที่ 1.1 คุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งทะเล (สินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558

ลำดับ	ดัชนีคุณภาพน้ำ	หน่วย	ค่าที่เหมาะสม
1	ออกซิเจนละลายในน้ำ	มิลลิกรัมต่อลิตร	≥ 5
2	ความเป็นกรด-เบส	-	7-8.3
3	อุณหภูมิ	องศาเซลเซียส	28-32
4	ความโปร่งใส	เซนติเมตร	30-60
5	สารแขวนลอย	มิลลิกรัมต่อลิตร	ไม่มากกว่า 100
6	ความเป็นด่าง	มิลลิกรัมต่อลิตร เทียบกับ $CaCO_3$	≥ 100
7	ความกระด้าง	มิลลิกรัมต่อลิตร เทียบกับ $CaCO_3$	≥ 300
8	ไนไตรท์ (NO_2^-)	มิลลิกรัมต่อลิตร เทียบกับ NO_2^-	0.2
9	แอมโมเนียรวม (NH_3)	มิลลิกรัมต่อลิตร	≤ 0.4

การตรวจสุขภาพกุ้งในบ่อเลี้ยงโดยการสังเกตทางกายภาพอย่างสม่ำเสมอเพื่อเป็นการเฝ้าระวังการเกิดปัญหาสุขภาพกุ้งที่ดีที่สุด อาการที่กุ้งแสดงออกมาก่อนที่จะป่วยหรือเกิดโรคระบาดหากพบได้เร็วและสามารถแก้ไขปัญหาได้ทันเวลาสุขภาพกุ้งก็จะสามารถกลับมาดีดังเดิม ดังนั้นหากมีการตรวจสุขภาพกุ้งที่เลี้ยงอย่างสม่ำเสมอแล้ว จะช่วยลดความเสี่ยงในด้านปัญหาสุขภาพกุ้ง การป่วยและโรคระบาดหมั่นสังเกตอาการผิดปกติที่กุ้งแสดงออก เช่น กุ้งไม่แข็งแรง กุ้งไม่ดีดตัว ว่ายน้ำผิดปกติ หรือลอยเกาะขอบบ่อ ไม่กินอาหาร หรือลอกคราบไม่ออก ลำตัวสกปรก สีของลำตัวหรืออวัยวะผิดปกติ โดยทั่วไปกุ้งจะแสดงอาการผิดปกติในช่วงที่คุณภาพน้ำไม่เหมาะสมโดยเฉพาะช่วงเวลาเช้าตรู่ ดังนั้นการตรวจสุขภาพกุ้งในเวลาเช้าตรู่จึงเป็นเวลาที่เหมาะสม (สินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558

การเกิดโรคระบาดในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

สาเหตุการป่วยของกุ้งที่เลี้ยงในฟาร์ม อาจเนื่องมาจากการติดเชื้อไวรัส แบคทีเรีย หรือโปรโตซัว หรืออาจเกิดจากสิ่งแวดล้อมการเลี้ยงไม่เหมาะสม ซึ่งสาเหตุของการป่วยแต่ละอย่างมีแนวทางในการรักษาที่แตกต่างกันไป หากพบมีกุ้งป่วยหรือตายควรวิเคราะห์หาสาเหตุอาการป่วยของกุ้งที่ถูกต้องตามหลักวิชาการหรือจากผลการวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการมาสนับสนุน ในกรณีกุ้งป่วยและจำเป็นต้องใช้ยาสัตว์และสารเคมีเพื่อการรักษา ต้องเลือกใช้ยาสัตว์และสารเคมีที่ขึ้นทะเบียนกับหน่วยงานทาง

ราชการที่กำกับดูแลโดยตรงเท่านั้น ห้ามใช้ยาหรือสารเคมีที่ทางราชการห้ามใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเด็ดขาด เช่น คลอแรมเฟนิคอล ไนโตรฟูแรน มาลาไคต์กรีน เป็นต้น (สินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558

ปัญหาโรคตายด่วนในกุ้งเริ่มมีการระบาดครั้งแรกทางตอนใต้ของประเทศจีน และเริ่มแพร่กระจายมาสู่ไทยในปี 2554 ลักษณะอาการที่พบคือ กุ้งเริ่มป่วยเมื่อปล่อยเลี้ยงได้ 10 วัน ระยะแรกกุ้งไม่แสดงอาการผิดปกติอย่างเด่นชัด ไม่พบกุ้งเกยขอบบ่อ แต่เริ่มพบกุ้งตายในยอและที่ก้นบ่อ หลังจากนั้นจะพบซากกุ้งลอยขึ้นมา ในบ่อที่มีการตายมากจะพบกุ้งมีอาการว่ายน้ำเฉื่อย เซื่องซึม กินอาหารลดลง เปลือกนิ่มและมีสีเข้มขึ้น ตับลีบ นิ่ม ซีด หรือสีคล้ำ โรคตายด่วนในกุ้งทะเลมีลักษณะอาการเด่นชัดคือตับและตับอ่อนมีการตายอย่างฉับพลัน จึงมีการเรียกชื่อโรคนี้ว่า Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) ตับและตับอ่อนเป็นอวัยวะสำคัญของกุ้งที่ทำหน้าที่หลากหลายตั้งแต่การสร้างและหลั่งน้ำย่อย การดูดซึมอาหาร การขับถ่ายของเสียและกำจัดสารพิษ อีกทั้งเป็นแหล่งสำรองสารอาหารของกุ้งอีกด้วย การตายของเซลล์ในตับและตับอ่อนจึงส่งผลให้เซลล์ต่างๆ ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ

ในปี 2556 Tran *et al.* (2013) รายงานสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคตายด่วนในกุ้งขาวแวนนาไมและกุ้งกุลาดำ เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ใกล้ชิดกับ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารพิษทำลายเซลล์ของตับและตับอ่อน และในปี 2557 กรมประมงร่วมกับ Tokyo University of marine Science and Technology ค้นพบ toxin gene ในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงโดยสร้างสารพิษทำลายตับและตับอ่อนจนทำให้กุ้งที่ติดเชื้อตายในที่สุด และยังได้พัฒนา primer ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคดังกล่าว ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในระบบการผลิตกุ้งทะเลตลอดสาย ตั้งแต่พ่อแม่พันธุ์ในโรงเพาะฟัก ลูกกุ้งในโรงอนุบาล และกุ้งที่เลี้ยงในบ่อ ตลอดจนปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น อาหาร น้ำ และดินในบ่อเลี้ยง นอกจากนี้ วารินทร์ และคณะ (2558) ได้ศึกษาการระบาดวิทยาแบบ cohost พบว่าคุณภาพลูกกุ้งมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคตายด่วนในบ่อดิน โดยบ่อที่กุ้งเป็นโรคตายด่วนมีคะแนนประเมินคุณภาพลูกกุ้งตามเกณฑ์ของกรมประมงต่ำกว่าบ่อที่ไม่เป็นโรคตายด่วน โดยเฉพาะความผิดปกติทางพยาธิสภาพของตับและตับอ่อน ความเครียดโดยการแช่น้ำจืด ปริมาณการปนเปื้อนแบคทีเรีย vibrio รวม และ vibrio กลุ่มสีเขียว ในลูกกุ้งบ่อที่เกิดโรคมีมากกว่าลูกกุ้งบ่อที่ไม่เกิดโรคตายด่วนอย่างมีนัยสำคัญ (สำนักส่งเสริมการใช้ประโยชน์, 2556

ปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดโรคตายด่วนในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง (สำนักส่งเสริมการใช้ประโยชน์, 2556

จากการศึกษาปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคตายด่วนในพื้นที่ที่มีการรายงานการระบาดของโรคตายด่วนในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง พบว่าสามารถจัดกลุ่มปัจจัยเสี่ยงได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

(1) แหล่งลูกกุ้ง

สาเหตุหลักที่พบว่าแหล่งที่มาของลูกกุ้งส่วนสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรคตายด่วนได้มากขึ้นนั้นน่าจะมีสาเหตุจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ที่เป็นสาเหตุของโรคตายด่วน เข้ามาในระบบการเลี้ยงและอนุบาลลูกกุ้งของฟาร์มโรงเพาะฟัก ซึ่งอาจจะเข้ามาในระบบการเลี้ยงผ่านทางลูกกุ้งในระยะ nauplius ที่นำเข้ามาสู่ฟาร์ม น้ำที่ใช้เลี้ยงลูกกุ้งที่นำเข้ามาใช้ภายในฟาร์ม อาหารที่ใช้เลี้ยงลูกกุ้ง หรือเชื้อโรคที่แฝงตัวอยู่ในระบบท่อน้ำภายในฟาร์มในรูปของ biofilm เป็นที่น่าสังเกตว่าโรงเพาะฟักและโรงอนุบาลจะมีวิธีการเตรียมน้ำเพื่อลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับน้ำก่อนนำน้ำมาใช้ แต่พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป น้ำที่ผ่านการบำบัดแล้ว 2 – 3 วัน กลับมีเชื้อแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น เป็นไปได้ว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นนั้นมาจากแบคทีเรียที่เกาะติดอยู่กับเมือกในท่อน้ำ และเกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น นอกจากนั้นระบบท่อลมที่ไม่เหมาะสม และระบบการจัดการที่เอื้ออำนวยต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อในน้ำ เช่น อัตราการเลี้ยงลูกกุ้งที่หนาแน่น การหมักหมมของของเสียภายในบ่อเลี้ยง การควบคุมให้อุณหภูมิของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งสูงกว่าปกติเพื่อเร่งการเจริญเติบโต ก็เป็นปัจจัยที่เพิ่มโอกาสการกระจายตัวและการก่อโรคในระบบการเลี้ยงได้ โดยทั่วไปแล้วความหนาแน่นของกุ้งที่สูงเกินไปจะช่วยส่งเสริมการระบาดของโรคโดยเพิ่มโอกาสการสัมผัสระหว่างกุ้งด้วยกันเอง ดังนั้นการปล่อยลูกกุ้งในประมาณที่หนาแน่นมีความเสี่ยงที่จะเป็นโรคตายด่วนมากยิ่งขึ้น

(2) การเตรียมบ่อ

การเตรียมบ่อโดยให้มีระยะเวลาในการตากบ่อยาวนานขึ้น เป็นวิธีการที่ให้ผลในการลดความเสี่ยงในการเกิดโรคตายด่วนได้ ซึ่งวิธีการเตรียมบ่อโดยการนำของเสียที่ค้างจากการเลี้ยงกุ้งรุ่นที่แล้วออกจากบ่อและตามด้วยการตากบ่อที่ยาวนานขึ้นนั้น นอกจากจะเป็นการลดปริมาณของเสียในรูปสารอินทรีย์ไนโตรเจนออกจากบ่อแล้ว ขบวนการนี้ยังสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่สะสมอยู่ในตะกอนเลนก้นบ่อได้ เนื่องจากเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สามารถมีชีวิตอยู่ในน้ำและในตะกอนดินเลนก้นบ่อ ดังนั้นการตากบ่อจึงเป็นวิธีที่ดีในการลดปริมาณเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคตายด่วนที่ตกค้างอยู่ภายในบ่อได้ ผลการศึกษายังพบว่าการใช้จุลินทรีย์ในการเตรียมบ่อและระหว่างการเลี้ยงมีแนวโน้มที่จะสามารถช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคตายด่วน เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่เติมลงไปจะช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในบ่อและในน้ำซึ่งสอดคล้องกับการเลี้ยงกุ้งที่อาศัยสมดุลธรรมชาติ มีการเติมจุลินทรีย์เพื่อการย่อยสลายและควบคุมปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำระหว่างการเลี้ยง

(3) การจัดการอาหาร

การให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปแทนอาหารธรรมชาติกับกุ้งในช่วง 5 – 7 วันแรกเป็นปัจจัยที่เพิ่มโอกาสการเกิดโรคตายด่วนได้ เนื่องจากประมาณอาหารสำเร็จรูปที่ให้สัมพันธ์กับของเสียที่เกิดขึ้นภายในบ่อ อาหารที่เหลือจากการบริโภคของกุ้งและของเสียจากการขับถ่าย ถ้าถูกกำจัดไม่หมด เกิด

การหมักหมมที่ก้นบ่อกลายเป็นอาหารของแบคทีเรีย ทำให้เชื้อแบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้สมดุลจุลินทรีย์ภายในบ่อเสียไป กุ้งเกิดความเครียดและยอมรับเชื้อก่อโรคได้ง่ายขึ้น

(4) การจัดการน้ำ

การพักน้ำในบ่อพักจะช่วยป้องกันโรคได้ เนื่องจากบ่อพักน้ำจะทำหน้าที่เป็นที่สำรองน้ำสำหรับเติมในบ่อเลี้ยงจึงลดความเสี่ยงที่จะนำเชื้อโรคจากภายนอกเข้าสู่ระบบการเลี้ยง และการพักน้ำเป็นการลดประมาณสารอินทรีย์ที่ปะปนมากับน้ำได้ดี การเติมและการถ่ายน้ำระหว่างการเลี้ยงสามารถลดความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในน้ำ ส่งผลให้ประมาณแบคทีเรียในน้ำลดลงจึงลดโอกาสการเกิดโรคตายด่วนได้

แนวทางการจัดการเพื่อลดความเสี่ยงการเกิดโรคกุ้งตายด่วน (สำนักส่งเสริมการใช้ประโยชน์, 2556

การปฏิบัติเพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดปัญหาโรคตายด่วน สามารถดำเนินการได้โดยใช้หลักในการควบคุมปริมาณของเสียในรูปอินทรียสารให้มีปริมาณคงเหลือในบ่อน้อยที่สุด ควบคุมจุลินทรีย์ในบ่อให้มีความสมดุลโดยส่งเสริมให้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นประโยชน์เจริญเติบโตได้ดีเพื่อแข่งขันกับเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* spp. การเตรียมอาหารธรรมชาติก่อนปล่อยลูกกุ้งลงเลี้ยงและลดปริมาณการใช้อาหารสำเร็จรูป เลือกใช้ลูกกุ้งที่มีสุขภาพดี แข็งแรง ปราศจากเชื้อก่อโรค ตลอดจนควบคุมเชื้อแบคทีเรียในตัวกุ้งระหว่างการเลี้ยง ซึ่งเป็นวิธีการป้องกันโรคและลดโอกาสเสี่ยงในการเกิดโรคได้

(1) การจัดการพื้นบ่อเลี้ยงหลังจับกุ้ง

จัดการดูแลพื้นบ่อไม่ให้มีการหมักหมมของสารอินทรีย์หลังจากจับกุ้ง กำจัดเลนและของเสียก้นบ่อ ตากบ่อให้แห้ง เติมน้ำเข้าบ่อให้มีปริมาณน้ำเพียงพอที่จะสามารถคราดพื้นบ่อทั้งหมด ใส่จุลินทรีย์สาดให้ทั่วบ่อ เพื่อให้เลน สารอินทรีย์ น้ำ และออกซิเจน ที่ก้นบ่อผสมกัน ซึ่งจะช่วยให้ก๊าซพิษ เช่น ก๊าซไข่เน่า หรือสารพิษ รวมทั้งจุลินทรีย์ที่สะสมในดินสัมผัสกับออกซิเจนอย่างทั่วถึง ทิ้งไว้ 2-3 วัน ตรวจวัดแอมโมเนียในน้ำ ค่าแอมโมเนียรวมที่เหมาะสมเป็น 0.5 – 1.0 ppm ถ้าแอมโมเนียยังสูงอยู่ให้คราดพื้นบ่อและเติมจุลินทรีย์ซ้ำจนกว่าระดับแอมโมเนียรวมจะอยู่ที่ 0.5 – 1.0 ppm เติมวัสดุปูนให้ดินพื้นบ่อมีค่า pH เป็นกลาง

(2) การเตรียมห่วงโซ่อาหารธรรมชาติ

เมื่อทำความสะอาดพื้นบ่อและระดับแอมโมเนียรวมคงที่แล้ว ให้สูบน้ำจากบ่อพักที่ผ่านการกรอง กำจัดพาหะ และฆ่าเชื้อในน้ำด้วยยาฆ่าเชื้อ คลอรีน หรือยาฆ่าเชื้อประเภทอื่นๆ โดยเฉพาะบ่อที่เคยเป็นโรคหรืออยู่ในบริเวณที่มีการระบาดของโรคกุ้ง แต่ถ้าบ่อไม่เคยเป็นโรคหรือมีการป้องกันโรคดีแล้วก็ไม่จำเป็นต้องใช้ยาฆ่าเชื้อ ปรับพีเอชน้ำให้อยู่ที่ 7.8 – 8.2 ด้วยวัสดุปูน หลังจากนั้นใส่กากน้ำตาลและจุลินทรีย์ เตรียมน้ำหมักเพื่อทำสีน้ำและสร้างอาหารธรรมชาติ เมื่อมีอาหารธรรมชาติบริบูรณ์จึงค่อยปล่อยลูกกุ้งในอัตรา 100,000 – 120,000 ตัวต่อไร่ ขณะเดียวกันต้องรักษาระดับแอมโมเนียให้อยู่ในช่วง 0.5 – 1 ppm ตลอดการเลี้ยง

(3) คุณภาพลูกกุ้งและการปล่อยลูกกุ้งลงเลี้ยง

ลูกกุ้งที่จะนำมาปล่อยเลี้ยงควรผ่านการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคตายด่วนด้วยวิธี PCR ก่อน อย่างไรก็ตามลูกกุ้งที่ตรวจไม่พบเชื้อโรคตามวิธีดังกล่าวอาจมีการติดเชื้อโรคในระดับที่ต่ำจนวิธีการตรวจสอบในปัจจุบันไม่สามารถตรวจพบได้ นอกจากนั้นลูกกุ้งอาจมีการติดเชื้อภายหลังจากน้ำหรือดินในบ่อเลี้ยงที่มีการปนเปื้อนของเชื้อโรคได้ ลักษณะภายนอกของลูกกุ้งที่ดีควรมีขนาดความยาวของลำตัวเหมาะสมกับอายุ ตับขนาดใหญ่สีเข้ม ลูกกุ้งมีความแข็งแรง และได้รับการตรวจสุขภาพและความทนทานต่อความเครียดตามมาตรฐานของกรมประมง โดย

- ท่อตับและตับอ่อน ไม่ควรพบหด บิด เสียรูป หรือมีเซลล์หลุดลอกจากท่อตับ
- เซลล์ท่อตับและตับอ่อนมีเม็ดไขมันสะสมในปริมาณมาก
- มีค่าแบคทีเรียวิบริโอรวมไม่เกิน 10^2 เซลล์ต่อกรัม
- ไม่พบเชื้อ *V. parahaemolyticus*

การปล่อยลูกกุ้งที่ระยะ P12 – 13 ในอัตราไม่เกิน 120,000 ตัว/ไร่ ควรชำลูกกุ้งภายในบ่อเลี้ยงหรือบริเวณข้างบ่อเลี้ยงที่ไม่ห่างไกลจากบ่อเลี้ยงก่อนปล่อยลงเลี้ยงทั่วทั้งบ่อ ให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอ สร้างอาหารธรรมชาติในบ่อชำก่อนปล่อยกุ้ง ตรวจวัดคุณภาพน้ำ ใส่จุลินทรีย์ ควบคุมระดับแอมโมเนียรวมไม่ให้เกิน 1 ppm ค่า pH อยู่ในช่วง 7.8 – 8.0 ชำลูกกุ้งนาน 25 – 30 วันจึงปล่อยลงบ่อเลี้ยงที่ปรับสภาพน้ำให้ใกล้เคียงกับบ่อชำ หากไม่ได้ชำลูกกุ้ง ในช่วง 10 – 15 วันแรก ควรให้ลูกกุ้งพึ่งพาอาหารธรรมชาติเป็นหลัก และเริ่มให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปเมื่ออาหารธรรมชาติภายในบ่อลดปริมาณลงโดยที่อาหารรวมใน 1 เดือนแรกไม่ควรเกิน 150 กิโลกรัมต่อ ลูกกุ้ง 1 แสนตัว

(4) การควบคุมเชื้อแบคทีเรียในตัวกุ้งระหว่างการเลี้ยง

- ให้กินโปรไบโอติกชนิดที่ผ่านการหมักแล้ว ผสมอาหารให้กุ้งกิน เริ่มใช้ได้ตั้งแต่กุ้งเริ่มกินอาหารและผสมให้อย่างน้อยวันละ 1 มื้อ จนกว่าจะจับกุ้งขาย
- ผสมสมุนไพรหรือสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย เช่น ข่า กระเทียม ในอาหาร โดยเริ่มใช้ได้ตั้งแต่กุ้งเริ่มกินอาหารและผสมให้อย่างน้อยวันละ 1 มื้อ จนกว่าจะจับกุ้งขาย

(5) รักษาสมดุลของจุลินทรีย์ภายในน้ำระหว่างการเลี้ยง

หากปริมาณของแบคทีเรียก่อโรคและจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ภายในน้ำอยู่ในภาวะสมดุล ปริมาณแพลงก์ตอนไม่เพิ่มจำนวนขึ้นจนสร้างปัญหาภายในบ่อ คุณภาพน้ำจะอยู่ในระดับที่พอเหมาะ และไม่มีการเปลี่ยนแปลงจนส่งผลกระทบต่อสุขภาพกุ้ง ควบคุมแอมโมเนียรวมในน้ำให้ได้ประมาณ 0.5 – 1 ppm และไนเตรตที่ 25 – 50 ppm ตรวจเช็คประมาณวิบริโอรวมในน้ำทุกๆ 1 สัปดาห์ โดยไม่ควรมีวิบริโอในน้ำเกิน 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สัดส่วนของโคโลนีสีเขียวไม่ควรเกินร้อยละ 30 ของทั้งหมด อย่าเร่งอาหารมากเกินไปเมื่อพบว่ากุ้งติดดีและพ้นระยะเสี่ยงของการเป็นโรคตายด่วนเพราะอาจเป็นต้นเหตุให้สมดุลจุลินทรีย์และไนโตรเจนภายในบ่อเลี้ยงเสียไป แพลงก์ตอนเพิ่มจำนวนมากขึ้นในบ่อเลี้ยง เป็นต้นเหตุให้สีน้ำเข้มและล้มในที่สุด pH ของน้ำจะสูงขึ้นและแกว่ง (เช้า –

บ่าย แตกต่างเกิน 3.0) ระดับแอมโมเนียรวมจะสูงกว่าช่วงที่เหมาะสมและไม่สามารถควบคุมให้ลดลงได้ กุ้งจะกินอาหารลดลง อ่อนแอ และเป็นโรคได้ง่าย

แนวทางป้องกันและรักษาโรคกุ้งตายด่วน

(1) การใช้เชื้อจุลินทรีย์เพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรคตายด่วน พบว่าความสามารถของเชื้อแบคทีเรียไม่ได้มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคตายด่วนโดยตรง แต่อาจมีผลทางอ้อมโดยเชื้อจุลินทรีย์จะช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ ทำให้ปริมาณสารอินทรีย์ซึ่งเป็นอาหารของเชื้อแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงกุ้งลดลง ส่งผลให้เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคลดลงด้วย นอกจากนี้การให้เชื้อจุลินทรีย์ผสมในอาหารเพื่อเป็น probiotic ให้กุ้งกิน เป็นการทำให้เชื้อจุลินทรีย์เข้ายึดพื้นที่ในระบบทางเดินอาหาร (colonize) เพื่อไม่ให้เชื้อก่อโรคได้มีโอกาสเข้ายึดเกาะกับผนังของทางเดินอาหาร จึงเป็นการลดโอกาสในการเกิดโรค

(2) การใช้สมุนไพรเพื่อทดแทนการใช้สารต้านจุลชีพ พบว่ามีการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* เช่นสารสกัดข่า (*Alpinia galanga* Linn.) และสารสกัดข่าผสมกรดอินทรีย์มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคตายด่วนได้ดี โดยความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย 50% (Minimum Inhibitory Concentration: MIC_{50}) มีส่วนผสมของสารสกัดข่า : กรดอินทรีย์ เท่ากับ 0.25 : 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และความเข้มข้นต่ำสุดในการกำจัดแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) มีส่วนผสมของสารสกัดข่า : กรดอินทรีย์ เท่ากับ : 16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทั้งนี้การผสมกรดอินทรีย์ในสารสกัดข่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคตายด่วนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารสกัดข่าเพียงอย่างเดียว จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำข่าซึ่งเป็นสมุนไพรท้องถิ่นมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคกุ้งทะเลที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคตายด่วน โดยพัฒนาให้สามารถนำมาใช้ป้องกันและรักษาโรคตายด่วนในกุ้งทะเลแทนการใช้ยาต้านจุลชีพและสารเคมีเพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

(3) การใช้แบคทีริโอเฟจในการรักษาโรคตายด่วน แบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) เป็นไวรัสของแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติซึ่งสามารถใช้แบคทีเรียนั้นเป็นเจ้าบ้าน (host) ในการเพิ่มจำนวน และแบคทีริโอเฟจแต่ละชนิดมีความจำเพาะกับแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว หรือสองถึงสามชนิดเท่านั้น ด้วยความจำเพาะของแบคทีริโอเฟจต่อแบคทีเรีย จึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เพื่อรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรีย (bacteriophage therapy) รวมทั้งการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะค้นหาแบคทีริโอเฟจที่มีอยู่ในธรรมชาติโดยมีความจำเพาะกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ก่อโรคตายด่วน เพื่อเพิ่มทางเลือกสำหรับการป้องกันและรักษาโรคตายด่วน (สำนักส่งเสริมการใช้ประโยชน์, 2556

ยาต้านจุลชีพเพื่อการป้องกันและรักษาโรคสัตว์น้ำ (สุดา และคณะ, 2556

ยาต้านจุลชีพสำหรับใช้ในสัตว์น้ำที่ได้รับการขึ้นทะเบียนตำรับยาจากสำนักคณะกรรมการอาหารและยา ได้แก่ เอนโรโฟลซาซิน (Enrofloxacin) ซาราโฟลซาซิน (Sarafloxacin) ออกโซลินิค แอซิด (Oxolinic acid) ออกซีเตตราซัยคลิน (Oxytetracyclin) เตตราซัยคลิน (Tetracyclin) ซัลฟา เมททอกซิน-ออร์เมทโธพริม (Sulfadimethoxin-Ormethoprim) ซัลฟาไดเมททอกซิน-ไตรเมท โธพริม (Sulfadimethoxin-Trimethoprim) ซัลฟาไดเมททอกซิน (Sulfadimethoxin) ซัลฟาโมโน เมททอกซิน (Sulfamonomethoxine) และซัลฟาไดอาซิน (Sulfadiazine) ซึ่งสามารถจัดเป็นกลุ่ม ได้ดังนี้

1. กลุ่มยาควิโนโลน

ควิโนโลนเป็นกลุ่มยาต้านจุลชีพที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ยากลุ่มนี้ที่นำมาใช้ใน การรักษาโรคสัตว์น้ำ ได้แก่ ออกโซลินิค แอซิด เอนโรโฟลซาซิน ซาราโฟลซาซิน เป็นต้น เมื่อยากลุ่มนี้ เข้าสู่ร่างกายสัตว์น้ำแล้วจะขัดขวางการสังเคราะห์นิวคลีอิกแอซิดของแคทีเรียและทำให้เซลล์ แบคทีเรียถูกทำลาย การใช้ยากลุ่มควิโนโลนไม่แนะนำให้ใช้ร่วมกับยาต้านจุลชีพหลายตัว เช่น เตตรา ซัยคลิน เนื่องจากลบล้างฤทธิ์ซึ่งกันและกัน

ตารางที่ 1.2 การใช้ยาต้านจุลชีพกลุ่มยาควิโนโลน

ยา	วิธีใช้	ปริมาณ/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม/วัน	ระยะหยุดยาก่อนจับ
เอนโรโฟลซาซิน	ผสมอาหาร	10 มิลลิกรัม	21 วัน
ซาราโฟลซาซิน	ผสมอาหาร	10 มิลลิกรัม	5 วัน

2. กลุ่มยาเตตราซัยคลิน

ยาในกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง รสขม ละลายน้ำได้จำกัดที่ pH7 และออกฤทธิ์ สูงสุดที่ pH ระหว่าง 5.5 – 6 สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

- กลุ่มยาที่ผลิตโดยจุลชีพ เช่น ออกซีเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน
- กลุ่มยาที่ได้จากการกึ่งสังเคราะห์ เช่น เตตราซัยคลิน

ยาที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในกลุ่มยานี้ ได้แก่ ออกซีเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน เมื่อยากลุ่มเตตราซัยคลินเข้าสู่ร่างกายสัตว์น้ำแล้วจะไปขวางการเจริญเติบโตหรือการขยายตัวของ แบคทีเรีย การใช้ยากลุ่มเตตราซัยคลินไม่แนะนำให้ใช้ร่วมกับยาต้านจุลชีพหลายตัว เช่น ยากลุ่ม ซัลฟา และสารประเภทเกลือแคลเซียมหรือโซเดียมคาร์บอเนต เป็นต้น

ตารางที่ 1.3 การใช้ยาต้านจุลชีพกลุ่มยาเตตราซัยคลิน

ยา	วิธีใช้	ปริมาณ/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม/วัน	ระยะหยุดยาก่อนจับ
ออกซีเตตราซัยคลิน	ผสมอาหาร	10 – 50 มิลลิกรัม	7 – 10 วัน
เตตราซัยคลิน	ผสมอาหาร	55 – 110 มิลลิกรัม	10 วัน

3. กลุ่มยาซัลฟา

ยาในกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ละลายน้ำได้น้อย แต่ละลายได้ดีในไขมัน เป็นยากลุ่มที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น ซัลฟาไดเมททอกซิน ซัลฟาไดอาซิน เป็นต้น ยากลุ่มนี้เป็นยาที่ออกฤทธิ์ได้ดีกับแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก เมื่อยากลุ่มซัลฟาเข้าสู่ร่างกายสัตว์น้ำแล้วจะเข้าไปยับยั้งการเจริญเติบโตหรือการขยายตัวของแบคทีเรีย การใช้กลุ่มยาซัลฟาไม่แนะนำให้ใช้ร่วมกับกลุ่มยาเตตราซัยคลิน

การใช้ยากลุ่มซัลฟาร่วมกับไตรเมทโธพริมจะเสริมฤทธิ์กัน ส่งผลให้ทำลายหรือฆ่าเชื้อโรคได้โดยตรง แต่ถ้าใช้ยาซัลฟาหรือไตรเมทโธพริมเพียงอย่างเดียวจะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือการขยายตัวของแบคทีเรียเท่านั้น ซึ่งยาในกลุ่มซัลฟาที่นิยมใช้ร่วมกับไตรเมทโธพริม ได้แก่ ซัลฟาไดอาซิน ซัลฟาเมทโธซาโซล และซัลฟาออกซิน เป็นต้น ยากลุ่มซัลฟาที่ใช้ร่วมกับไตรเมทโธพริมมีใช้กันอย่างแพร่หลาย มีส่วนผสมของยาซัลฟาและไตรเมทโธพริม ในอัตราส่วน 5:1

ตารางที่ 1.4 การใช้ยาต้านจุลชีพกลุ่มยาซัลฟา

ยา	วิธีใช้	ปริมาณ/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม/วัน	ระยะหยุดยาก่อนจับ
ซัลฟาไดเมททอกซิน -ออร์เมทโธพริม	ผสมอาหาร	50 – 100 มิลลิกรัม	21 วัน
ซัลฟาไดเมททอกซิน -ไตรเมทโธพริม	ผสมอาหาร	50 – 100 มิลลิกรัม	21 วัน

4. กลุ่มเบ็ดเตล็ด

โทลทราซูริล (Toltrazuril) เป็นกลุ่มยาที่ใช้ในการฆ่าโปรโตซัวในระบบทางเดินอาหาร ได้ผลดีกับโปรโตซัวในกลุ่ม Coccidia สำหรับประเทศไทยได้ขึ้นทะเบียนยาชนิดนี้เพื่อใช้ทั้งในสัตว์บกและสัตว์น้ำ

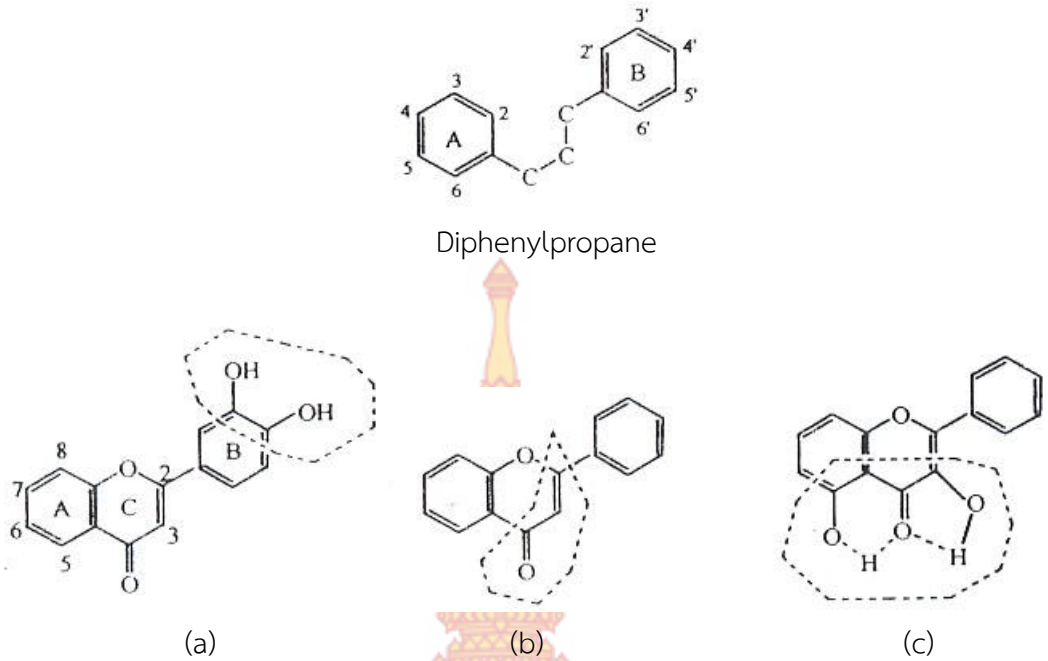
ตารางที่ 1.5 การใช้ยาต้านจุลชีพกลุ่มเบ็ดเตล็ด

ยา	วิธีใช้	ปริมาณ/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม/วัน	ระยะหยุดยาก่อนจับ
ลูกกุ้งวัยอ่อน	แช่	2 – 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ	6 ชั่วโมง
(Zoea)		1 ลูกบาศก์เมตร	ติดต่อกัน 3 – 5 วัน
กุ้งโต	ผสมอาหาร	3 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม	ติดต่อกัน 7 วัน

การใช้สารเสริมอาหารในสัตว์น้ำ

การเลี้ยงสัตว์น้ำระบบพัฒนาก่อให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพของสัตว์น้ำตามมาอย่างยากที่จะหลีกเลี่ยงได้ การใช้ยาและสารเคมีที่ไม่ถูกต้องจะเกิดผลเสียตามมา เช่น การเกิดเชื้อโรคสายพันธุ์ใหม่ที่ดื้อยา การทำลายความหลากหลายทางสิ่งมีชีวิตบริเวณนั้น การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเป็นอีกทางเลือกหนึ่งและมีความเป็นไปได้สูงในการนำมาใช้ในการป้องกันและลดความเสี่ยงในการเกิดโรคในกุ้งทะเลทั้งที่เลี้ยงในระบบโรงเรือนและในระดับฟาร์ม เนื่องจากมีความปลอดภัยมากกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ และสารเคมี สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันทำหน้าที่ส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะทั้งแบบเซลล์และแบบสารน้ำเพื่อให้สามารถป้องกันเชื้อก่อโรคได้หลากหลายชนิดที่เข้าสู่ร่างกายได้ในเวลาเดียวกัน ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ เป็นจำนวนมาก เพื่อค้นหาสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพสูง ราคาถูก รวมทั้งมีการศึกษาถึงระยะเวลาและวิธีการใช้ที่เหมาะสม เพื่อให้สามารถนำมาใช้ได้จริง

สารต้านออกซิเดชัน (antioxidants) กลุ่มที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ ได้แก่ กลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) พบได้ในแทบทุกส่วนของพืช ไม่ว่าจะเป็นราก ล้าต้น ใบ ดอก และผล ฟลาโวนอยด์ในพืชเป็นสารอินทรีย์ประเภทโพลีฟีนอล (polyphenol) มีโครงสร้างเป็นไดฟีนิลโพรเพน (diphenylpropane) ฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มีสมบัติในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีในอาหารประเภทไขมันและไขมันผสมน้ำ โครงสร้างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จะขึ้นกับหมู่ OH ที่บริเวณวงแหวน B (รูปที่ 1a) พันธะคู่ที่ C2 และ C3 ที่คอนจูเกต (conjugate) อยู่กับหมู่คาร์บอนิล (C=O) ที่ตำแหน่ง C4 ของวงแหวน C (รูปที่ 1b) และการเกิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่คาร์บอนิลที่ C4 ของวงแหวน C กับหมู่ OH ที่ตำแหน่ง C3 หรือ C5 (รูปที่ 1c) (ณัฏฐิกา, 2549



ภาพที่ 1.1 โครงสร้างพื้นฐาน การกำหนดตำแหน่งและบริเวณที่แสดงสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์แบบต่างๆ (ณัฏฐิกา, 2549

ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) เป็นระบบที่ไม่สามารถจดจำความแตกต่างของสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพต่างๆ ได้อย่างจำเพาะเจาะจง และไม่มีการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอม ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งมี 2 ระบบ คือ ระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีการตอบสนองโดยเซลล์ (cellular immune response) ซึ่งเป็นการทำงานของซลล์เม็ดเลือด เช่น กระบวนการฟาโกไซโทซีส (phagocytosis) การผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion production) กระบวนการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่ (encapsulation) กระบวนการสร้างสารเมลานินที่เปลือก (melanisation) ที่เกี่ยวข้องกับระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase cascade, proPO) และระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีการตอบสนองโดยการหลั่งสารน้ำ (humoral immune response) ที่เป็นการทำงานของโปรตีนต่างๆ ที่อยู่ในน้ำเลือด เช่น แอคกลูตินิน (agglutinin) สารคล้ายไซ โตไคน์และคอมพลีเมนต์ (cytokine and complement like factors) โมดูเลเตอร์ (modulators) สารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (clotting proteins) และสารน้ำที่เป็นผลิตภัณฑ์จากระบบโปรฟีนอลออกซิเดส ที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือด สารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide, AMPs) โดยทั้ง 2 ระบบนี้จะมีการทำงานร่วมกัน เพื่อทำหน้าที่ป้องกันและทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ตัวกุ้ง และเนื่องจากกุ้งมีกระบวนการป้องกันตัวเอง โดยระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดอยู่แล้ว ดังนั้นเป้าหมายของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันก็เพื่อกระตุ้น หรือเพิ่มระดับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ทั้งแบบเซลล์และแบบสารน้ำ ซึ่งการกระตุ้นจะเกิดในช่วงระยะเวลาหนึ่งๆ นำไปสู่การเพิ่มการป้องกันโรคและลดปัจจัยที่มีผลต่อการกดภูมิคุ้มกันของกุ้งในระหว่างการเลี้ยง การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันใช้

หลักการเลียนแบบการติดเชื้อของกุ้งหรือการให้สิ่งแปลกปลอมเข้าไปในร่างกายกุ้ง แต่เชื้อที่ใช้จะไม่สามารถก่อโรคในกุ้งได้ เช่น การใช้เชื้อตาย เชื้ออ่อนกำลังลง หรือเชื้อที่ไม่ก่อโรค เป็นต้น ซึ่งคล้ายๆ กับการใช้วัคซีนในมนุษย์ กุ้งจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยการเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือด โปรตีน หรือเอนไซม์ต่างๆ ในขณะนั้นๆ เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย เมื่อมีการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ จะเกิดกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้ง โดยเริ่มจากปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) ผ่านตัวรับ Pattern Recognition Proteins (PRPs) หรือ Pattern Recognition Receptors (PRRs) ที่อยู่บนผนังเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันสามารถจำแนกได้ว่าสิ่งนี้เป็นแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย จากนั้นโมเลกุลหรือโปรตีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ (signal molecules) จะถูกกระตุ้นให้ทำงาน โดยเซลล์เม็ดเลือดที่อยู่ในระบบเลือดจะเคลื่อนที่เข้ามาในบริเวณที่มีการรุกรานของสิ่งแปลกปลอมต่อมาจะเกิดการทำงานร่วมกันของระบบภูมิคุ้มกันโดยเซลล์เม็ดเลือด ได้แก่ ขบวนการฟาโกไซโทซีส ขบวนการโนดูเลชัน กระบวนการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่ และการทำงานของสารที่อยู่ในน้ำเลือด ได้แก่ สารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ การทำงานของเอนไซม์ในระบบโปรฟีนอลออกซิเดส และสารน้ำต่างๆ ดังนั้นเมื่อมีการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่อง กุ้งจะมีการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเช่นกัน เป็นการเตรียมความพร้อมในการรับมือกับเชื้อก่อโรคที่จะบุกรุกเข้ามาในระหว่างการเลี้ยง

การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งโดยการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่างๆ ในกุ้งเป็นวิธีที่ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น ซึ่งการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเป็นการส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยมีผลต่อการเพิ่มปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันและส่งเสริมการต้านทานเชื้อหรือเพิ่มการรอดตายภายหลังการติดเชื้อก่อโรค มีรายงานว่าการใช้สารประกอบที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจะสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือด กระบวนการฟาโกไซโทซีส (phagocytosis) กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) กิจกรรมการทำลายเชื้อ (antimicrobial activity) ของกุ้งได้ นอกจากนี้ สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันสามารถเพิ่มการคืนกลับสู่สภาพเดิม (recovery state) ของระบบภูมิคุ้มกันภายหลังจากภาวะการกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive states) ซึ่งมีสาเหตุมาจากความเครียดต่างๆ ได้ มีรายงานการทดลองเกี่ยวกับการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งเป็นจำนวนมากซึ่งส่วนใหญ่เป็นการศึกษาเพื่อหาสารประกอบที่เหมาะสมและมีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้ง เพื่อให้ได้สารประกอบที่มีประสิทธิภาพ วิธีการใช้ถูกต้อง และราคาถูก เพื่อให้เป็นทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตที่ก่อให้เกิดจากเลี้ยงกุ้งอย่างยั่งยืน และปลอดสารตกค้าง (มลฤดี, 2559

สารเสริมอาหารที่มีส่วนช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและมีรายงานการใช้ในกุ้ง ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี แอสตาแซนทิน (มลฤดี, 2559

- วิตามิน (Vitamins) เป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อสัตว์น้ำเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ส่งเสริมการเจริญเติบโต และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีรายงานการใช้วิตามินซี และวิตามินอี

ในกุ้ง โดยมีผลต่อการทำงานของอินเตอร์ฟีรอน (interferon) ซึ่งจะส่งผลต่อการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส กิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase activity, SOD) ในกุ้งขาว

- แอสตาแซนทิน (Astaxantin) เป็นสารสีชนิดหนึ่งในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid pigments) ทำหน้าที่ป้องกันเนื้อเยื่อในร่างกายสัตว์ไม่ให้ถูกทำลายเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน จากหน้าที่ดังกล่าวจึงมีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำด้วย กุ้งกุลาดำที่ได้รับแอสตาแซนทินจากยีสต์ *Phaffia rhodozyma* และ *Dunaliella* sp. โดยการผสมอาหาร มีผลทำให้กุ้งมีอัตรารอด และความต้านทานต่อเชื้อเพิ่มขึ้น (นนทวิทย์ และคณะ, 2549; Supamattaya *et al*., 2005)

- สารสกัดจากสัตว์ (animal extracts) เช่น ไคติน/ ไคโตซาน ไคตินเป็นสารประกอบจำพวกโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) โดยพบมากในสิ่งมีชีวิตที่มีเปลือกหรือผนังแข็งหุ้มลำตัว เช่น กุ้ง ปู หอย แมลง นักวิทยาศาสตร์ได้รายงานถึงความสำเร็จในการใช้สารประกอบโพลีแซคคาไรด์หรือคาร์โบไฮเดรตเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยจะเข้าจับกับโมเลกุลของโปรตีนตัวรับ ที่มีชื่อว่า lectin receptor ที่อยู่บนผนังเซลล์ของเม็ดเลือดกุ้ง ผลของการใช้ไคตินและไคโตซานในกุ้งกุลาดำพบว่าสามารถเพิ่มการเจริญเติบโต และเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ในกุ้งขาวได้ (มลฤดี, 2559; Tassanakajon, *et al*., 2013; Niu, *et al*., 2013; Wang and Chen, 2005)

- สารสกัดจากพืช (plant extracts) ได้แก่

สารสกัดจากพืชสมุนไพร (herbal extracts) การทดลองใช้สมุนไพรในการควบคุมโรคกุ้งประสบผลสำเร็จอย่างดีในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย พืชและสมุนไพรสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ เนื่องจากมีสารสำคัญหรือสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ไกลซีร์ไรซิน (glycyrrhizin) ลิควิริติน (liquiritin) และกลาบริดิน (glabridin) รวมทั้งสารออกฤทธิ์อื่นๆ เช่น แอนทราควิโนน (anthraquinone) ซาโปนิน (saponin) อะซาไดแรคติน (azadirachtin) เป็นต้น กุ้งกุลาดำที่กินอาหารผสมสารสกัดกลุ่มโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน *(Durio zibethinus)* และสาร polyvinyllpyrolidone ที่สกัดได้จากพญายอ (*Clinacanthus nutans*)) มีปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และความต้านทานเชื้อแบคทีเรียและไวรัสเพิ่มขึ้น กุ้งขาวที่ได้รับสารกลุ่ม phenolic alkanon ที่สกัดได้จากขิง (*Zingerone officinale*) สารซาโปนินที่สกัดจากยัคคา (*Yacca scidigera*) และสารสกัดจากว่านท้องใบม่วง (*Gynura bicolor*) โดยการผสมอาหารให้กิน มีปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียและไวรัสตัวแดงดวงขาวเพิ่มขึ้น (มลฤดี, 2559; ชนกันต์, 2013; Hai, 2015; Pholdaeng and Pongsamart, 2010; Direkbusarakom *et al*., 1996; Chang *et al*., 2012; Yang *et al*., 2015; Wu *et al*., 2015)

สารสกัดจากสาหร่าย (seaweed extracts) สาหร่ายประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น n-3 และ n-6 polyunsaturated fatty acid (PUFA) โพลิแซคคาไรด์ แร่ธาตุ วิตามิน และสารประกอบโพลีฟีนอล สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น fucoidan,

sodium alginate, sulfated galactan, laminarin และ carragenan จากงานวิจัยในกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่ได้รับ fucoidan ที่สกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum* spp. พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส การผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียและไวรัสตัวแดงดวงขาวเพิ่มขึ้น รวมทั้งกุ้งขาวัยอ่อนที่ได้รับสาร sulfated galactans ที่สกัดจากสาหร่ายสีแดง *Gracilaria fisheri* ผ่านอาร์ทีเมีย มีกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส การผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และกิจกรรมการต้านเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเพิ่มขึ้น (มลฤดี, 2559; Bertin, 2003; Immanuel *et al*., 2012; Kitikiew *et al*., 2013; Wongprasert *et al*., 2014)

1.3 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อการค้าและการส่งออกทำให้มีความพยายามที่จะหาสิ่งที่สามารถนำมาใช้แทนยาปฏิชีวนะในการป้องกันและรักษาโรคสัตว์น้ำซึ่งที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบันคือพืชสมุนไพรเนื่องจากมีข้อดีหลายประการ ได้แก่

1. สมุนไพรเกือบทุกชนิดสามารถหาได้ตามธรรมชาติหรือปลูกเองได้ ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงไม่จำเป็นต้องเสียค่าใช้จ่ายมากในการซื้อยาปฏิชีวนะซึ่งมีราคาแพง นอกจากนี้ยังทำให้เกษตรกรสามารถพึ่งพาตนเองได้โดยไม่จำเป็นต้องพึ่งพาบริษัทผลิตยาปฏิชีวนะ
2. สมุนไพรส่วนใหญ่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยจากการที่มีการใช้รักษาโรคในคนหรือสัตว์ต่างๆ มาเป็นเวลานาน
3. สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่าสามารถใช้ป้องกันและรักษาโรคในคนและสัตว์ต่างๆ ได้
4. สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ (antimicrobial activity) เช่น แบคทีเรีย รา และไวรัสได้
5. สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่ามีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ(antioxidant activity) ซึ่งจะช่วยส่งเสริมสุขภาพได้
6. สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่ามีความสามารถในการลดความเครียดได้ซึ่งการลดความเครียดจะช่วยทำให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตได้ดี และมีโอกาสติดเชื้อได้น้อยลง
7. สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่ามีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulation) ของคนและสัตว์ต่างๆ ได้

สารเคมีที่พบในสมุนไพรจำนวนมากได้รับการพิสูจน์และยืนยันว่ามีส่วนช่วยให้สมุนไพรมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน การกำจัดอนุมูลอิสระ การลดความเครียด และการป้องกันการเกิดโรค ตัวอย่างของสารดังกล่าว เช่น alkaloids, flavonoids, phenolics, terpenoids, steroids และ essential oils (มัลลิกา และอนิวรรตน์, 2564

มีศึกษาการใช้สมุนไพรซึ่งเป็นสารธรรมชาติมาใช้เพื่อรักษาโรคในกุ้ง เช่น สถาพร และคณะ (2539) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกะเม็ง ฟ้าทะลายโจร มะยม และมะระขี้นก ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 50% เอทานอล พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio spp.* ในกุ้งกุลาดำได้ เต็มดวง (2540) รายงานว่าสารสกัดฟ้าทลายโจรที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio spp.* ในกุ้งกุลาดำได้เช่นกัน สุจิตรา (2541) ใช้สารสกัดใบชาเขียวที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH = 7.2 สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* ในกุ้งกุลาดำ และ Immanuel, *et al*. (2004) รายงานว่าสารสกัดเมล็ดละหุ่งที่สกัดด้วยบิวทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyyicus* ในกุ้งแชบ๊วย มัลลิกา และอนิวรรตน์ (2564 นำส่วนเหง้าของข้าวเย็นเหนือและข้าวเย็นใต้ซึ่งพืชสมุนไพรในวงศ์ Smilacaceae นำมาต้มเคี่ยวกับน้ำเพื่อสกัดตัวยาสมุนไพรออกมาให้ได้น้ำสมุนไพรผสมกับอาหาร คลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วนำไปเลี้ยงปลา และในระหว่างการเคลื่อนย้ายลูกปลานำสารสกัดผสมกับน้ำเพื่อแช่ลูกปลาจะช่วยลดความเครียดและลดอัตราการตายได้

กิตติมา และคณะ (2550) ศึกษาการใช้สารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อเป็นทางเลือกในการทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและใช้เป็นสารเสริมสุขภาพในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำซึ่งจากการวิเคราะห์ทางเคมีของสารสกัดขมิ้นชันโดยวิธี TLC/densitometry พบว่าในขมิ้นชันมีสารสำคัญกลุ่ม curcuminoids รวมอยู่กับน้ำมันหอมระเหย และเมื่อนำมาศึกษาในกุ้งกุลาดำขนาด 12 กรัม โดยให้กินอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ชุด ประกอบด้วย 1 ชุดควบคุม (อาหารปกติ) และ 3 ชุดทดลอง (อาหารผสมสารสกัดที่ระดับ 12.5, 25 และ 50 ppm) แล้วทำการประเมินความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* องค์ประกอบทางภูมิคุ้มกัน และประเมินจำนวนแบคทีเรียและ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งกุลาดำ ผลการศึกษาพบว่าความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งกุลาดำชุดที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 12.5 และ 25 ppm มีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันพบว่ากุ้งกุลาดำชุดที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับ 25 และ 50 ppm มีปริมาณเอ็นไซม์ phenoloxidase สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนค่า bactericidal activity ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันทุกชุดทดลองมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนปริมาณ total haemocytes และ percent phagocytosis ในกุ้งกุลาดำทุกชุดทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ สำหรับการประเมินจำนวนแบคทีเรียรวมและ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้พบว่าชุดทดลองที่ได้รับขมิ้นชันทุกชุดมีปริมาณแบคทีเรียและ *Vibrio* spp. ทั้งหมดต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

นันทวัน และประพิณศรา (2550 ศึกษาการเตรียมสารสกัดน้ำจากกากชาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์ โดยเตรียมสารสกัดน้ำจากวัสดุเหลือใช้ในการผลิตชาและผลิตภัณฑ์ชา คือกากชาจากการเตรียมเครื่องดื่มชา และชาอัสสัมคุณภาพต่ำ โดยวิธีต้ม สารสกัดที่ได้นำมาหาปริมาณ Total catechin และอนุมูลอิสระ โดยคิดเทียบเป็นค่า Trolox และ (+) - catechin hydrate สารสกัดที่ได้ใช้ในการศึกษาพัฒนาผลิตภัณฑ์หลายอย่างรวมทั้งสารเสริมอาหารสัตว์ ต้นทุนราคาสารสกัดกากชา

และชาเขียวราคา 2,283 และ 3,658 บาท/กิโลกรัม ตามลำดับ การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดได้มีการทดลองทำผลิตภัณฑ์จากสารสกัดและสารสกัดผสมแป้ง (เพื่อป้องกันการชื้น) พบว่าสูตรที่ดีที่สุด คือ สูตรที่เตรียมจากสารสกัดโดยตรง ซึ่งเมื่อทดลองความคงตัวพบว่าเมื่อตั้งทิ้งไว้ 4 เดือน ที่อุณหภูมิห้องที่ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณ total catechin ลดลงเหลือ 90% และ 70% ตามลำดับ ส่วนปริมาณ total oxidant คิดเป็น (+) - catechin hydrate เพิ่มเป็น 188 และ 202% ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์นี้ใช้ได้กับ feed additive ซึ่งอาศัยปริมาณอนุมูลอิสระ

วีรเทพ และคณะ (2553 ศึกษาการใช้สาหร่ายผมนางเป็นวัตถุดิบในอาหารกุ้งกุลาดำที่ระดับสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) ต่างกัน 6 ระดับ คือร้อยละ 0, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00 และ 6.00 ต่อผลการเจริญเติบโต การกินอาหาร การใช้ประโยชน์จากอาหาร อัตราการรอดชีวิต คุณภาพสีของเนื้อกุ้งกุลาดำหลังการต้ม และความคงทนของอาหารทดลองในน้ำ ผลการศึกษาพบว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองที่มีสาหร่ายผมนางเป็นวัตถุดิบมีการเจริญเติบโตดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีสาหร่ายผมนางในทุกด้าน ได้แก่ น้ำหนักตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลองน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ความยาวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการเจริญเติบโตต่อตัวต่อวัน และยังพบว่าอาหารทดลองที่มีสาหร่ายผมนางเป็นวัตถุดิบในอัตราส่วนร้อยละ 3.00 ให้ผลการเจริญเติบโตดีที่สุดในทุกด้านและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารทดลองสูตรอื่น เช่นเดียวกับตัวแปรการกินอาหารในด้านน้ำหนักอาหารที่กิน และตัวแปรการใช้ประโยชน์จากอาหารในด้านอัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ รวมถึงสีของเนื้อกุ้งกุลาดำหลังการต้มที่พบว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองที่มีสาหร่ายผมนางร้อยละ 3.00 ให้ผลการทดลองดีที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับอาหารทดลองสูตรอื่นเช่นกัน ซึ่งตัวแปรการกินอาหารในด้านอัตราการกินอาหารต่อวัน ตัวแปรการใช้ประโยชน์จากอาหารในด้านประสิทธิภาพการใช้โปรตีน อัตราการรอดชีวิต และความคงทนของอาหารทดลองในน้ำไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างการเลี้ยงด้วยอาหารทดลองแต่ละสูตร สาหร่ายผมนางจึงสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารกุ้งกุลาดำเพื่อเพิ่มสมรรถภาพการผลิตและประสิทธิภาพอาหารกุ้งกุลาดำได้โดยมีระดับสาหร่ายผมนางที่เหมาะสมอยู่ที่อัตราส่วนร้อยละ 3.00

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง (2555) นำข่ามาสกัดสารสำคัญพบว่าสารสกัดข่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งโปรโตซัวคล้ายกรีการีน เชื้อรา แบคทีเรียวิบริโอ และไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งทะเลและสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งทะเลได้ จากการทดลองนำสารสกัดข่ามาคลุกผสมกับอาหารสำเร็จรูปในอัตราส่วนความเข้มข้น 2.5 – 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ให้กุ้งกินเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าภายใน 3 วันแรก ระดับยีนภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งขาวแวนนาไมเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรโตซัว เชื้อรา แบคทีเรียวิบริโอ และกุ้งหายจากอาการขี้ขาว

นันทนัช และภาพิมน (2557 ศึกษาผลของสารสกัดจากใบชาเขียวต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyyicus* ในกุ้งขาวแวนนาไมในกุ้งขาวระยะ PL19 ซึ่งได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus*

ในปริมาณ 10^4 CFU/ml และได้รับสารสกัดใบชาเขียวโดยวิธีการแช่และวิธีการผสมในอาหารเป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบชาเขียวโดยการผสมในอาหารมีอัตรารอด 79.38 ± 2.39% และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดโดยวิธีการแช่มีอัตรารอด 80.00 ± 5.40% ซึ่งทั้งสองกลุ่มมีอัตรารอดสูงกว่ากลุ่มควบคุม (70.00 ± 2.04% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$ และทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดใบชาในการลดปริมาณเชื้อในตับของกุ้งทดลองภายหลังการได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ปริมาณ 10^6 CFU/ml เป็นระยะเวลานาน 5 วัน พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดทั้งวิธีการแช่และวิธีการผสมอาหารตรวจพบเชื้อวิบริโอ 2.3×10^5 CFU/ml และ 4.6×10^5 CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่พบปริมาณเชื้อวิบริโอ 6.4×10^5 CFU/ml แสดงว่าสารสกัดจากใบชาเขียวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อวิบริโอและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งได้

จิราพร และวิวัฒน์ (2559 ศึกษาการพัฒนาผลิตภัณฑ์ผงของสารสกัดสมุนไพรที่เหมาะสมสำหรับสัตว์น้ำโดยการแปรรูปสารสกัดกระเทียมให้อยู่ในรูปผงแห้งด้วยกระบวนการที่มีต้นทุนต่ำ เพื่อเป็นข้อมูลในการผลิตผลิตภัณฑ์สารสกัดสมุนไพรที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งจะส่งเสริมให้มีการผลิตและใช้สารสกัดสมุนไพรในเชิงพาณิชย์ได้จริงในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ในการทดสอบประสิทธิภาพของสาร filler พบว่า maltodextrin (MD) 25% และ hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) 1% ตีโฟมที่ความเร็วรอบสูง เมื่ออบแห้งจะได้ลักษณะของสารสกัดผงแห้ง และสามารถช่วยรักษาสภาพของสารสำคัญ ช่วยเพิ่มอายุการเก็บผงสารสกัดกระเทียมในสภาวะอุณหภูมิ 4 และ 25°C ซึ่งทำการเตรียมสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำและเอทานอลด้วยเทคนิคการแช่เยือกแข็ง (freeze drying) เทคนิคการอบแห้งสุญญากาศ (vacuum dry) เทคนิคการอบลมร้อน (hot air oven) และเทคนิคการพ่นฝอย (spray drying) พบว่าแต่ละเทคนิคให้ปริมาณผลผลิตใกล้เคียงกัน เมื่อวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีด้วยเทคนิค HPLC สำหรับ organosulfur compounds พบว่า ในผลิตภัณฑ์สารสกัดกระเทียมที่ได้มีสารประกอบส่วนใหญ่เป็น alliin, S-allyl-L-cysteine (SAC) และ γ-glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteines (GLUALCs) โดยมีสัดส่วน 70 – 99 % และเมื่อเปรียบเทคนิคการทำแห้งต่างๆ พบว่าเทคนิค freese dry ไม่ผสมและผสม filler สามารถรักษาสารสำคัญของกระเทียมได้ดีที่สุด ได้ผลผลิตรวมของ alliin SAC และ GLUALCs มีค่า 82.44 และ 84.38 % ตามลำดับ เมื่อการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* ของผลิตภัณฑ์ผงสารสกัดกระเทียมด้วยเทคนิค agar disc diffusion พบว่าสอดคล้องกับคุณสมบัติทางเคมีโดยให้ผลการยับยั้งเชื้อใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์จากเทคนิค freeze dry

อุทร และคณะ (2559 ศึกษาผลของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรต่อการเจริญเติบโตและความต้านทางโรคแบคทีเรียในกุ้งขาวแวนนาไม โดยทำการเลี้ยงกุ้งและทดสอบความต้านทานโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* VHAQ001 โดยทำการเลี้ยงกุ้งน้ำหนักเฉลี่ย 3.58 กรัม เป็นระยะเวลา 56 วัน ด้วยอาหารกุ้งที่มีสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรในระดับความเข้มแตกต่างกันได้แก่ 0, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ppm และทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio harveyi* VHAQ001 ด้วย

วิธีการฉีดเชื้อที่ระดับความเข้มข้นซึ่งทำให้กุ้งตาย 50% เป็นระยะเวลา 7 พบว่าปัจจัยต่างๆ ด้านการเจริญเติบโตที่ตรวจวัดไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ระหว่างชุดควบคุมและชุดการทดลอง แต่ชุดทดลองที่เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่ผสมสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรที่ระดับความเข้มข้น 60 ppm มีค่าอัตราการรอดตายสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งอาจสรุปได้ว่าสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรไม่มีผลต่อการเสริมการเจริญเติบโตแต่จะมีผลดีในการเสริมความต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในกุ้งขาวแวนนาไม

นรสิงห์ และคณะ (2562 ศึกษาประสิทธิภาพของอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำมันมะพร้าวที่มีสารสกัดจากขมิ้นอ้อยต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งน้ำมันมะพร้าวผสมสารสกัดจากขมิ้นอ้อยมีสารประกอบเคอร์คูมินอยด์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูงและมีองค์ประกอบของกรดไขมันที่มีสายโซ่ขนาดกลาง ง่ายต่อการดูดซึม เมื่อนำมาผสมกับอาหารเพื่อใช้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในถังพลาสติกกลมขาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3 เมตร โดยใช้กุ้งขาวที่มีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 1.0 – 2.0 กรัมต่อตัว ความหนาแน่น 62 ตัวต่อตารางเมตร ระยะเวลาการเลี้ยง 10 สัปดาห์ และให้อาหารวันละ 3 เวลา พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมน้ำมันมะพร้าวที่มีสารสกัดจากขมิ้นอ้อยที่มีอัตราส่วนของเนื้อมะพร้าวต่อเหง้าของขมิ้นอ้อยสด 5:1 มีการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายสูง

อุทร และคณะ (2564 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria*) ต่อสุขภาพตับและตับอ่อน การต้านอนุมูลอิสระ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคตับและตับอ่อนวายฉับพลันของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) โดยใช้สารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบผสมอาหารกุ้งด้วยความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นคราวละ 10 เท่า ในช่วง 1 – 10,000 ppm แล้วนำไปเลี้ยงกุ้งนาน 56 วัน พบว่ากุ้งมีค่าระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase และ alanine aminotransferase ลดลงแปรผกผันกับระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้นครั้งละ 10 เท่า โดยที่ความเข้มข้น 1,000 และ 10,000 ppm ให้ผลดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$ เนื่องจากตับและตับอ่อนที่มีสุขภาพดีจะมีค่าระดับเอนไซม์ทั้งสองต่ำ ส่วนค่า hepatosomatic index ค่า total antioxidant capacity และค่า phenoloxidase activity พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในทุกความเข้มข้นของสารสกัดที่ผสมอาหารให้กุ้งกินถึงแม้จะมีแนวโน้มสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นก็ตาม และพบว่าค่า phagocytic activity เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อกุ้งกินอาหารผสมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1,000 และ 10,000 ppm และจากการศึกษาความต้านทานโรคตับและตับอ่อนวายฉับพลัน (AHPND) ที่เกิดจากการติดเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* VPP ในลูกกุ้ง พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริมสารสกัดที่ความเข้มข้น 10,000 ppm เป็นเวลา 28 วัน มีอัตราการรอดตายและอัตราการรอดตายสัมพัทธ์มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 88.00 ± 8.37 และ 75.00 ± 17.43 % ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบสามารถส่งเสริมสุขภาพตับและตับอ่อนของกุ้งได้ และอาจเสริมการต้านอนุมูลอิสระ ภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรค AHPND ได้

จีรรัตน์ และคณะ (2020 ศึกษาการเจริญเติบโตและการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันเบื้องต้นในกุ้งขาวจากการใช้ไฮโดรไลเสตสาหร่ายผมนางจากการหมักด้วย *Lactobacillus plantarum* สาย

พันธุ์ 541 เพื่อเป็นส่วนผสมในอาหารเม็ดสำเร็จรูปของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) ที่ระดับ 0, 5, 10, 15 และ 20% พบว่าไฮโดรไลเสตสาหร่ายผมนางมีคุณภาพและคุณสมบัติของการเป็นแหล่งวัตถุดิบที่ดี สามารถใช้ผสมในอาหารกุ้งขาวได้ที่ระดับ 20% ไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว แต่ถ้าจะให้มีประสิทธิภาพสูงสุดทั้งในด้านการเจริญเติบโตและผลการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันเบื้องต้น พบว่าที่ระดับ 10% ของไฮโดรไลเสตสาหร่ายผมนางในอาหารกุ้งขาวถือว่าเป็นระดับที่เหมาะสม

ธิดาพร และคณะ (2564 ศึกษาผลของสารสกัดผักกระสังต่อระบบภูมิคุ้มกันและต้านทานโรคในกุ้งขาวแวนนาไม (*Penaeus vannamei*) พบว่าสารสกัดหยาบผักกระสังไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. และ ไม่สามารถต้านทานโรคไวรัสดวงขาว แต่มีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งขาวแวนนาไมสูงขึ้นและสามารถต้านทานเชื้อ *V. parahaemolyticus* AHPND โดยพบกุ้งขาวแวนนาไมมีอัตรารอดเพิ่มขึ้นในกุ้งที่กินสารสกัดหยาบผักกระสังที่ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จากการศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคของกุ้งที่กินสารสกัดผักกระสัง 3 กรัม ผสมกับอาหาร 1 กิโลกรัม แสดงระดับยีน cMnSOD เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญซึ่งแสดงว่าสารสกัดผักกระสังมีผลในการเพิ่มขบวนการ antioxidative mechanism ของกุ้งขาวแวนนาไมเพราะในสัตว์กลุ่ม Crustaceans, SOD คือ เอนไซม์ antioxidant ที่ลดหรือกำจัด superoxide anions (O^{-2}) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ดังนั้นจากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงว่าสารสกัดหยาบผักกระสังด้วยเอธานอล 95% (crude extract) สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโรค ของกุ้งขาวแวนนาไมให้เพิ่มขึ้นมีผลตอบสนองที่สัมพันธ์ต่อความต้านทาน *V. parahaemolyticus* AHPND ในกุ้งขาวแวนนาไมทำให้มีอัตรารอดตายสูงขึ้น

สุนันทา และคณะ (2565 ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดใบเสม็ดขาวในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในการเลี้ยงกุ้งขาว โดยทำการสกัดใบเสม็ดขาวด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำ และทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัด พบสารสำคัญในกลุ่มแอนทราควิโนน เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน แอลคาลอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ในส่วนของน้ำตาลดีออกซีในสารสกัดเอทานอล แต่ไม่พบเทอร์พีนอยด์ในสารสกัดน้ำ การวิเคราห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และคอนเดนซ์แทนนิน รวมทั้งความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และขนาดวงใสของการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* พบว่าสารสกัดน้ำให้ผลการทดสอบดีกว่าสารสกัดเอทานอล แต่มีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สารสกัดเอทานอลและน้ำมีค่าความเป็นพิษ LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 389.09 และ 331.13 ppm ตามลำดับ จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพบสารสำคัญกลุ่มฟลาโวนอยด์และอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเอทานอล จึงเลือกนำสารสกัดเอทานอลที่มีความเข้มข้น 300 ppm มาศึกษาผลของการเสริมสารสกัดต่อการควบคุมเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* โดยการให้กิน และการแช่ พบว่ากุ้งขนาด P15 ที่เลี้ยงด้วยการแช่ในน้ำที่มีสาร

สกัดเอทานอลความเข้มข้น 300 ppm ต่อน้ำ 30 ลิตร ใช้ระยะเวลา 2 สัปดาห์ มีอัตราการรอดตายเมื่อได้รับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* มากที่สุด และสารสกัดที่เตรียมได้ยังคงสภาพทางเคมีและความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพตลอดอายุการเก็บรักษา 8 สัปดาห์ มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน สามารถนำผลิตภัณฑ์ไปใช้ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมได้เพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคได้

1.4 วัตถุประสงค์

1.4.1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในการเลี้ยงกุ้งขาว

1.4.2 เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สารชีวภัณฑ์ ในการป้องกันโรคกุ้งขาว

1.4.3 เพื่อพัฒนาการเลี้ยงกุ้งโดยใช้สารธรรมชาติที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ผลิตผลงานตีพิมพ์ระดับชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง ภายใน 2 ปี หลังจากเสร็จสิ้นโครงการภายใต้ความรับผิดชอบของผู้ร่วมโครงการ

1.5.2 องค์ความรู้ใหม่ในการประเมินความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาสู่การเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจ

บทที่ 2
วิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 ใบเสม็ดขาว
2.1.2 ลูกกุ้งระยะ PL12
2.1.3 อาหารกุ้งสำเร็จรูป
2.1.4 ขวดแก้วปากกว้างมีฝาปิด
2.1.5 อุปกรณ์สำหรับเตรียมตัวอย่างสารสกัด เช่น ผ้าขาวบาง กะละมัง ถาดฯลฯ
2.1.6 ขวดก้นกลมสำหรับระเหยตัวทำละลาย
2.1.7 บีกเกอร์
2.1.8 อลูมิเนียมแผ่นบาง
2.1.9 กระดาษกรอง
2.1.10 Paper disc
2.1.11 กรวยกรอง
2.1.12 หลอดหยด
2.1.13 จานเพาะเชื้อ
2.1.14 96 - well micro plate
2.1.15 Micropipette พร้อม Tip
2.1.16 หลอดทดลอง
2.1.17 หลอดเซนทริฟิวจ์
2.1.18 Cuvette
2.1.19 Rack for centrifuge
2.1.20 กระบอกฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมหัวเข็มขนาด 26G
2.1.21 บ่อผ้าใบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เมตร

2.2 เครื่องมือ

2.2.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ U-1800
2.2.2 Microplate Reader
2.2.3 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
2.2.4 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
2.2.5 เครื่องระเหยสุญญากาศ
2.2.6 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.2.7 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง

2.2.8 ตู้อบลมร้อนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (hot air oven)

2.2.9 เตาให้ความร้อน (hot plate)

2.2.10 Vortex mixer

2.2.11 เทอร์โมมิเตอร์

2.2.12 ตู้เย็น (refrigerator)

2.2.13 เครื่องดูด – จ่ายสารอัตโนมัติ (autopipette)

2.2.14 เครื่องปั่นละเอียด

2.2.15 ตู้ควบคุมความชื้นและอุณหภูมิ

2.2.16 เครื่องสั่นความถี่สูง (sonicator)

2.2.17 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)

2.2.18 Hemacytometer

2.2.19 เครื่องวัดความเค็มของน้ำแบบหักเหของแสง alinometer แบบ Dual Scale

2.3 สารเคมี เชื้อทดสอบ และอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3.1 ตัวทำละลายสำหรับสกัด ได้แก่ เอทานอล

2.3.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ ได้แก่ กรดแกลลิก (Gallic acid), Folin – Ciocalteu Reagent, เอทานอล, โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3, อลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$), เมทานอล, โซเดียมไนไตรด์ ($NaNO_2$, โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH), โปแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$, ไตรโซเดียมซิเตรต ($C_6H_9Na_3O_9$), Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), ฟอร์มาลีน, โซเดียมคาโคดิเลท ($C_2H_6AsNaO_2$), แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$), แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$), คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต ($CuSO_4$), Trypsin, โซเดียมทาเทรต ($C_4H_4Na_2O_6$), กลูโคส, L – 3, 4 – dihydroxyphenylalanine (L – PODA), DPPH (2, 2 – diphenyl – 1 – picrylhydrazyl), ABTS (2, 2' – azino – bis(3 – ethylbenzothiazoline – 6 – sulfonic acid)), สารมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid), สารมาตรฐาน Butylated hydroxytoluene (BHT), สารมาตรฐานรูติน (Rutin), สารมาตรฐานอัลบูมิน และน้ำกลั่นปราศจากไอออน

2.3.3 สารเคมี แบคทีเรียทดสอบ และอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ ได้แก่ แบเรียมซัลเฟต ($BaSO_4$), โซเดียมคลอไรด์ (NaCl), Dimethyl sulfoxide (DMSO, resazurin indicator, เชื้อทดสอบจากกรมประมง ได้แก่ *Vibrio parahaemolyticus*, Nutrient Agar (NA), Nutrient Broth (NB), Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS) และยาปฏิชีวนะ Tetracyclin

2.4 การสกัดและการวิเคราะห์คุณภาพของสารสกัด

2.4.1 การเตรียมสารสกัด

เก็บใบเสม็ดขาวจากพื้นที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง นำมาทำความสะอาด ผึ่งลมให้แห้ง แล้วบดหยาบ นำไปสกัดด้วยการแช่หมักในตัวทำละลายเอทานอลในอัตราส่วนใบเสม็ดขาวบดหยาบ 1 กิโลกรัม ต่อตัวทำละลายเอทานอล 5 ลิตร เป็นเวลา 7 วัน กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนกากไปสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลอีก 2 ครั้ง นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และนำส่วนสารละลายไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ แล้วทำให้แห้งด้วยเทคนิค Freeze dry และเก็บไว้ในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง

2.4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมผลิตภัณฑ์พร้อมใช้

นำผงสารสกัดเสม็ดขาวจากข้อ 2.4.1 มาเตรียมผลิตภัณฑ์พร้อมใช้โดยนำมาละลายในตัวทำละลายเอทานอลและน้ำให้มีความเข้มข้น 300 ppm ในอัตราส่วน 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10 ตามลำดับ สังเกตการละลาย และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟินอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด การออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้แต่ละสภาวะ

2.4.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟินอลิกทั้งหมด (ดัดแปลงตามวิธีการของ Messyasz, *et al*., 2018

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟินอลิกทั้งหมดโดยนำผลิตภัณฑ์ตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยการทำปฏิกิริยากับ Folin – Ciocalteu Reagent (FCR โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน มีขั้นตอนดังนี้

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในตัวทำละลายน้ำ

2) การสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

- นำสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมาเจือจางด้วยน้ำให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0 – 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- นำสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเติมน้ำกลั่น 1.58 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Folin – Ciocalteu ลงไป 0.1 มิลลิลิตร เขย่า และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตอิ่มตัว (Sat.Na_2CO_3 ลงไป 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปริมาตรสุดท้ายจะเท่ากับ 2 มิลลิลิตร

- นำไปเขย่าให้สารผสมกันด้วยเครื่องผสม (Vortex ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

- นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดช่วงความยาวคลื่น 200 – 800 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV – Vis Spectrophotometer วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด โดยใช้น้ำเป็นแบลงค์ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐานแกลลิกมาเขียนกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดต่อไป

3) การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

- นำผลิตภัณฑ์ตัวอย่างที่เตรียมได้ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเติมน้ำกลั่น 1.58 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Folin – Ciocalteu ลงไป 0.1 มิลลิลิตร เขย่า และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตอิ่มตัว (Sat.Na_2CO_3 ลงไป 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปริมาตรสุดท้ายจะเท่ากับ 2 มิลลิลิตร

- นำไปเขย่าให้สารผสมกันด้วยเครื่องผสม (Vortex ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

- นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดตามข้อ 2 ด้วยเครื่อง UV – Vis Spectrophotometer โดยใช้สารละลายน้ำเป็นแบลงค์

- คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด (mg GAE/mg extract

$$C\ [mg\ GAE/\ g\ CE] = Ci\ [mg\ ml^{-1}] * (V_1\ [ml]/V_2\ [ml]) * (V_3\ [ml]/m\ [mg])$$

เมื่อ C_i หมายถึง ค่าความเข้มข้นที่เทียบได้จากกราฟมาตรฐาน [mg ml^{-1}]

V_1 หมายถึง ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (ml

V_2 หมายถึง ปริมาตรของสารสกัดที่ใช้ในปฏิกิริยา (ml

V_3 หมายถึง ปริมาตรของสารสกัดที่เตรียมเป็นสารตัวอย่าง (ml

m หมายถึง มวลของสารสกัดที่นำมาเตรียมเป็นสารตัวอย่าง (mg

2.4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ดัดแปลงตามวิธีการของ Messyasz, *et al*., 2018

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเทียบกับสารมาตรฐานรูติน(rutin) โดยนำสารสกัดมาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วยวิธีอลูมิเนียมคลอไรด์ โดยอาศัยการเกิดปฏิริยาเชิงซ้อนระหว่าง Al^{3+} กับหมู่คาร์บอนิลและหมู่ไฮดรอกซิลของฟลาโวนส์และฟลาโวนอลส์ซึ่งจะทำให้ผลของปฏิริยาเกิดสารละลายที่มีสีเหลือง โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานรูติน

เตรียมสารละลายมาตรฐานรูตินความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายเมทานอล

2) การสร้างกราฟมาตรฐานรูติน

- นำสารละลายมาตรฐานรูติน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0 – 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- นำสารละลายมาตรฐานรูติน แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร มาเติมเมทานอล 0.8 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย 5% $NaNO_2$ ลงไป 0.06 มิลลิลิตร เขย่า และนำส่วนผสมเก็บไว้ที่มืด เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย 10% $AlCl_3$ ลงไป 0.06 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำส่วนผสมเก็บไว้ที่มืด เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย 1M NaOH ลงไป 0.4 มิลลิลิตร ตามด้วยเมทานอล 0.28 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำส่วนผสมเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที

- นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดช่วงความยาวคลื่น 200 – 800 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV - Vis Spectrophotometer วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด โดยใช้เมทานอลแทนสารละลายรูตินเป็นแบลงค์ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐานรูตินมาเขียนกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดต่อไป

3) การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัด

- นำผลิตภัณฑ์ตัวอย่างที่เตรียมได้ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร มาเติมเมทานอล 0.8 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย 5% $NaNO_2$ ลงไป 0.06 มิลลิลิตร เขย่า และนำส่วนผสมเก็บไว้ที่มืด เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย 10% $AlCl_3$ ลงไป 0.06 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำส่วนผสมเก็บไว้ที่มืด เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย 1M NaOH ลงไป 0.4 มิลลิลิตร ตามด้วยเมทานอล 0.28 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำส่วนผสมเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที

- นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดตามข้อ 2 ด้วยเครื่อง UV - Vis Spectrophotometer วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด โดยใช้เมทานอลแทนที่สารตัวอย่างเป็นแบลงค์

- คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัด ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมของรูตินต่อสารสกัดหยาบ (mg RE/mg extract

$$C\ [mg\ RE/\ g\ CE] = Ci\ [mg\ ml^{-1}] * (V_1\ [ml]/V_2\ [ml]) * (V3\ [ml]/m\ [mg])$$

เมื่อ C_i หมายถึง ค่าความเข้มข้นที่เทียบได้จากกราฟมาตรฐาน [mg ml^{-1}]

V_1 หมายถึง ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (ml

V_2 หมายถึง ปริมาตรของสารสกัดที่ใช้ในปฏิกิริยา (ml

V_3 หมายถึง ปริมาตรของสารสกัดที่เตรียมเป็นสารตัวอย่าง (ml

m หมายถึง มวลของสารสกัดที่นำมาเตรียมเป็นสารตัวอย่าง (mg

2.4.2.3 การทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

2.4.2.3.1 DPPH Assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของผลิตภัณฑ์ตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี และ BHT (ดัดแปลงตามวิธีการของ Ling, *et al*., 2015

- การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี และ BHT

เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี และ BHT ให้มีความเข้มข้น 300 ppm โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย

- ปิเปตสารละลายมาตรฐาน/ผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร เติม 0.1 mM DPPH ลงไป 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

- นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง DPPH radical

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(A_{control} - A_{sample}) \times 100}{A_{control}}$$

เมื่อ $A_{control}$ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

A_{sample} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน/ผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง

2.4.2.3.2 ABTS Assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของผลิตภัณฑ์ตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี และ BHT (ดัดแปลงตามวิธีการของ Laosirisathian, *et al*., 2020

- การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี และ BHT

เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี และ BHT ให้มีความเข้มข้น 300 ppm โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย

- การเตรียมสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS

เตรียมสารละลาย 7 mM ABTS และสารละลาย 2.45 mM $K_2S_2O_8$ ผสมสารละลาย ABTS และ $K_2S_2O_8$ ในอัตราส่วน 1 : 0.5 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 12 – 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเจือจางสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยเอทานอล ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

- ปิเปตสารละลายมาตรฐาน/ผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ลงไป 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

- นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ABTS radical

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(A_{control} - A_{sample}) \times 100}{A_{control}}$$

เมื่อ $A_{control}$ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS

A_{sample} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน/ผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง

2.4.2.4 การทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

1) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยการ streak เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ลงบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) ที่มี 2% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนด ทำการเขี่ยเชื้อ 3 – 5 single colonies โดยใช้ loop และใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) ที่มี 2% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 5 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบเชื้อให้มีความขุ่นมาตรฐาน McFarland No. 0.5 โดยใช้เครื่อง spectrophotometer วัดค่า absorbance ที่ 625 nm จะได้ค่า OD ระหว่าง 0.08 – 0.10 ถ้าเชื้อขุ่นมากกว่าความขุ่นมาตรฐานให้เจือจางด้วย sterile sodium chloride ความเข้มข้น 0.85% (0.85% NaCl) เชื้อที่มีความขุ่นเท่ากับความขุ่นมาตรฐานนี้จะมีจำนวนเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml

2) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง

- ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด โดยวิธี disc diffusion (ดัดแปลงจาก CLSI, 2009) ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ (sterile cotton swab) จุ่มลงในเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมได้ที่อยู่ในอาหาร Nutrient Broth (NB) ที่มี 2% NaCl นำมา swab เป็น 4 ระนาบ (four dimention swab) ให้เชื้อกระจายทั่วผิวหน้าอาหาร Nutrient Agar (NA) ที่มี 2% NaCl ปล่อยให้ผิวหน้าอาหารแห้ง 3 – 5 นาที และใช้ปากคีบปราศจากเชื้อ (sterile forceps) คีบแผ่น paper disc ที่ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร วางบนผิวของอาหาร Nutrient Agar (NA) ที่มี 2% NaCl ที่ swab เชื้อแล้ว ทำการกดเบาๆ ให้แผ่น paper disc ติดกับวุ้น โดยให้แผ่น paper disc ห่างกัน 15 – 20 มิลลิเมตร และห่างจากขอบจานอาหาร 15 มิลลิเมตร

- นำผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง ความเข้มข้น 300 ppm ปริมาตร 10 µl หยดลงกลางแผ่น paper disc จะได้ปริมาณสารสกัด 3 µg/disc นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการทดลองโดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์ (vernier calipers) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (clear zone) หรือบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) รอบแผ่น paper disc ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน สำหรับชุดควบคุม

negative control ใช้เป็น DMSO และ positive control ใช้เป็นยาปฏิชีวนะ Tetracyclin (30 µg/disc)

- เมื่อบ่มเชื้อครบเวลา 24 ชั่วโมง ให้วัดขนาดของโซนใส (inhibition zone ที่เกิดขึ้น โดยวัดจากขอบโซนข้างหนึ่งไปยังขอบโซนอีกข้างหนึ่ง โดยให้ผ่านจุดศูนย์กลางของ paper disc ด้วย บันทึกหน่วยเป็นมิลลิเมตร (ขอบโซนที่วัดต้องเป็นโซนที่ชัด ถ้ามีเชื้อขึ้นบางๆ ให้ถือว่าบริเวณนั้นยังมีปริมาณยาหรือสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

ขนาดของโซนใส = (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disc และโซนใสของเชื้อ –
(Inhibition zone, มิลลิเมตร (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disc 6 มิลลิเมตร

$$\text{อัตราส่วนของ Inhibition zone} = \frac{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสของเชื้อ}}{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ negative control}}$$

3) การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้
(Minimum inhibitory concentration, MIC)

ทดสอบหาค่า MIC โดยวิธี micro dilution method (ดัดแปลงจาก CLSI, 2009) เตรียมเชื้อแบคทีเรียตามวิธีการ ข้อ 1 และผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง ความเข้มข้น 300 ppm จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) ที่มี 2% NaCl ใส่ใน 96 well plate หลุมที่ 2 – 12 หลุมละ 100 ไมโครลิตร และนำผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมที่ 1 และ 2 ทำการเจือจางสารสกัดจากหลุมที่ 2 ลงครึ่งละ 2 เท่า ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) ที่มี 2% NaCl ที่ใส่ไว้ก่อนหน้านี้ จนถึงหลุมที่ 11 จะได้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดอยู่ระหว่าง 0.0015 – 1.5 mg/ml จากนั้นเติมเชื้อที่ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 1×10^{8} CFU/ml ลงในหลุมที่ 1 – 12 แต่ละหลุมปริมาตร 100 µl นำ 96 well plate บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม 50 µl ของ 0.18% resazurin indicator ลงไปในแต่ละหลุม บ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ อ่านผลการทดสอบเมื่อครบเวลาที่กำหนด โดยการอ่านผลการทดสอบค่า MIC อาศัยการเปลี่ยนสีของ resazurin ตามวิธีของ Drummond and Waigh (2000) คือ ถ้าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (ผลบวก resazurin จะมีสีน้ำเงินหรือสีม่วงเหมือนเดิม แต่ถ้าสารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (ผลลบ เชื้อจะสามารถเจริญเติบโตและเปลี่ยนสี resazurin ให้เป็นสีชมพู โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (โดยเลือกค่า MIC ที่เหมือนกันอย่างน้อย 2 ซ้ำ)

4) การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentra-tion, MBC)

ทดสอบหาค่า MBC โดยใช้วิธี drop plate (ดัดแปลงจาก CLSI, 2009) หยดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจากการทดสอบหาค่า MIC ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) ที่มี 2% NaCl โดยใช้ปริมาตร 10 µl แล้วปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการทดสอบหาค่า MBC โดยบันทึกค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ คือไม่มีโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) ที่มี 2% NaCl ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เพื่อยืนยันผลการทดลอง

2.5 การใช้สารสกัดเสม็ดขาวเพื่อเสริมสุขภาพกุ้งขาว

2.5.1 การเตรียมระบบทดลอง

ทำการทดลองเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะ PL12 ในบ่อผ้าใบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เมตร ความสูง 1 เมตร ปริมาตร 50 ลูกบาศก์เมตร ในอัตราการปล่อย 120 ตัวต่อตารางเมตร หรือ 6,000 ตัว จำนวน 2 บ่อ ทำความสะอาด เติมน้ำทะเลที่สะอาดและผ่านการวิเคราะห์คุณภาพน้ำที่มีระดับความเค็ม 25 – 30 ppt ให้มีระดับความสูง 80 – 90 เซนติเมตร แต่ละบ่อทดลองติดตั้งระบบน้ำหมุนเวียน ให้อากาศในบ่อทดลองตลอดเวลา ทำการดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำสัปดาห์ละ 1 – 2 ครั้ง ตามความเหมาะสม

2.5.2 การเตรียมอาหาร

อาหารที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไมตามช่วงการเจริญเติบโต และปรับเปลี่ยนปริมาณอาหารตามระยะเวลาตลอดการเลี้ยง 90 วัน

อาหารชุดควบคุม : เตรียมอาหารชุดควบคุมโดยใช้น้ำมันปลาคลุกผสมกับอาหารสำเร็จรูปในอัตราส่วนอาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม ต่อน้ำมันปลา 20 มิลลิลิตร

อาหารชุดทดลอง : เตรียมอาหารชุดทดลองโดยนำสารสกัดเสม็ดขาวความเข้มข้น 300 ppm ที่ละลายในเอทานอล : น้ำ ในอัตราส่วน 80 : 20 สเปรย์บนอาหารสำเร็จรูป คลุกให้ทั่ว ผึ่งลมให้แห้ง และเคลือบด้วยน้ำมันปลาในอัตราส่วนสารสกัด 50 มิลลิลิตร ต่ออาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม ต่อน้ำมันปลา 20 มิลลิลิตร

2.5.3 การให้อาหาร

ระยะเริ่มต้นกุ้งมีขนาด 0.4 กรัม/ตัว ใช้อาหารสำเร็จรูป เบอร์ 1 เป็นระยะเวลา 40 วัน เมื่อกุ้งมีขนาด 1.6 กรัม/ตัว จึงปรับใช้อาหารสำเร็จรูป เบอร์ 2 เป็นระยะเวลา 16 วัน เมื่อกุ้งมีขนาด 3 กรัม จึงปรับใช้อาหารสำเร็จรูป เบอร์ 3 เป็นระยะเวลาอีก 15 วัน และเมื่อกุ้งมีขนาดมากกว่า 7

กรัม จึงปรับใช้อาหารสำเร็จรูป เบอร์ 4 ตลอดระยะเวลาในการเลี้ยงจะเพิ่มปริมาณอาหาร 20 – 30 กรัม ทุกวัน

ชุดควบคุม : ให้อาหารชุดควบคุมทุกวัน วันละ 3 มื้อ ตลอดระยะการทดลอง

ชุดทดลอง : ในระยะการเลี้ยง 30 วันแรก ให้อาหารชุดทดลองทุกวัน วันละ 3 มื้อ หลังจาก 30 วันแรก ให้อาหารชุดทดลอง 1 สัปดาห์ สลับกับอาหารชุดควบคุม 1 สัปดาห์ จนครบระยะการทดลอง

2.5.4 การตรวจวัดคุณภาพน้ำ

1) ทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำระหว่างการทดลองทุกๆ สัปดาห์ ตลอดการทดลอง โดยดัชนีที่จะใช้วิเคราะห์คุณภาพน้ำประกอบด้วย

- ความเค็มของน้ำ : วัดความเค็มของน้ำแบบหักเหของแสงด้วย Salinometer แบบ Dual Scale
- pH ของน้ำ : วัดด้วย pH meter รุ่น Milwaukee PH55
- ปริมาณค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) : วัดด้วยวิธี Titration
- ปริมาณไนไตรท์ : วัดด้วยวิธี Colorimetry Method
- ปริมาณแอมโมเนียม : วัดด้วยวิธี Modified Indophenol blue
- ความกระด้าง (Hardness) ของน้ำ, ปริมาณแคลเซียม (Calcium) ในน้ำ และปริมาณแมกนีเซียม (Magnesium) ในน้ำ วัดด้วยวิธี EDTA Titrametric
- ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนที่ละลายในน้ำ (DOC) : วัดด้วยวิธี Titration

2) ทำการตรวจเชื้อของน้ำในบ่อเลี้ยงทั้ง 2 ชุดการทดลอง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยทำการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS) เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย กลุ่ม *Vibrio* spp.

2.5.5 การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

2.5.5.1 สุ่มตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไมจากการทดลองบ่อละ 5 ตัว ทุกๆ 10 – 20 วัน เก็บตัวอย่างตับกุ้ง ทำการตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง และเพาะเชื้อจากตัวอย่างตับโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS) เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย กลุ่ม *Vibrio* spp.

2.5.5.2 การตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดรวม และการวัดค่า Phenoloxidase activity

1) การเจาะเลือดกุ้ง (ตามวิธีการของ Vargas – Albores, *et al*., 1993)

ทำการเจาะเลือดกุ้งจากบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ของกุ้งแต่ละตัว ด้วยกระบอกฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร หัวเข็ม 26G นำเลือดที่ได้มาผสมกับสารป้องกันเลือดแข็งตัว (30 mM

trisodium citrate, 340 mM NaCl, 10 mM EDTA, 120 mM glucose, pH 7.55) ในอัตราส่วน 1:1

2) การตรวจสอบปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocyte count, THC)

- นำเลือดกุ้งที่ผสมอยู่ในสารป้องกันเลือดแข็งตัวมาผสมกับ 10% ฟอร์มาลดีไฮด์ ในอัตรา 1:1 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- นับจำนวนเม็ดเลือดรวมทั้งหมด โดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด (hemacytometer) และคำนวณปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้โดยรายงานเป็นจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรเลือด

3) การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity)

- นำเลือดกุ้งจากข้อ 1 ปั่นตกตะกอนเลือด ดด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่อยๆ นำ Plasma (ส่วนใส ออกจากหลอดให้หมด เติมสารละลาย CAC buffer ปริมาณ 300 ไมโครลิตร แล้วผสมเบาๆ เพื่อละลายตะกอนของเม็ดเลือดที่ก้นหลอด ทำให้เซลล์แตกโดยการ sonicate เป็นเวลา 10 นาที ปั่น ตกตะกอนเลือดด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 16,000 x g เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใส (hemolysate) สำหรับวัดค่า PO และ Protein

- การวัดค่า Phenoloxidase activity

นำ hemolysate ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 1% Trypsin ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ใน 96 – well บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม L-DOPA ปริมาณ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุกๆ 2 นาที เป็นเวลา 20 นาที โดยใช้สารละลาย CAC buffer แทน hemolysate เป็นแบลงค์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณ Phenoloxidase activity (unit/min/mg protein) โดย 1 unit ของ phenoloxidase เป็นความสามารถของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่สามารถเปลี่ยน L-PODA ไปเป็นโดปามีน (dopamin) เท่ากับการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.001/min/mg protein

- การวัดค่า Protein

นำ hemolysate ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำปราศจากไอออนปริมาณ 900 ไมโครลิตร เติมสารละลาย alkaline copper solution ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เขย่า บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย Folin reagent (1:10) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร เขย่า บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นแบลงค์ เทียบปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐานของ albumin ที่มีความเข้มข้นในช่วง 0 – 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.5.6 การศึกษาการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย อัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (ตามวิธีการของวัฒนา และคณะ, 2563

สุ่มตัวอย่างกุ้งจากทั้ง 2 ชุดการทดลอง จำนวน 15 ตัว/บ่อ เพื่อชั่งน้ำหนักทุกๆ 10 – 20 วัน ตลอดการเลี้ยง แล้วนำมาศึกษาการเจริญเติบโต (ในรูปค่าเฉลี่ยของข้อมูล ได้แก่ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวัน (ADG, กรัมต่อวัน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate: FCR) และอัตรารอดตาย (survival rate, %) โดยใช้สูตรในการคำนวณดังนี้

อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG, กรัมต่อวัน) $= \frac{(W_2 - W_1) \times 100}{t}$

W_2 คือ น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
W_1 คือ น้ำหนักกุ้งเมื่อเริ่มการทดลอง
t คือ ระยะเวลา (วัน

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) $= \frac{W_{feed}}{W_2 - W_1}$

W_{feed} คือ น้ำหนักอาหารที่กุ้งกินทั้งหมด
W_2 คือ น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
W_1 คือ น้ำหนักกุ้งเมื่อเริ่มการทดลอง

อัตรารอดตาย (Survival rate, %) $= \frac{\text{จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนกุ้งเมื่อเริ่มการทดลอง}}$

2.5.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (One – way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's New multiple range test : DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2.6 สถานที่ทำการทดลอง และระยะเวลาการทดลอง

ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการเคมี และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา อาคารปฏิบัติการ สาขาศึกษาทั่วไป, ห้องปฏิบัติการโรคสัตว์น้ำ สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์ประมง และศูนย์วิสาหกิจศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง

บทที่ 3
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

3.1 การเตรียมสารสกัด

เก็บตัวอย่างใบเสม็ดขาว บริเวณอาคารเรียนรวมและปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลโดยวิธีการแช่หมัก (maceration กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแล้วทำแห้งด้วยเทคนิค Freeze dry ให้ผลผลิตร้อยละ 6.67

3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมผลิตภัณฑ์พร้อมใช้

- ความสามารถในการละลาย

นำผงสารสกัดเสม็ดขาวมาเตรียมผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ โดยนำมาละลายในตัวทำละลายเอทานอลและน้ำให้มีความเข้มข้น 300 ppm ในอัตราส่วน 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10 ตามลำดับ เมื่อสังเกตการละลายพบว่าผงสารสกัดเสม็ดขาวละลายได้ดีที่สุดในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในอัตราส่วน 8:2 ให้ผลการละลายแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ความสามารถในการละลายของผงสารสกัดเสม็ดขาว

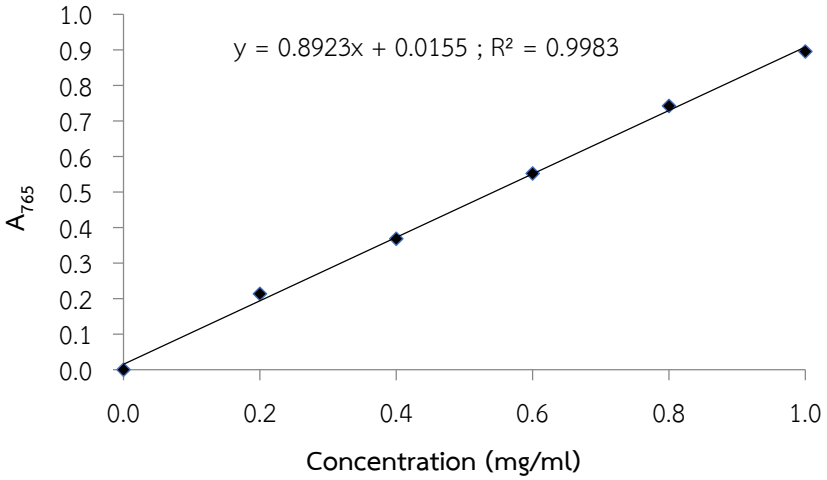
ตัวอย่าง	อัตราส่วนของตัวทำละลาย เอทานอล : น้ำ	ความสามารถในการละลาย
S0	10 : 0	++
S1	9 : 1	+++
S2	8 : 2	++++
S3	7 : 3	+++
S4	6 : 4	++
S5	5 : 5	+
S6	4 : 6	++
S7	3 : 7	++
S8	2 : 8	+
S9	1 : 9	++
S10	0 : 10	+

หมายเหตุ : ++++ หมายถึง ละลายได้หมด
+++ หมายถึง ละลายได้ปานกลาง
++ หมายถึง ละลายได้น้อย
+ หมายถึง ละลายได้น้อยมาก

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ทั้ง 11 สภาวะมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟินอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด การออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ให้ผลการทดสอบดังนี้

- **ปริมาณสารประกอบฟินอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)**

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ที่ระดับความเข้มข้น 0 – 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ($y = 0.8923x + 0.0155$; $R^2 = 0.9983$ ดังแสดงในภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ตัวอย่างรายงานเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/มิลลิกรัมสารสกัด (mg GAE/mg extract พบว่าผงสารสกัดเสม็ดขาวที่ละลายในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในอัตราส่วน 8:2 มีค่ามากที่สุด เท่ากับ 11.48 ± 0.00 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/มิลลิกรัมสารสกัด ดังแสดงในตารางที่ 3.2

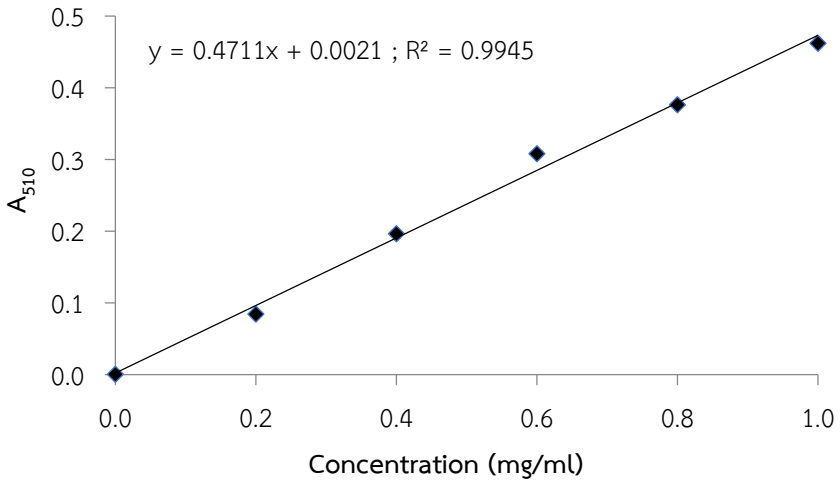
ตารางที่ 3.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	อัตราส่วนของตัวทำละลาย เอทานอล : น้ำ	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/mg extract
S0	10 : 0	7.76 ± 0.00^{g}
S1	9 : 1	$10.07 \pm 0.38^{c,d}$
S2	8 : 2	11.48 ± 0.00^{a}
S3	7 : 3	11.02 ± 0.02^{b}
S4	6 : 4	10.11 ± 0.01^{c}
S5	5 : 5	$9.91 \pm 0.02^{c,d}$
S6	4 : 6	9.88 ± 0.01^{d}
S7	3 : 7	9.65 ± 0.02^{e}
S8	2 : 8	8.97 ± 0.01^{f}
S9	1 : 9	7.51 ± 0.01^{h}
S10	0 : 10	3.94 ± 0.02^{i}

หมายเหตุ : ตัวเลขที่มีอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$

- **ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด**

ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานรูติน ที่ระดับความเข้มข้น 0 – 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ($y = 0.4711x + 0.0021$; $R^2 = 0.9945$ ดังแสดงในภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 กราฟมาตรฐานของรูติน

ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ตัวอย่างรายงานเป็นมิลลิกรัมสมมูลของรูติน/กรัมสารสกัด (mg RE/g extract พบว่าผงสารสกัดเสม็ดขาวที่ละลายในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในอัตราส่วน 8:2 มีค่ามากที่สุด เท่ากับ 0.15 ± 0.00 มิลลิกรัมสมมูลของรูติน/กรัมสารสกัด ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	อัตราส่วนของตัวทำละลาย เอทานอล : น้ำ	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg RE/g extract
S0	10 : 0	76.38 ± 0.35^{i}
S1	9 : 1	127.33 ± 0.35^{c}
S2	8 : 2	153.27 ± 0.20^{a}
S3	7 : 3	135.70 ± 0.20^{b}
S4	6 : 4	123.20 ± 0.20^{d}
S5	5 : 5	105.98 ± 0.20^{f}
S6	4 : 6	110.46 ± 0.20^{e}
S7	3 : 7	100.56 ± 0.20^{g}
S8	2 : 8	90.53 ± 0.00^{h}
S9	1 : 9	75.79 ± 0.20^{j}
S10	0 : 10	44.42 ± 0.20^{k}

หมายเหตุ : ตัวเลขที่มีอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$

- **ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ**

การทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ตัวอย่างด้วยวิธี DPPH Assay และ ABTS Assay เทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี และ BHT พบว่าผลิตภัณฑ์ตัวอย่างแต่ละชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยผงสารสกัดเสม็ดขาวที่ละลายในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในอัตราส่วน 8:2 สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS มากที่สุด มีค่าเท่ากับ 90.21 ± 0.35 และ 99.52 ± 0.08 % ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	อัตราส่วนของตัวทำละลาย เอทานอล : น้ำ	% inhibition	
		DPPH	ABTS
S0	10 : 0	84.37 ± 0.33^{d}	98.18 ± 0.08^{e}
S1	9 : 1	87.08 ± 0.30^{c}	98.37 ± 0.08^{d}
S2	8 : 2	90.21 ± 0.35^{a}	99.52 ± 0.08^{a}
S3	7 : 3	87.96 ± 0.30^{b}	98.99 ± 0.14^{b}
S4	6 : 4	86.97 ± 0.33^{c}	98.75 ± 0.08^{c}
S5	5 : 5	84.56 ± 0.35^{d}	98.71 ± 0.00^{c}
S6	4 : 6	82.59 ± 0.35^{e}	98.61 ± 0.08^{c}
S7	3 : 7	80.16 ± 0.39^{f}	98.23 ± 0.08^{d,e}
S8	2 : 8	80.14 ± 0.22^{f}	97.84 ± 0.14^{f}
S9	1 : 9	77.94 ± 0.42^{g}	97.70 ± 0.00^{f,g}
S10	0 : 10	77.74 ± 0.34^{g}	97.65 ± 0.08^{g}

หมายเหตุ : ตัวเลขที่มีอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.944, 0.761 และ 0.804 ตามลำดับ ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.872 และ 0.889 ตามลำดับ การออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH มีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.889 ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.5

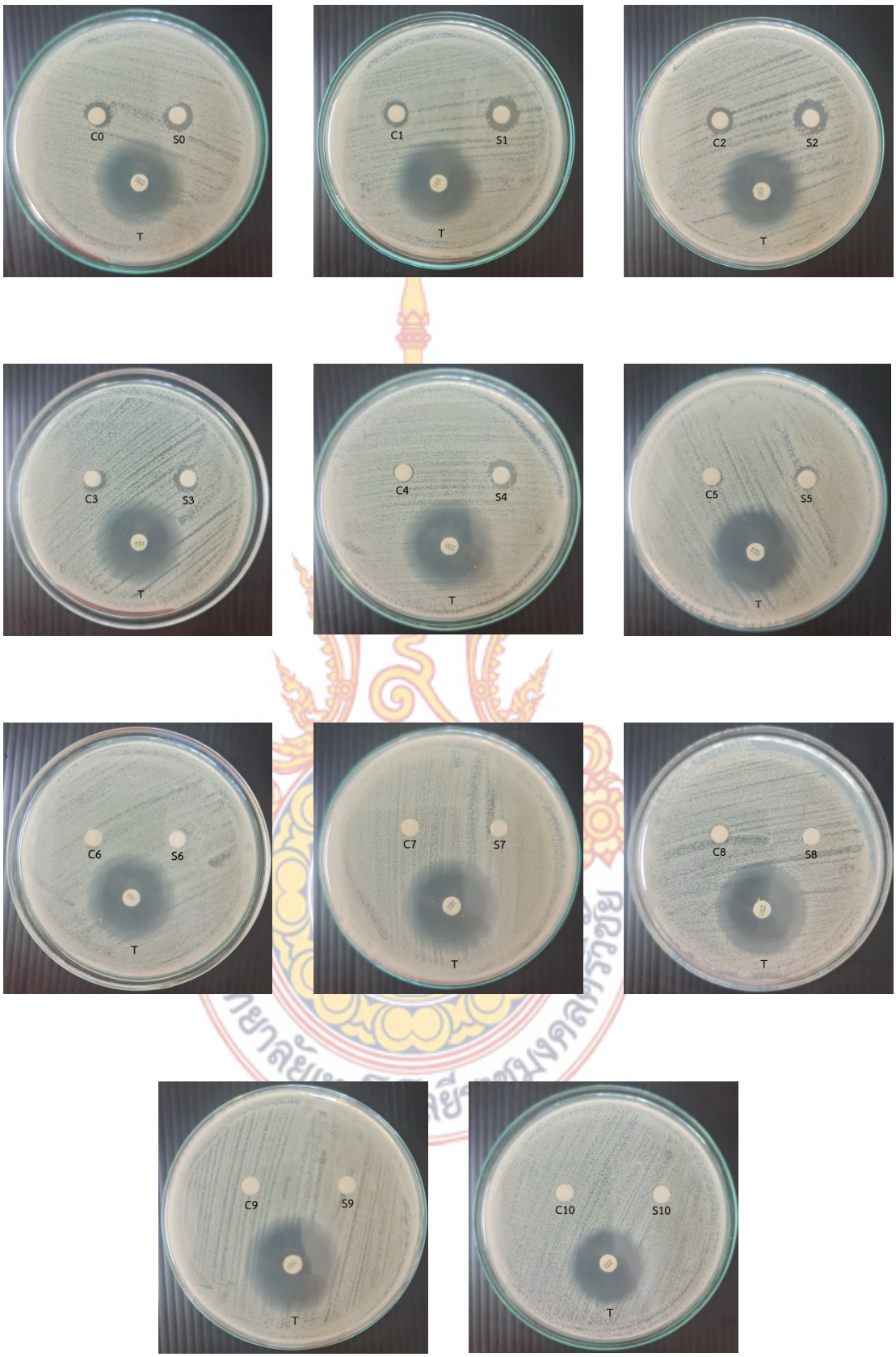
ตารางที่ 3.5 ความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบฟินอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง

Correlation		TPC	TFC	DPPH	ABTS
TPC	Pearson Correlation	1	.944**	.761**	.804**
	Sig. (2-tailed)		.000	.000	.000
	N	33	33	33	33
TFC	Pearson Correlation	.944**	1	.872**	.889**
	Sig. (2-tailed)	.000		.000	.000
	N	33	33	33	33
DPPH	Pearson Correlation	.761**	.872**	1	.889**
	Sig. (2-tailed)	.000	.000		.000
	N	33	33	33	33
ABTS	Pearson Correlation	.804**	.889**	.889**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	
	N	33	33	33	33

หมายเหตุ : Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

- **ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย**

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง (3 µg/disc ด้วยวิธี Disc diffusion method เทียบกับยาปฏิชีวนะ Tetracyclin (T, 30 µg/disc) และตัวทำละลายตามสภาวะการละลาย ให้ผลดังแสดงให้ภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง

เมื่อพิจารณาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*		
	Inhibition zone (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
S0	1.71 ± 0.17^{c}	0.38	> 3.00
S1	2.61 ± 0.35^{b}	0.75	> 3.00
S2	2.94 ± 0.07^{b}	0.75	> 3.00
S3	0.88 ± 0.25^{d}	1.50	> 3.00
S4	1.89 ± 0.25^{c}	0.75	> 3.00
S5	0.00 ± 0.00^{d}	0.75	> 3.00
S6	0.00 ± 0.00^{d}	1.50	> 3.00
S7	0.00 ± 0.00^{d}	1.50	> 3.00
S8	0.00 ± 0.00^{d}	3.00	> 3.00
S9	0.00 ± 0.00^{d}	> 3.00	> 3.00
S10	0.00 ± 0.00^{d}	> 3.00	> 3.00
Tetracyclin	28.87 ± 0.168^{a}		

หมายเหตุ : ตัวเลขที่มีอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$

จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดเอทานอลต่อกุ้งขาวแวนนาไมระยะ PL15 ในเวลา 96 ชั่วโมง (LC50 – 96 hrs) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% มีค่าเท่ากับ 331.13 (244.70 – 497.49) ppm (สุนันทา และคณะ, 2565 ดังนั้นผลิตภัณฑ์ตัวอย่างที่ละลายด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลกับน้ำที่ระดับความเข้มข้น 300 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เมื่อพิจารณาร่วมกับความสามารถในการละลายและคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางเคมีอื่นๆ ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟินอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS พบว่าผลิตภัณฑ์ตัวอย่างที่มีคุณสมบัติโดยรวมดีที่สุดคือผงสารสกัดเสม็ดขาวที่ละลายในตัวทำละลายผสมเอทานอลกับน้ำในอัตราส่วน 8:2 จึงเลือกสภาวะดังกล่าวในการนำมาเตรียมสารสกัดเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดใบเสม็ดขาวในการเลี้ยงกุ้งขาว

3.3 การใช้สารสกัดเสม็ดขาวเพื่อเสริมสุขภาพกุ้งขาว

- **การตรวจติดตามคุณภาพน้ำและสุขภาพของกุ้งขาว**

ทำการเลี้ยงกุ้งขนาด PL12 เป็นเวลา 90 วัน และตรวจติดตามคุณภาพน้ำในระบบเลี้ยงทั้ง 2 ชุดการทดลองทุกสัปดาห์ตลอดการทดลอง ให้ผลการตรวจติดตามคุณภาพน้ำดังแสดงในตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 การตรวจติดตามคุณภาพน้ำตลอดระยะการทดลอง

พารามิเตอร์	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ค่าที่เหมาะสม
Salinity (ppt)	25.0 ± 1.7	24.0 ± 1.6	10 – 30*
pH	8.2 ± 0.2	8.2 ± 0.3	7.8 – 8.2*
Alkalinity (ppm)	88.6 ± 15.2	89.9 ± 15.2	80 – 160*
Nitrite (ppm)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	$\leq$ 0.2*
Ammonium (NH_4^+) (ppm)	0.4 ± 1.4	0.1 ± 0.3	$\leq$ 0.4*
Hardness (ppm)	4,124.0 ± 734.6	4,298.2 ± 713.4	$\geq$ 300*
Calcium (ppm)	300.0 ± 102.5	304.1 ± 93.4	NA
Magnesium (ppm)	812.0 ± 139.8	850.1 ± 148.6	NA
DOC (ppm)	11.6 ± 6.3	10.8 ± 5.7	NA
เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. (cfu/ml)			
- กลุ่มโคโลนีสีเขียว ($x10^2$)	1.52 ± 0.82	4.02 ± 0.17	ไม่เกิน 10^3**
- กลุ่มโคโลนีสีเหลือง ($x10^2$)	1.62 ± 0.14	9.83 ± 0.25	ไม่เกิน 10^3**

* ที่มา : สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2558

** ที่มา : สำนักส่งเสริมการใช้ประโยชน์ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน. 2556

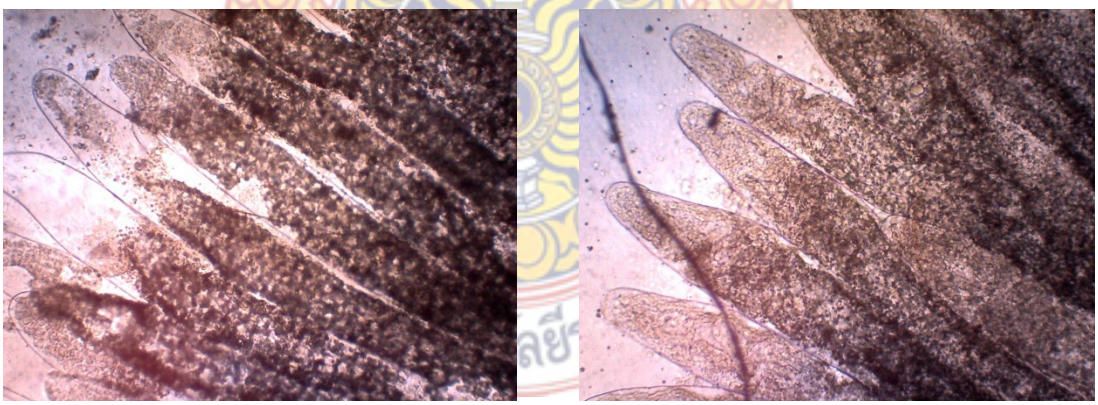
คุณภาพน้ำทางเคมีในระบบเลี้ยงทั้ง 2 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน ปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่พบในน้ำทั้ง 2 ชุดการทดลอง พบว่าน้ำในระบบเลี้ยงชุดควบคุมพบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. กลุ่มโคโลนีสีเขียว และกลุ่มโคโลนีสีเหลือง เท่ากับ 1.52 ± 0.82 และ 1.62 ± 0.14 ($x10^2$ CFU/ml ส่วนน้ำในระบบเลี้ยงชุดทดลองพบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. กลุ่มโคโลนีสีเขียว และกลุ่มโคโลนีสีเหลือง เท่ากับ 4.02 ± 0.17 และ 9.83 ± 0.25 ($x10^2$ CFU/ml คุณภาพน้ำในระบบเลี้ยงตลอดการทดลองอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดตามแนวการปฏิบัติในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสำหรับฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล และสำนักส่งเสริมการใช้ประโยชน์ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน

- **การตรวจติดตามสุขภาพของกุ้งขาว**

จากการเก็บตัวอย่างตับกุ้งจากทั้ง 2 ชุดการทดลองมาตรวจสอบความสมบูรณ์ของตับโดนพิจารณาจากเม็ดไขมันในตับเมื่อกุ้งอายุ 30, 60 และ 90 วัน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง พบว่าเมื่อกุ้งอายุ 30 วัน ตับกุ้งชุดควบคุมและชุดทดลองมีความสมบูรณ์ สีเข้ม มีเม็ดไขมันในตับกระจายอย่างหนาแน่น เม็ดไขมันสมบูรณ์ 100% เมื่อกุ้งอายุ 60 และ 90 วัน ตับกุ้งชุดควบคุมและชุดทดลองมีความสมบูรณ์ สีเข้ม มีเม็ดไขมันในตับกระจายอย่างหนาแน่น เม็ดไขมันสมบูรณ์ 100% แต่ตับกุ้งชุดควบคุมมีพูตับผนังหนา 2 ชั้น คิดเป็น 80% มีโอกาสเกิดโรคได้

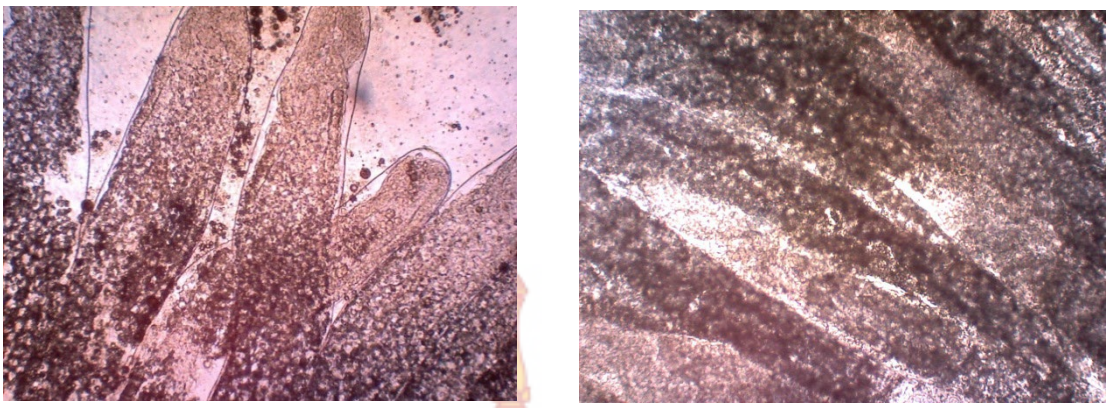
(a) (b)

ภาพที่ 3.4 ความสมบูรณ์ของเม็ดไขมันในตับเมื่อกุ้งอายุ 30 วัน (a) ชุดควบคุม (b) ชุดทดลอง



(a) (b)

ภาพที่ 3.5 ความสมบูรณ์ของเม็ดไขมันในตับเมื่อกุ้งอายุ 60 วัน (a) ชุดควบคุม (b) ชุดทดลอง



(a) (b)

ภาพที่ 3.6 ความสมบูรณ์ของเม็ดไขมันในตับเมื่อกุ้งอายุ 90 วัน (a) ชุดควบคุม (b) ชุดทดลอง

จากการเพาะเชื้อตัวอย่างตับโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS) เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในตับกุ้ง พบว่าชุดควบคุมพบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. กลุ่มโคโลนีสีเขียว และกลุ่มโคโลนีสีเหลือง เท่ากับ 8.28 ± 1.03 และ 95.3 ± 1.37 ($x10^2$ CFU/g ตามลำดับ ส่วนชุดทดลองพบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. กลุ่มโคโลนีสีเขียว และกลุ่มโคโลนีสีเหลือง เท่ากับ 5.68 ± 1.14 และ 1.38 ± 1.14 ($x10^2$ CFU/g ตามลำดับ ผลการศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในตับกุ้งและพบว่ากุ้งขาวชุดทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดเสม็ดขาวมีปริมาณแบคทีเรียต่ำกว่ากุ้งขาวชุดควบคุมมีความสอดคล้องกับคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเสม็ดขาว ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ที่พบในตับกุ้งชุดควบคุมมากกว่าชุดทดลอง ในขณะที่ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ที่พบในน้ำของระบบเลี้ยงในชุดทดลองมากกว่าชุดควบคุม แสดงว่ากุ้งชุดทดลองมีความต้านทานการติดเชื้อ *Vibrio* spp. ได้ เนื่องจากน้ำในระบบเลี้ยงพบปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. มากกว่าแต่มีโอกาสพบเชื้อในตับกุ้งน้อยกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และปริมาณเชื้อที่พบมีค่าไม่เกิน 10^3 CFU/g กล่าวได้ว่ากุ้งชุดทดลองเป็นกุ้งที่มีคุณภาพของตับสมบูรณ์และมีโอกาสเกิดโรคจากการติดเชื้อ *Vibrio* spp. น้อยกว่าชุดควบคุม (มลฤดี, 2558) ซึ่งอาจมีกลไกการต้านแบคทีเรียแบบการต้านการสร้างไบโอฟิล์มเนื่องจากในสภาวะที่มีเชื้อแบคทีเรียในน้ำ กุ้งชุดทดลองที่ได้รับสารสกัดพบเชื้อที่ตับน้อยกว่ากุ้งชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดและกุ้งมีอัตราการรอดสูงกว่า แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเสม็ดขาวที่สกัดด้วยทำละลายเอทานอลสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Vibrio* spp. โดยป้องกันการเกาะและสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย (กนกพรรณ, 2562

- **การตรวจนับเม็ดเลือดรวม**

จากการเจาะเลือดและตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดรวมของกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลองเมื่อกุ้งอายุ 90 วัน พบว่ากุ้งชุดควบคุมและชุดทดลองมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเท่ากับ 2.23 ± 0.74 และ 5.05 ± 1.03 ($x10^6$ cell/ml ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ากุ้งชุดทดลองมีสุขภาพดีกว่ากุ้งชุดควบคุม เนื่องจากปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocyte count) สามารถใช้เป็นดรรชนีในการบ่งบอกสุขภาพของกุ้งได้ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของปริมาณเม็ดเลือดหมายถึงการเพิ่มประสิทธิภาพของภูมิคุ้มกัน มีรายงานว่ามากกว่า 90% ของเอนไซม์ phenoloxidase จะพบในเม็ดเลือดกุ้ง เมื่อกุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดลดลงจะส่งผลให้ความว่องไวหรือปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ลดลงด้วย เช่นเดียวกับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเม็ดเลือดรวมเพื่อบ่งบอกสภาวะความเครียดของปูน้ำจืดสายพันธุ์ *Paratelphusa spinigrea* ตามงานวิจัยของ Narain and Srivastava, 1979 และพบว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณเม็ดเลือดรวมเป็นไปตามการเพิ่มประสิทธิภาพของภูมิคุ้มกันในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งนำไปสู่ความสามารถในการต่อต้านสิ่งแปลกปลอม (วรรณา, 2547 ในสภาวะที่สัตว์น้ำมีการติดเชื้อจะทำให้จำนวนเม็ดเลือดแดงลดลง (กฤษณา และคณะ, 2559

- **การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส**

ระบบ phenoloxidase activating เป็นระบบที่สำคัญในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เป็นการทำลายเชื้อโรคและควบคุมการกระจายตัวของเชื้อโรคภายในตัวกุ้งซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญโดยมีเอนไซม์ phenoloxidase การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ในกุ้งขาวส่วนใหญ่พบเอนไซม์ phenoloxidase ในไซโทพลาซึมของเซลล์เม็ดเลือดชนิด granular cell โดยพบว่าความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase ที่พบในเซลล์เม็ดเลือดมีค่าสูงกว่าในน้ำเลือดกุ้ง ซึ่งจากวิเคราะห์ค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดสจากเลือดกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลอง พบว่าเลือดกุ้งจากชุดควบคุมและชุดทดลองมีค่า phenoloxidase activity เท่ากับ 207.36 ± 18.75 และ 564.84 ± 39.95 unit/min/mg protein ให้ผลการวิเคราะห์ดีกว่ากุ้งกุลาดำอายุ 4 เดือน ซึ่งมีค่า phenoloxidase activity อยู่ในช่วง 14.22 – 36.44 unit/min/mg protein (ทวีศักดิ์, 2547 และกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์ที่ระดับความเข้มข้น 5% ซึ่งมีค่า phenoloxidase activity เท่ากับ 368.39 ± 8.56 unit/min/mg protein (อริสา, 2555

ตารางที่ 3.8 จำนวนเม็ดเลือดรวมและค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส

ตัวอย่าง	Total Haemocyte Count ($x10^6$ cell/ml)	Phenoloxidase Activity unit/min/mg protein
ชุดควบคุม	2.23 ± 0.74^b	207.36 ± 18.75^b
ชุดทดลอง	5.05 ± 1.03^a	564.84 ± 39.95^a

หมายเหตุ : ตัวเลขที่มีอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการผสมสารกัดเสม็ดขาวในอาหารกุ้งขาวให้ผลดีต่อการตอบสนองภูมิคุ้มกันเบื้องต้น อาจมีกลไกกระบวนการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเบื้องต้นโดยมีการกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดก่อน จากนั้นเม็ดเลือดชนิดแกรนูลาจะมีการสร้างเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ทำให้ผลปริมาณเม็ดเลือดรวมเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับผลการทำงาน สอดคล้องกับงานวิจัยของ วีรภาพ และคณะ (2553 ซึ่งกล่าวว่าโดยปกติในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เซลล์เม็ดเลือดและเอนไซม์ฟีนอลออกซิเ ดสจะทำงานร่วมกันอย่างสัมพันธ์ในการจัดการสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ตัวกุ้ง เช่นเดียวกับผลการศึกษาการผสมไฮโดรไลเสทสาหร่ายผมนางในอาหารกุ้งขาวก็ให้ผลดีต่อการตอบสนองภูมิคุ้มกันเบื้องต้นเช่นกัน โดยชุดทดลองที่ให้ค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงสุดสอดคล้องกับผลความว่องไวของไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ให้ค่าสูงสุดและให้ค่ามากกว่าชุดควบคุม

- **การศึกษาการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย อัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ**

ตลอดระยะเวลาการทดลองได้มีการสุ่มตัวอย่างกุ้งมาชั่งน้ำหนักทุกๆ 10 – 20 วัน ตลอดการเลี้ยง 90 วัน พบว่ากุ้งชุดควบคุมและกุ้งชุดทดลองกินอาหารตลอดการเลี้ยงบ่อละ 118 กิโลกรัม มีขนาดโดยเฉลี่ย 72 และ 70 ตัวต่อกิโลกรัม ตามลำดับ น้ำหนักรวม 70.00 และ 72.93 กิโลกรัม ตามลำดับ อัตราการแลกเนื้อ (FCR) เท่ากับ 1.69 และ 1.62 ตามลำดับ อัตรารอดร้อยละ 84.00 และ 85.08 ตามลำดับ และอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG) เท่ากัน มีค่าเท่ากับ 0.07 ซึ่งกุ้งที่เลี้ยงในระบบทั้ง 2 ชุดการทดลองมีการเจริญเติบโตไม่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 3.9 การเจริญเติบโตของกุ้งที่เลี้ยงตลอดระยะการทดลอง

พารามิเตอร์	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
ระยะเวลา (วัน	90	90
ขนาด (ตัว/กิโลกรัม	72	70
น้ำหนักรวม (กิโลกรัม	70.00	72.93
ปริมาณอาหารทั้งหมด (กิโลกรัม	118	118
อัตราการแลกเนื้อ (FCR)	1.69	1.62
อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG)	0.07	0.07
อัตรารอด (ร้อยละ)	84.00	85.08

ด้วยเหตุที่พืชสมุนไพรสามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ได้ตามพฤกษเคมีที่มีเป็นองค์ประกอบ สารพฤกษเคมีกลุ่มฟีนอลิกเป็นหนึ่งในสารทุติยภูมิที่สำคัญและโครงสร้างทั่วไปหลักประกอบด้วยกลุ่มไฮดรอกซิลที่ยึดติดกับกลุ่มไฮโดรคาร์บอนอะโรมาติกโดยตรง เป็นที่ทราบกันดีว่ามีคุณสมบัติออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ฟลาโวนอยด์ก็เป็นสารกลุ่มหนึ่งที่จัดรวมอยู่ในคลาสของโพลีฟีนอลที่มีหน่วยฟีนอลมากกว่าหนึ่งหน่วยและมีการกระจายอย่างแพร่หลายในพืชทุกชนิด ซึ่งมีข้อมูลทางเภสัชวิทยารายงานว่าฟลาโวนอยด์ได้รับการศึกษาเป็นจำนวนมากและมีการประเมินกิจกรรมการดูดซึมยาต้านจุลชีพ ต้านการอักเสบเอสโตรเจน และการดูดซึมรังสียูวี (Capodaglio, 2015) ซึ่งมีผลในการ

ป้องกันโรคตับผ่านคุณสมบัติในการต้านการอักเสบ ลดการเกิด oxidation ของกรดไขมัน และการต้านอนุมูลอิสระ (Ukit, 2019) นอกจากสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์แล้ว ยังมีสารทุติยภูมิกลุ่มเทอร์พีนอยด์ที่พบในใบเสม็ดขาวซึ่งเป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่ได้จากพืช มีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อรา และแมลง สามารถใช้เป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียเพิ่มการซึมผ่านต้านการอักเสบสารต้านอนุมูลอิสระ และทำให้สารสกัดจากใบเสม็ดขาวสามารถฆ่าแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบได้ ประกอบกับมีรายงานว่าสารกลุ่มแทนนิน แอลคาลอยด์ ซาโปนิน และสเตียรอยด์ที่มีคุณสมบัติต่อต้านความเครียดและถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Ngo, *et al*. 2020) เช่นเดียวกับโกฐก้านพร้าว (*Picrorhiza kurroa*) ตั้วอิ๊ง (*Rheum officinale*) ที่มีฤทธิ์ในการลดความเครียดในกุ้งก้ามกราม สามารถนำสารสกัดมาใช้เลี้ยงสัตว์น้ำโดยการผสมอาหารซึ่งสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะของสัตว์น้ำ มีสรรพคุณควบคุมเชื้อโรคที่กว้างขวาง ช่วยลดความเครียดของสัตว์น้ำจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (ชนกันต์, 2555 จากการศึกษานี้การที่ใบเสม็ดขาวแสดงผลในการต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งได้นั้นเนื่องมาจากองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดใบเสม็ดขาวที่สกัดด้วยเอทานอลที่พบสารสำคัญกลุ่มดังกล่าว (สุนันทา, 2565 ที่ส่งผลต่อการออกฤทธิ์เช่นเดียวกับสารเสริมอาหารชนิดอื่นที่ส่งผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวที่แสดงด้วยค่า phenoloxidase activity ที่สูงขึ้น เช่น ใบมะม่วงเขียวเสวย (ชลิดา และคณะ, 2542, สาหร่ายสไปรูไลน่า *Spirulina platensis* (Vanichkul, *et al*.,2010), ว่านมหากาฬ *Gynura bicolor* (Wu, *et al*., 2015) และหญ้าใต้ใบ *Phyllanthus urinaria* (อุทร และคณะ, 2564 เป็นต้น

บทที่ 4
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การเตรียมสารสกัดเพื่อเป็นสารเสริมอาหารในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเตรียมได้ด้วยการสกัดในตัวทำละลายเอทานอลแล้วนำไประเหยตัวทำละลายและทำแห้งด้วยเทคนิค freeze dry เพื่อสะดวกต่อการใช้งานและง่ายต่อการเก็บรักษา เมื่อนำมาใช้สามารถเตรียมเป็นสารละลายให้มีความเข้มข้น 300 ppm ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 8:2 จะได้ผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ที่เป็นสารละลายเนื้อเดียวสามารถออกฤทธิ์ทางเคมีและทางชีวภาพได้ดีที่สุด

การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยการเสริมสารสกัดเสม็ดขาวในอาหารไม่มีผลต่อการอัตราการเจริญเติบโตและคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้ง แต่ส่งผลดีต่อการสร้างภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยกุ้งชุดทดลองที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของสารสกัดเสม็ดขาวมีความสมบูรณ์ของตับและเม็ดไขมันในตับสูงกว่า มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. กลุ่มโคโลนีสีเขียว และกลุ่มโคโลนีสีเหลืองน้อยกว่า มีปริมาณเม็ดเลือดรวม และค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดสสูงกว่ากุ้งชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด ดังนั้นการเสริมสารสกัดเสม็ดขาวในอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งสามารถลดโอกาสการติดเชื้อวิบริโอ และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกุ้งได้ และเนื่องจากคุณภาพลูกกุ้งเป็นปัจจัยที่สำคัญหนึ่งในการเลี้ยงกุ้ง ดังนั้นถ้าการอนุบาลไม่เหมาะสมอาจมีปรสิตตามตัวในปริมาณมาก ลูกกุ้งจะไม่แข็งแรง อ่อนแอ มีอัตราการรอดตายต่ำ การให้อาหารเสริมสารสกัดเสม็ดขาวตั้งแต่เริ่มเลี้ยงในกุ้งขนาด PL12 – PL15 จึงเป็นแนวทางหนึ่งการสร้างภูมิคุ้มกันให้กุ้งได้เติบโตแข็งแรงและต้านทานต่อโรคได้ ทั้งนี้จำเป็นต้องศึกษาความคงตัวของสารสกัดในอาหารเพื่อตรวจสอบสารสำคัญคงเหลือในอาหารหลังจากอาหารแช่ในน้ำ เพื่อพัฒนาสูตรอาหารที่ได้เก็บสารสำคัญไว้ในตัวอาหารโดยไม่มีการสูญเสียสารสำคัญจากอาหารไปในน้ำแสดงถึงศักยภาพของสารสกัดเสม็ดขาวในการนำมาพัฒนาเป็นทางเลือกสำหรับใช้เป็นสารต้านจุลชีพสำหรับผสมในอาหารกุ้งเพื่อป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อวิบริโอในกุ้งทะเล

บรรณานุกรม

กนกพรรณ วงศ์ประเสริฐ. 2562. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งและในคนของสารสกัดเอทานอลจากสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*): กลไกการต้านแบคทีเรียและบ่งชี้สารออกฤทธิ์

กรมประมง. 2550. สถิติการประมง 2550. [ออนไลน์]. สืบค้นได้จาก : http://www.fisheries.go.th/it-stst/data_2550/menu_2550.htm. เข้าค้นเมื่อ 2 สิงหาคม 2553.

กรมประมง. 2556. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2556. เอกสารฉบับที่ 9 / 2556. ศูนย์สารสนเทศ, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 91 น.

กรมประมง. 2563. สถิติผลผลิตการเลี้ยงกุ้งทะเลประจำปี 2561. เอกสารฉบับที่ 2/2563. กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

กฤษดา นูตา, ศิริลักษณ์ วงส์พิเชษฐ และสุทธิชัย ฤทธิธรรม. 2557. ผลของการเสริมสมุนไพรในอาหารเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม. การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 4. 1 – 10.

กลุ่มสารสนเทศการเกษตร สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดพังงา. 2561. ข้อมูลเพื่อการวางแผนพัฒนากุ้งขาวแวนนาไม จังหวัดพังงา. เอกสารเลขที่ 1/2561. 69 หน้า.

กิตติมา วานิชกูล, นนทวิทย์ อารีย์ชน และงามผ่อง คงคาทิพย์. 2550. การใช้สารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon Fabricius*). เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45: สาขาประมง. กรุงเทพฯ. หน้า 212 – 220.

งานประมง ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ. 2556. การเลี้ยงกุ้งทะเลในระบบปิด. 53 หน้า.

จิราพร โรจน์ทินกร และวิวัฒน์ หวังเจริญ. 2559. รายงานวิจัย การพัฒนาผลิตภัณฑ์ผงของสารสกัดสมุนไพรที่เหมาะสมสำหรับสัตว์น้ำ. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 63 หน้า.

จีรรัตน์ แก้วประจุ, สิริวรรณ หนูเซ่ง, อาภรณ์ เทพพานิช, กมลรัตน์ ยงเจริญ และสรายุทธ อ่อนสนิท 2563. ผลการใช้ไฮโดรไลเสตจากสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria* sp.) เป็นส่วนผสมในอาหารต่อการเจริญเติบโต และการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันเบื้องต้นในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) รายงานการประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2563. หน้า 236 – 249.

ชนกันต์ จิตมนัส. 2555. ผลของผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรต่อภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ. **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น**. 18(2): 257 – 269.

ชนกันต์ จิตมนัส. 2556. โรคปลานิล. **วารสารเชียงใหม่สัตวแพทยสาร**. 11(1): 75 – 86.

ชลิดา ชมานนท์, สมภพ รุ่งสุภา, มณฑิรา ถาวรยุติการต์ และวีณา เคยพุดซา. 2542. การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37. 233 – 239.

ณัฏฐิกา ศิลาลาย. 2549. ฟลาโวนอยด์ในใบชา : หน้าที่ การใช้ประโยชน์ และการวิเคราะห์. สารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม. 2(1. 1 – 10.

ณัฏสรัณย์ วีรพลพัฒน์กุล. 2550. การยับยั้งเชื้อ Vibrio harveyi โดยใช้สารสกัดจากเปลือกส้มโอ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา.

เต็มดวง สมศิริ. 2540. การศึกษาฤทธิ์ของฟาทะลายโจรต่อเชื้อวิบริโอ. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง.

ทวีศักดิ์ ศรีชนะ. 2547. องค์ประกอบบางประการของระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon Fabricius*) ที่ระยะต่างๆ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธิดาพร ฉวีภักดิ์, สุรชาต ฉวีภักดิ์, กุลวรา แสงรุ่งเรือง และ บุญยี่ หมื่นไธสง. 2564. ผลของสารสกัดผักกระสังต่อระบบภูมิคุ้มกันและต้านทานโรคในกุ้งขาวแวนาไม (*Penaeus vannamei*). **วารสารวิชาการ กองวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์**. 7(2564): 1 – 12.

นรสิงห์ เพ็ญประไพ, เพ็ญศรี เพ็ญประไพ, อัมพร รัตนมูสิก และมาโนช ขำเจริญ. 2562. รายงานการวิจัย ประสิทธิภาพของอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำมันมะพร้าวที่มีสารสกัดจากขมิ้นอ้อยต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย. 87 หน้า.

นันทนัช เจริญศักดิ์ และภาพิมน ทรัพย์ประเสริฐ. 2557. จุลนิพนธ์ ผลของสารสกัดจากใบชาเขียวต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*). คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร. 41 หน้า.

นันทวัน บุณยะประภัศร และประพิณศรา สอนเล็ก. 2550. รายงานฉบับสมบูรณ์ การเตรียมสารสกัดน้ำจากกากชาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสัตว์. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว. 74 หน้า.

ประจวบ หลาอุบล. 2527. กุ้ง Natantia. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 306 หน้า.

ประภัสสร แสนธิ, จีรวรรณ มณีโรจน์ และเปรมวดี เทพวงศ์. 2560. **วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร : วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** 24(2. 207 – 217.

พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และปาริชาติ พุ่มขจร. 2553. การใช้สมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรคในปลา. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**. 12(4: 63 – 71.

พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์ และเจนนุช ว่องธวัชชัย. 2553. รายงานวิจัย การพัฒนาอาหารกุ้งที่มีส่วนผสมของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์เพื่อระงับการเจริญของเชื้อวิบริโอก่อโรคในกุ้ง. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มลฤดี สนธิ. 2558. รายงานวิจัย รูปแบบการจัดการฟาร์มและการควบคุมอินทรีย์สารในบ่อกุ้งของเกษตรกรเพื่อป้องกันโรคตายด่วนในกุ้งทะเล. คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพาวิทยาเขตจันทบุรี. 52 หน้า.

มลฤดี สนธิ. 2559. การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งทะเล. **วารสารแก่นเกษตร**. 44(2): 373 – 382.

มัลลิกา วรรณประภา และอนิวรรตน์ สมชีวิตา. 2564. การใช้สมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรคในลูกปลาดุก. สำนักงานประมงจังหวัดนครนายก กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 9 หน้า.

วรรณา ศิริมานะพงษ์. 2547. ผลของบัวบก (*Centella asiatica*) ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*). วิทยานิพนธ์ หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 100 หน้า.

วารินทร์ ธนาสมหวัง และคณะ. 2558. การศึกษาระบาดวิทยา ปัจจัย สาเหตุ และแนวทางการแก้ปัญหาโรคตายด่วนในกุ้งทะเลในประเทศไทย. สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร.

วัฒนา วัฒนกุล, อุไรวรรณ วัฒนกุล และ วรรณิณี จันทร์แก้ว. 2563. รายงานการวิจัย การประยุกต์ใช้สารสกัดจากสาหร่ายสีแดงน้ำจืดเพื่อการปรับปรุงคุณภาพสีของกุ้งขาวแวนนาไม. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย. 41 น.

วีรเทพ ศรีปราชญ์, วิโรจน์ กิติคุณ, ภัคพงศ์ ปวงสุข และธวัชชัย ศุภดิษฐ์. 2553. การใช้สาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) เป็นวัตถุดิบในอาหารกุ้งกุลาดำ. รายงานสืบเนื่อง*ใน*การประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษาระดับชาติ “บูรณาการศาสตร์เพื่อการพัฒนาในยุคการเปลี่ยนแปลง” มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี. 124 – 133.

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี. 2555. สารสกัดข่า สมุนไพรทางเลือกในการป้องกันรักษาโรคในกุ้งทะเล. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง.

สถาพร ดิเรกบุษราคม, สมพร รุงกำเนิดวงศ, อังคณา หิรัญสาลี และลิลา เรืองแป้น. 2539. ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยบางชนิดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ. *ใน* เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 7. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรุงเทพฯ.

สมาคมแช่เยือกแข็งไทย. 2557. สถานการณ์กุ้งปี 2556 และแนวโน้มปี 2557.

สายชล เพลินจิตต์, ศิริลักษณ์ วงส์พิเชษฐ และธนิต ผิวนิ่ม. 2557. ผลการเสริมน้ำพืชสมุนไพรในอาหารต่อการรอดตายและเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม. การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 4. 1 – 10.

สุจิตรา สหัสนฤภัยพงษ. 2541. การศึกษาประสิทธิภาพของ Tea Polyphenol ในการป้องกันโรควิบริโอซิสในกุงกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุดา ตัณฑวณิช, เต็มดวง สมศิริ, พุทธรัตน์ เบ้าประเสริฐกุล และเบญจพร สัมฤทธิเวช. 2556 ยาและสารเคมีเพื่อการป้องกันและรักษาโรคสัตว์น้ำ. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง. 29 หน้า

สุนันทา ข้องสาย. 2560. องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเสม็ดขาวและเสม็ดแดง. รายงานผลการดำเนินงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ประจำปีงบประมาณ 2560. 43 หน้า.

สุนันทา ข้องสาย. 2562. รายงานวิจัย ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเสม็ดขาวและเสม็ดแดงที่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งและปลา. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย. 61 หน้า.

สุนันทา ข้องสาย, ปรีดา ภูมี และชาคริยา ฉลาด. 2565. รายงานวิจัย ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเสม็ดขาวในการควบคุมเชื้อก่อโรคในการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopeneaus vannamei*). มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย. 92 หน้า.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2561. รายงานการวิจัย การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยเพื่อควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งแบบเทคโนโลยีดั้งเดิมและแบบกล่องโฟม. มหาวิทยาลัยบูรพา. 77 น.

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2559. ความท้าทายของอุตสาหกรรมกุ้งไทยกับการเข้าสู่ประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน. 59 หน้า

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2558. การปฏิบัติทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ดีสำหรับฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล ใน แนวปฏิบัติในการใช้มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 7401(G) – 2558. 92 หน้า.

สำนักส่งเสริมการใช้ประโยชน์. 2556. ก้าวต่อไปของกุ้งไทยหลังวิกฤตโรคตายด่วน. สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน กรุงเทพฯ. 96 หน้า.

หนึ่งฤทัย นนพิภักด์, เต็มดวง สมศิริ, พุทธรัตน์ เบ้าประเสริฐกุล, และนิติ ชูเชิด. 2559.การศึกษาการเจริญเติบโต การรอดตาย และความทนทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคอีเอ็มเอสของกุ้งขาวแวนนาไม 3 สายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ. *ใน* การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 54. 773 – 780.

อริสา ศรีหมากสุก. 2555. การเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio Harvey* ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 124 หน้า.

อัครวิทย์ อิสสะโร. 2554. การพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจเชื้อก่อโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลาเศรษฐกิจของไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อุทร เจริญเดช, มาโนช ขำเจริญ และปรีดา ภูมี. 2559. ผลของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* Wall. Ex Nees) ต่อการเจริญเติบโตและความต้านทานโรคแบคทีเรียในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei* Boone). **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย**. 8(2): 190 – 202.

อุทร เจริญเดช, วรวุฒิ เกิดปราง และจำเริญศรี ถาวรสุวรรณ 2564. ผลของสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria*) ต่อสุขภาพตับและตับอ่อน การต้านอนุมูลอิสระ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคตับและตับอ่อนวายฉับพลันของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*). วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย. 13(3): 717 – 731.

อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์. 2544. การแยกชนิดเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำและการป้องกันตัว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 82 หน้า.

เอกพล รัตนพันธ์. 2562. ต้นทุนและผลตอบแทนการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในจังหวัดสุราษฎร์ธานีหลังผลกระทบจากโรค EMS. เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2562. สำนักงานประมงจังหวัดสุราษฎร์ธานี กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 67 หน้า.

Beata, M., Izabela, M., Bogusława, L., Grzegorz, S., Bogusława, G., Karolina, K., Jacek, L., Piotr, W., Edward, R., Radosław, W., Agnieszka, D., Henryk, G. and Katarzyna, C. 2018. Valuable natural products from marine and freshatuater macroalgae obtoined from supercrifical fluid extrats. **Journal of Applied Phycology**. 30. 591 - 603.

Burtin, P. 2003. Nutritional value of seaweeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2: 498 – 503.

Capodaglio, G. 2015. Chemical characterization of plant materials and development of analytical methodologies for metabolite determination. Scuola Dottorale di Ateneo Graduate School. 183 p.

Chang, Y. P., Liu, C. H., Wu, C. C., Chiang, C. M., Lian, J. L. and Hsieh, S.L. 2012. Dietary administration of zingerone to enhance growth, non-specific immune response, and resistance to *Vibrio alginolyticus* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles. **Fish and Shellfish Immunol**. 32: 284 – 290.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard-eighth edition. CLSI documents M07 – A8. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa.

Direkbusarakom, S., Herunsalee, A., Yoshimizu, M. and Ezura, Y. 1996. Protective efficacy of *Clinacanthus nutans* on yellow – head disease in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Fish Pathol**. 33: 404 - 410.

Drummond, A. J. and Waigh, R. D. 2000. The development of microbiological methods for phytochemical screening. **Recent Research Developments in Phytochemistry**. 4: 143 – 152.

FAO. 2015. Food and agriculture organization. World review of Fisheries and Aquaculture. 77 p.

Global, T. A. 2016. มูลค่าการนำเข้าผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งประเภทต่างๆ ของโลก. สืบค้นเมื่อวันที่ 5 พฤษภาคม 2559. จาก https://www.worldtradestatistics.com/gta/

Hai, V.N. 2015. The use of medicinal plants immunostimulants in aquaculture: A review. **Aquaculture**. 446: 88 – 96.

Immanuel, G., Vincybai, V. C., Sivaram, V., Palavesam, A. and Marlan, M. P. 2004. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp peneaus indicus juveniles. **Aquaculture**. 236(1 - 4): 53 – 65.

Immanuel, G., Sivagnanavelmurugan, M., Marudhupandi,T., Radhakrishnan, S., and Palavesam, A. 2012. The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). **Fish and Shellfish Immunol**. 32: 551 – 564.

Kitikiew, S., Chen J. C., Putra, D. F., Lin, Y. C., Yeh, S. T., and Liou, C. H. 2013. Fucoidan effectively provokes the innate immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against experimental *Vibrio alginolyticus* infection. **Fish and Shellfish Immunol**. 34: 280 – 290.

Laosirisathian N, Saenjum C, Sirithunyalug J, Eitssayeam S, Sirithunyalug B and Chaiyana W. The chemical composition, antioxidant and anti-tyrosinase activities, and irritation properties of Sripanya *Punica granatum* peel extract. **Cosmetics**. 2020; 7(7): 1 – 13.

Ling ALM, Yasir S, Matanjun P and Abu Bakar MF. 2015. Effect of different drying techniques on the phytochemical content and antioxidant activity of Kappaphycus alvarezii. **Journal of Applied Phycology**. 27: 1717 – 1723.

Messyasz B, Michalak IM, Łęska B, Schroeder G, Górka, Bogusława G, Korzeniowska K, Lipok J, Wieczorek P, Rój E, Wilk R, Dobrzyńska-Inger A, Górecki H and Chojnacka K. 2018. Valuable natural products from marine and freshwater macroalgae obtained from supercritical fluid extracts. **Journal of Applied Phycology**. 30: 591 – 603.

National Center for Biotechnology Information. 2022. **Isoliquiritigenin**. PubChem Compound Summary for CID 638278**.** Available Source: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isoliquiritigenin#section=Computed-Properties, August 28, 2022.

Ngo, H.V.T., Huang, H.T., Lee, P.T., Liao, Z.H., Chen. H.Y. and Nan, F.H. 2020. Effects of *Phyllanthus amarus* extract on nonspecific immune responses, growth, and resistance to *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**. 107. 1 – 8.

Niu, J., Lin, H. Z., Jiang, S. G., Chen, X., Wu, K. C., Liu, Y. J., Wang, S., and Tian, L. X. 2013. Comparison of effect of chitin, chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine on growth performance, antioxidant defenses and oxidative stress status of *Penaeus monodon*. **Aquaculture**. 372 – 375: 1 – 8.

Pholdaeng, K. and Pongsamart, S. 2010. Studies on the immunomodulatory effect of polysaccharide gel extracted from *Durio zibethinus* in *Penaeus monodon* shrimp against *Vibrio harveyi* and WSSV. **Fish and Shellfish Immunol**. 28: 555 – 561.

Sharif, Z.M., Kamal, A.F. and Jalil, N.J. 2019. Chemical composition of Melaleuca cajuputi Powell. **International Journal of Engineering and Advanced Technology**. 9(1): 3479 – 3483.

Srithaworn, M., Thuyhun, A., Chunhachart, O. and Preecharram, S. 2015. Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts from Ya - Keaw formula against shrimp pathogens. **SDU Research Journal Sciences and Technology**. 8(2): 117 – 132.

Supamattayaa, K., Kiriratnikoma, S., Boonyaratpalinb, M., and Borowitzka, L. 2005. Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition,

immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture**. 248: 207 – 216.

Tassanakajon, A., K. Somboonwiwat, P. Supungul, and S. Tang. 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. **Fish and Shellfish Immunol**. 34: 954 – 967.

Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohney, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K. and Lightner, D. V. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organism**. 105: 45 – 55.

Ukit, U., Widiana, A. Rahmawati, E. and Hasby, R.M. 2022. Antibacterial activities test of Cajuput Leaf Waste extract (*Melaleuca cajuputi* Powell) on Pathogenic Bacteria. Journal of Physics: Conference Series *In* 4th Annual Applied Science and Engineering Conference. May29 – June2, 2022. 1 – 7.

Vanichkul, K., Areechon, N., Kongkathip, N., Srisapoome, P. and Chuchird, N. 2010. Immunological and bactericidal effects of turmeric (*Curcuma longa* Linn.) extract in Pacific white shrimps (*Litopenaeus vannamei* Boone). **Kasetsart Journal (Natural Science)** 44(5): 850 – 858.

Vargas-Albores, F., Guzmán, M.A. and , Ochoa, J.L. 1993. A lipopolysaccharide – binding agglutinin isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis Holmes*) haemolymph. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**. 104(2); 407 – 413.

Wang, X. W., and Wang, J. X. 2013. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. **Fish and Shellfish Immunol**. 34: 981 – 989.

Wongprasert, K., Rudtanatip, T., and Praiboon, J. 2014. Immunostimulatory activity of sulfated galactans isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* and development of resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp**. Fish and Shellfish Immunol**. 36: 52 – 60.

Wu, C. C., Chang, Y. P., Wang, J. J., Liu, C. H., Wong, S. L., Jiang, C. M. and Hsieh, S. L. 2015. Dietary administration of *Gynura bicolor* (Roxb. Willd.) DC water extract enhance immune response and survival rate against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in white *shrimp Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunol**. 42. 25 – 33.

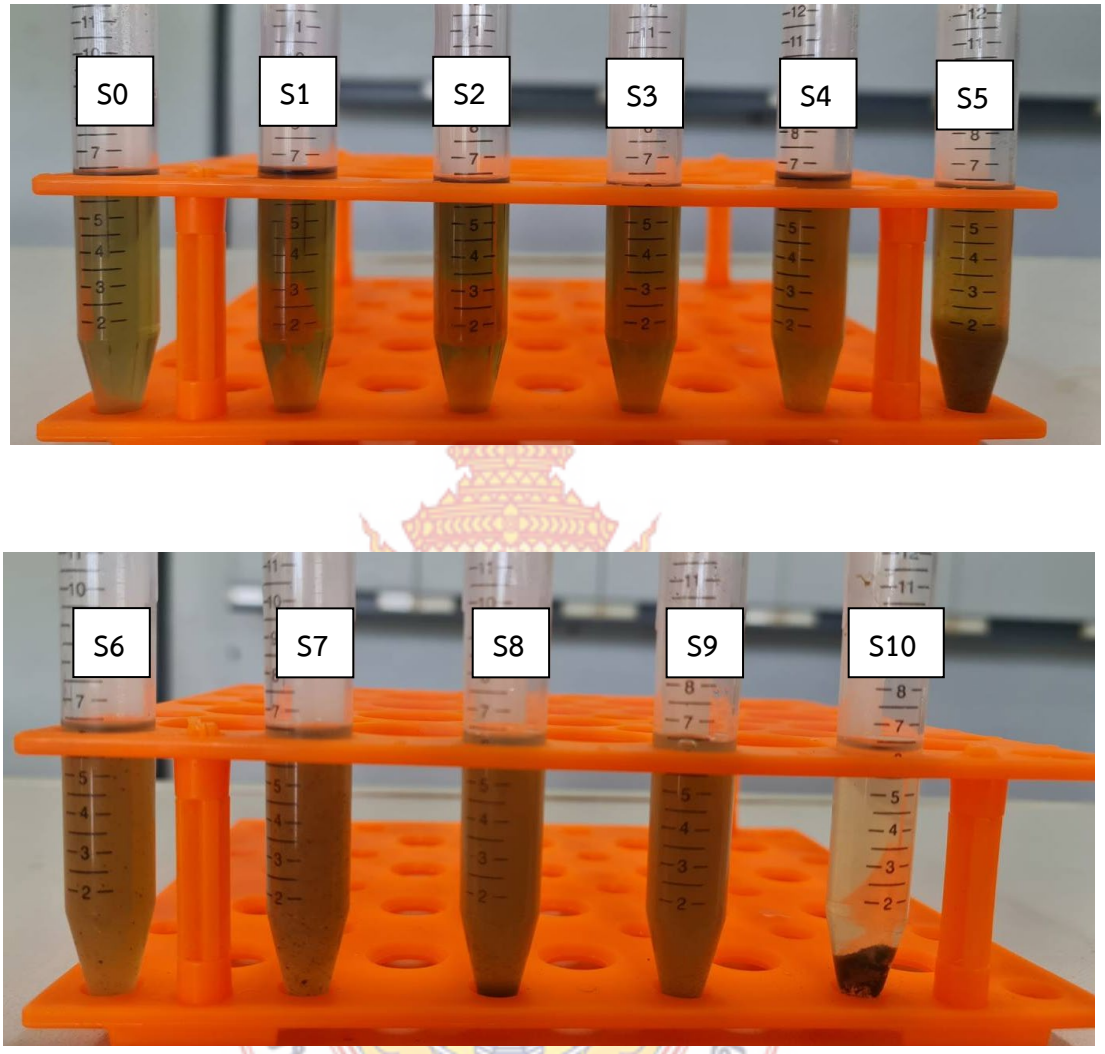
Yang, Q. H., Tan, B. P., Dong, X. H., Chi, S. Y. and Liu, G. Y. 2015. Effect of different levels of *Yucca schidigera* extract on the growth and nonspecific immunity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and on culture water quality. **Aquaculture**. 439: 39 – 44.

ภาคผนวก ก
การเตรียมตัวอย่างสารสกัด

ภาพผนวกที่ ก1 การเตรียมสารสกัดเอทานอล

ภาพผนวกที่ ก2 การเตรียมผงสารสกัดใบเสม็ดขาว

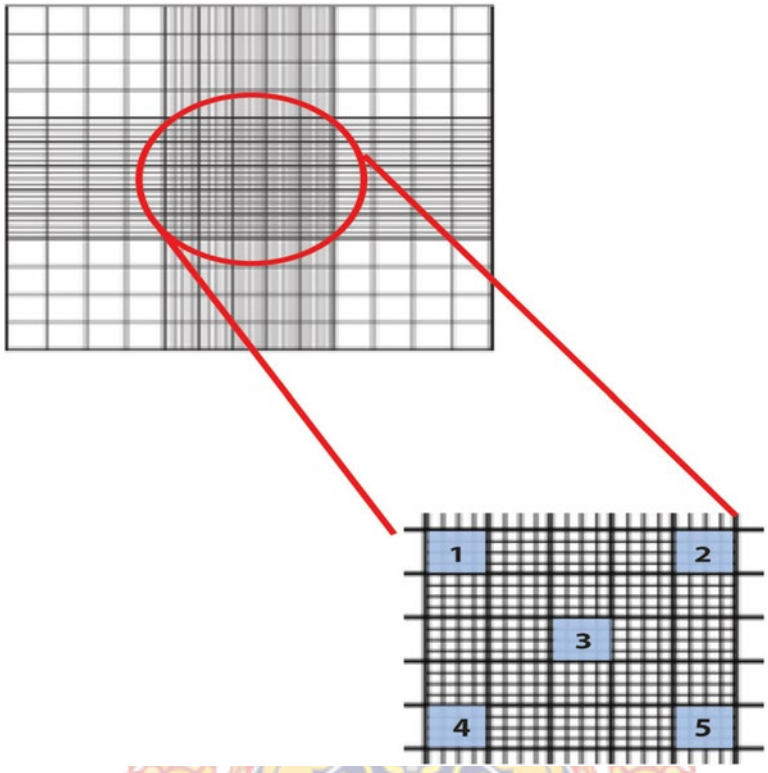
ภาคผนวก ข
การเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์



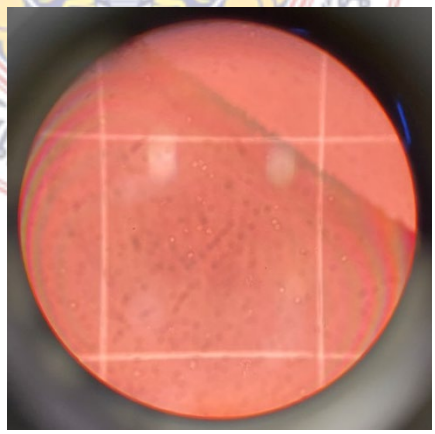
ภาพผนวกที่ ข1 การทดสอบการละลายของสารสกัด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล

ภาคผนวก ค
การนับจำนวนเม็ดเลือดรวม



$$\text{Density} = \frac{\text{n Colony} \times \frac{1}{4} \times 10^{6}}{\text{n Grid}}$$

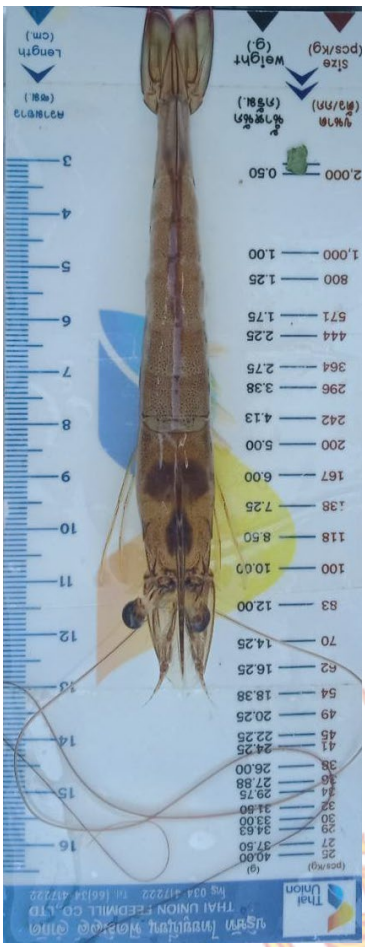


ภาพผนวกที่ ค1 การนับจำนวนเม็ดเลือด

ภาคผนวก ง
การเตรียมอาหารและการเลี้ยงกุ้งขาว

ภาพผนวกที่ ง1 การเตรียมอาหาร

ภาพผนวกที่ ง2 การเตรียมระบบ และการเลี้ยงกุ้ง



ภาพผนวกที่ ง3 การติดตามการเลี้ยงและการเก็บเกี่ยวผลผลิต