



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาเบื้องต้นเพื่อใช้สมุนไพรในการเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคในปลาอุกผสม

**Preliminary Studies on Using Traditionally Medical Plants to Enhance Immunity
in Hybrid Catfish (*Clarias macrocephalus* X *Clarias gariepinus*)**

โดย นายชนกันต์ จิตมหัส และคณะ

ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

กุมภาพันธ์ 2547



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาเบื้องต้นเพื่อใช้สมุนไพรในการเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคในปลาดุกลูกผสม

**Preliminary Studies on Using Traditionally Medical Plants to Enhance Immunity
in Hybrid Catfish (*Clarias macrocephalus* X *Clarias gariepinus*)**

โดย นายชนกันต์ จิตมณีส และคณะ

ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

กุมภาพันธ์ 2547

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาเบื้องต้นเพื่อใช้สมุนไพรในการเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคในปลาดุกลูกผสม

Preliminary Studies on Using Traditionally Medical Plants to Enhance Immunity
in Hybrid Catfish (*Clarias macrocephalus* X *Clarias gariepinus*)

คณะผู้วิจัย

ชนกันต์ จิตมณัส

สุภัทรา โพธิ์สิงห์

วิชุดา ณ ปัญญา

ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
ชุดโครงการวิจัยการใช้ประโยชน์สมุนไพรเพื่อการผลิตสัตว์

การศึกษาเบื้องต้นเพื่อใช้สมุนไพรในการเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคในปลาดุกลูกผสม

Preliminary Studies on Using Traditionally Medical Plants to Enhance Immunity
in Hybrid Catfish (*Clarias macrocephalus* X *Clarias gariepinus*)

บทคัดย่อ

ปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* X *Clarias gariepinus*) เป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและนิยมกันอย่างแพร่หลาย เกษตรกรส่วนใหญ่มักเลี้ยงปลาดุกในอัตราที่หนาแน่นมาก ทำให้มีโอกาสที่เกิดโรคระบาดจากแบคทีเรียได้ง่าย ในขณะที่การรักษาโรคทำได้ยาก เนื่องจากยาปฏิชีวนะและสารเคมีซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์นำเข้าและมีราคาแพง รวมทั้งอาจมีสารตกค้างในเนื้อปลาและสิ่งแวดล้อม จุดประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้สมุนไพรเพื่อป้องกันการติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* จากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่า กระเจี๊ยบสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าวได้ดีที่สุด (ค่า MIC = 39.06 มก./มล.) การทดลองส่วนที่สองเป็นการใช้กระเจี๊ยบผสมอาหารปลาดุกลูกผสมเพื่อทดสอบความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยปลาจะได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของกระเจี๊ยบแตกต่างกันเป็นเวลา 60 วัน จากนั้นจึงให้ปลาได้รับเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่มีความรุนแรง พบว่า อัตราการรอด คือ 35.00 ± 0.00 , 61.67 ± 2.89 , 65.00 ± 5.00 และ 80.00 ± 8.66 % ในปลาที่ได้รับอาหารผสมกระเจี๊ยบในอัตราส่วน 0, 2.5, 5.0, และ 7.5% ตามลำดับ การทดลองส่วนที่สามเป็นการทดสอบผลของกระเจี๊ยบในการเสริมประสิทธิภาพของวัคซีนในปลาดุกลูกผสม โดยปลาดุกจะได้รับวัคซีนเชื้อตายและได้รับอาหารผสมกระเจี๊ยบในอัตราส่วน 0, 2.5, 5.0, และ 7.5% ตามลำดับ พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารผสมกระเจี๊ยบจะมีปริมาณของแอนติบอดีไคเตอร์ที่สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม นอกจากนี้หลังจากทดสอบความสามารถในการป้องกันการตายจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ปลาที่ได้รับอาหารผสมกระเจี๊ยบในอัตราส่วน 0, 2.5, 5.0, และ 7.5% มีอัตราการรอดตายเท่ากับ 16.67 ± 17.56 , 18.33 ± 12.58 , 85.00 ± 13.25 และ 98.33 ± 2.89 ตามลำดับ การทดลองส่วนสุดท้ายเป็นการทดสอบพิษเฉียบพลันของกระเจี๊ยบต่อปลาดุกลูกผสม โดยให้ปลาแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว แช่ในสารละลายกระเจี๊ยบ 4 ระดับเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า อัตราการรอดของปลาดุกที่แช่ในสารละลายกระเจี๊ยบ 0, 1200, 2400 และ 4800 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ 100.00 ± 0.00 , 93.67 ± 5.77 , 93.33 ± 7.64 และ 98.33 ± 2.83 % ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดชี้ให้เห็นว่า กระเจี๊ยบมีสารสำคัญในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* และเป็นพิษน้อยมากต่อปลาดุกกลไกในการทำงานดังกล่าวเป็นงานวิจัยต่อเนื่องที่ควรจะศึกษาเพิ่มเติม รวมทั้งการทดลองในภาคสนาม องค์ความรู้นี้จะประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่ปลอดภัยในอนาคต

Abstract

The hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* X *Clarias gariepinus*) is an economical species and is cultured nationwide in Thailand. Most fish farmers raise them with high density and that leads to more susceptibility to the epizootic bacterial diseases. Unfortunately, the cure for fish bacterial diseases is very difficult since most antibiotics and chemicals used are expensive imported materials. In addition, using too many drugs can result in toxic residue in fish flesh and in the environment. The purpose of this study is to determine the possibility of using Thai traditional medicinal plants for the antibacterial activity against *Aeromonas hydrophila*. The *in vitro* result showed roselle provided the best antibacterial activity with MIC = 39.06 mg/ml. The second part was to examine the effect of the roselle as an immuno-stimulatory feed additive in the hybrid catfish food. The hybrid catfish were fed diets containing different levels of roselle as following: 0 (control), 2.5, 5.0, and 7.5%, respectively for 60 days. The hybrid catfish were further challenged with virulent *A. hydrophila*. The survival rates were 35.00 ± 0.00 , 61.67 ± 2.89 , 65.00 ± 5.00 , and 80.00 ± 8.66 % found in the catfish fed the diets containing 0, 2.5, 5.0, and 7.5% roselle, respectively. The third part was to examine the effect of the roselle as an immuno-stimulatory feed additive in the immunized hybrid catfish food. The immunized catfish were given diets containing 0, 2.5, 5.0, and 7.5% roselle, respectively. It was found that catfish which received the diets containing roselle had higher antibody titers than the ones which received the control diet. In addition, after challenging with virulent *A. hydrophila* by the end of the third month of the experiment, the survival rates of the hybrid catfish fed with 0, 2.5, 5.0, and 7.5% roselle were 16.67 ± 17.56 , 18.33 ± 12.58 , 85.00 ± 13.25 , and 98.33 ± 2.89 , respectively. The last section was to evaluate the acute toxicity of the roselle to the hybrid catfish. Groups of 20 hybrid catfish were exposed to 4 concentrations of roselle for 96 h. The survival rates of the hybrid catfish at 0, 1200, 2400, and 4800 ppm roselle were 100.00 ± 0.00 , 93.67 ± 5.77 , 93.33 ± 7.64 , and 98.33 ± 2.83 %, respectively. These results indicated roselle has an antibacterial activity that is less toxic to catfish. The mechanism of this activity should be studied further in depth. The field study on a larger scale should be then conducted. This information will be of benefit to the development of safer aquatic food in the long run.

สารบัญ

หน้า

บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	2
วิธีการวิจัย.....	3
ผลการศึกษา.....	8
วิจารณ์และสรุปผล.....	13
คำขอบคุณ.....	17
บรรณานุกรม.....	18
ภาคผนวก.....	20

งบประมาณในการวิจัย

สิ่งที่ได้เรียนรู้และข้อเสนอแนะ

บทนำ

ปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* X *Clarias gariepinus*) เป็นปลาดุกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว รสชาติดี ประเทศไทยสามารถผลิตได้ 44,000 ตันในปี 2538 และมีการขยายตัวจนถึง 76,000 ตันในปี 2543 (กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง 2546) ปลาดุกเป็นผลผลิตอันดับสองของการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดรองมาจากปลานิล เกษตรกรนิยมเลี้ยงเนื่องจากมีความต้องการของตลาดสูง มีการส่งออกปลาดุกแช่แข็ง บางส่วนไปยังสหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่นและตะวันออกกลาง (อุทัยรัตน์ 2544)

อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงปลาดุกลูกผสมแบบหนาแน่นมักเกิดปัญหาโรคระบาดอยู่เสมอ โดยเฉพาะจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจแก่เกษตรกรจำนวนมาก การที่จะใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในการแก้ปัญหาดังกล่าวทำได้ยาก นอกจากนั้นการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในปริมาณมาก อาจทำให้แบคทีเรียพัฒนาสายพันธุ์ที่ดื้อยา และทำให้เกิดการตกค้างในเนื้อปลาส่งผลกระทบต่อการใช้งานและความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ทางหนึ่งในการลดปัญหาดังกล่าว อาจทำได้โดยการคัดเลือกสมุนไพรมานำใช้ในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในปลาดุก จากการศึกษาเอกสารวิชาการพบว่าพืชหลายชนิดที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เช่น บอระเพ็ดสามารถใช้รักษาแผลฝีหนอง (นันทวัน 2535) และสามารถทำลายเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ (สถาพรและคณะ 2539) คณะเภสัชศาสตร์ ม.มหิดล (2540) รายงานว่า ฤทธิ์ของกระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดวัณโรค และโรคปอดบวม นอกจากนี้สารสกัดใบบวบบก ทดลองได้ผลดีกับเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง และสามารถยับยั้งวัณโรคได้ Chanarat และคณะ (1997) รายงานว่า สารสกัดที่ได้จากเปลือกมังคุดสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enteritidis* ส่วน Tseng และคณะ (1997) กล่าวว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบมีสารต้านอนุมูลอิสระที่ป้องกันไม่ให้เซลล์ตับของหนูแตกเมื่อโดนสารพิษ

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการคัดเลือกหาสมุนไพรมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ในห้องปฏิบัติการ จากนั้นจะคัดเลือกพืชที่ให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียไปใช้ผสมอาหารให้กับปลาดุกลูกผสม โดยข้อมูลที่จะทั้งหมดจะใช้เป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการเสาะหาแนวทางในการลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อตรวจสอบหาสมุนไพรที่มีผลต่อการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคในปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ
- 2) เพื่อศึกษาความเป็นพิษของกระเจี๊ยบที่มีต่อปลาดุกลูกผสม
- 3) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้สมุนไพรผสมอาหารเพื่อสร้างภูมิคุ้มกัน
ในปลาดุกลูกผสม
- 4) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของสมุนไพรในการช่วยเสริมภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ
ในการเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคปลาดุกลูกผสม

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมสมุนไพรในการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในระดับห้องปฏิบัติการ

นำสมุนไพรแต่ละชนิด คือ กระเทียม (*Allium sativum*) ใบบัวบก (*Centella asiatica*) บอระเพ็ด (*Tinospora crispa*) กระเจี๊ยบ (*Hibiscus sabdariffa*) และเปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana*) มาล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วนำไปอบที่ 45 °C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสมุนไพรที่แห้งชนิดละ 50 กรัม มาบดเป็นผง แล้วนำไปสกัดตามวิธีของ Direkbusarakum (1998) โดยมีการปรับเปลี่ยนวิธีการเล็กน้อย เพื่อให้ได้สารสกัดมากที่สุด กล่าวคือหมักสมุนไพรที่บดแล้วในตัวทำละลายเอทานอล ในอัตราส่วนน้ำหนักต่อปริมาตร เท่ากับ 1 ต่อ 10 หลังจากหมักไว้ 3 วันจึงนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotavapor (Buchi) จากนั้นจึงเติม polyvinylpyrrolidone (PVP) เพื่อช่วยในการทำละลาย นำไประเหยเอาตัวทำละลายออกจนแห้ง จึงนำไปละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตร 40 มิลลิลิตรแล้วเก็บสารละลายที่ได้ในตู้แช่แข็ง เพื่อไม่ให้สารสำคัญสลายตัว

2. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*

นำเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่แยกได้จากปลาตุ๊กตาสวยที่เป็นโรคในเขต จังหวัดเชียงใหม่ มาแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่ได้จากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์เป็นตัวเปรียบเทียบกับ ยีนย่นชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วย ชุดจำแนกเชื้อแบคทีเรียทางชีวเคมีสำเร็จรูป API 20E (บริษัท ไฮแอนดิฟิค โปรโมชัน จำกัด) จากนั้นจึงนำไปเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชม. รวบรวมเชื้อโดยปั่นในเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (2,500 rpm นาน 15 นาที) ล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ก่อนนำไปคำนวณหาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้การเปรียบเทียบความขุ่นของเชื้อ ที่อ่านค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ($OD_{540nm} = 0.1$ เทียบเท่ากับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

3. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) ในห้องปฏิบัติการ

ตรวจสอบหาความเข้มข้นของสารละลายจากสมุนไพรที่น้อยที่สุดแต่ละชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ กระเจี๊ยบ เปลือกมังคุด บอระเพ็ด ใบบัวบกและกระเทียม เป็นตัวทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยอาศัยหลักการจาก Christofilogiannis (2001) กล่าวคือ เจือจางสารสกัดจาก

สมุนไพรมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากความเข้มข้น 1,250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรด้วยอาหารเหลว Muller Hinton (Himedia) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยวิธีเจือจางในอัตราส่วน 1:2 (two-fold serial dilution) ให้มีความเข้มข้นดังนี้ 625, 312.5, 156.25, 78.13 และ 19.53 มก./มล. ตามลำดับ แล้วเติมเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ลงไป หลอดละ 10^4 เซลล์ การทดสอบจะทำ 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้นสารสกัด นำไปอบที่ 30 °C ทิ้งไว้ 24 ชม. อ่านผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยเทียบกับหลอดทดลองที่ไม่ใส่สารสกัดและที่ใส่ยาปฏิชีวนะ oxytetracycline ยืนยันผลการทดลองโดยการทำซ้ำอีก 2 ครั้ง

4. การตรวจสอบผลของความเป็นกรดต่ออัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ในห้องปฏิบัติการ

ปรับความเป็นกรดของอาหาร Muller Hinton (Himedia) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ตรวจสอบความเป็นกรดของอาหารด้วย pH meter รุ่น CG840 (Schott, Germany) เพื่อให้ได้ pH ตามที่ต้องการ จากนั้นนำอาหารที่ปรับความเป็นกรดแล้วไปฆ่าเชื้อในหม้ออบไอน้ำความดันสูง ทิ้งให้อาหารเหลวเย็นลง แล้วเติมเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ลงไป หลอดละ 10^4 เซลล์ การทดสอบจะทำ 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้นสารสกัด นำไปอบที่ 28 °C ทิ้งไว้ 24 ชม. อ่านผลการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว ยืนยันผลการทดลองโดยการทำซ้ำอีก 2 ครั้ง

5. การเตรียมสัตว์ทดลอง

ก่อนที่จะทำการทดลอง จะนำปลาดุกลูกผสม ขนาดความยาว 10-12 เซนติเมตร จากฟาร์มในเขตจังหวัดเชียงใหม่ นำมาพักในตู้กระจกขนาด 25 X 30 X 50 ลิตร. ซม. เป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนถ่ายน้ำ 50% วันเว้นวัน เพื่อตรวจความแข็งแรงสมบูรณ์ของปลาที่ใช้ทดลองและปรับสภาพปลาให้คุ้นเคยกับหน่วยทดลอง

6. การศึกษาความเป็นพิษของกระเจี๊ยบต่อปลาดุก

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design; CRD) โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ นำปลาดุกลูกผสม ขนาด 10-12 ซม. มาพักในตู้กระจกที่มีน้ำ 20 ลิตรก่อนทำการทดลอง โดยใช้ตู้ที่ทำการทดลองจำนวน 20 ตัวต่อ 1 ซ้ำ เปรียบเทียบความเป็นพิษเฉียบพลันที่เกิดจากความเข้มข้นของสารละลายกระเจี๊ยบในระดับต่าง ๆ กัน ดังนี้คือ 0, 1200, 2400 และ 4800 ppm สังเกตว่าแต่ละความเข้มข้นก่อให้เกิดพิษต่อปลาดุก โดยสังเกตการตายของปลาหลังได้รับการแช่ในสมุนไพรมานาน 96 ชั่วโมง มีการตรวจวัดคุณภาพน้ำและสังเกตพฤติกรรมของปลาดุกควบคุมไปด้วยตลอดการทดลอง

7. การวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของวัตถุดิบที่นำมาใช้ผสมอาหาร

อาหารทดลองที่ใช้มีปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนหลัก (ตารางที่ 1 และ 2) เพื่อให้ปริมาณของโปรตีนในอาหารใกล้เคียงกัน จึงวิเคราะห์ส่วนประกอบสำคัญอย่างหยาบ (proximate analysis) ในสมุนไพรและวัตถุดิบที่ทำอาหารปลา โดยวิธีการดังต่อไปนี้ วิเคราะห์หาโปรตีนโดย micro Kjeldahl ไขมันโดยวิธี dichloromethane extraction ตาม Soxhlet method เยื่อใยโดยวิธี fritted glass crucible เถ้าโดยการเผาใน muffle furnace 550 °C 12 ชม. และความชื้นโดยการอบแห้งในตู้อบ 105 °C 24 ชม. ตามวิธีของนิวุฒิ และสุฤทธิ์ (2544) ก่อนนำมาคำนวณสูตรอาหาร โดยจะเลือกใช้กระเจี๊ยบผสมอาหารปลา

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของวัสดุอาหารสำหรับปลาดุกในชุดควบคุม
(ดัดแปลงมาจากสูตร สปช 5)

ชนิดของวัตถุดิบ	เปอร์เซ็นต์
ปลาป่น	23
กากถั่วเหลือง	46
รำละเอียด	14
ปลายข้าว	16
วิตามินและแร่ธาตุ (บริษัท เอเอฟอี จำกัด)*	1

*วิตามินและแร่ธาตุ ประกอบด้วย วิตามินเอ 2,200,000 IU/กก., วิตามินดี 440,000 IU/กก., วิตามินอี 2,500 มก/กก., วิตามินเค 400 มก/กก., วิตามินบีหนึ่ง 200 มก/กก., วิตามินบีสอง 900 มก/กก., วิตามินซี 2,000 มก/กก., กรดเพนโททินิก 4,000 มก/กก., กรดนิโคตินิก 1,100 มก/กก., ทองแดง 600 มก/กก., เหล็ก 8,000 มก/กก., ไอโอดีน 120 มก/กก., แมงกานีส 14,000 มก/กก., สังกะสี 8,000 มก/กก., โบรอน 60 มก/กก., ซีลีเนียม 32 มก/กก.

8. การเตรียมอาหารปลา

นำผลการวิเคราะห์ทางโภชนาการของวัสดุประกอบอาหาร (ตารางที่ 5) มาคำนวณสูตรอาหาร โดยอาหารแต่ละสูตรจะมีปริมาณกระเจี๊ยบแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 0, 2.5, 5.0 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

ผสมวัตถุดิบให้เข้ากัน พร้อมน้ำที่ใส่น้อย ก่อนนำมาอัดเส้นและตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นผึ่งลมให้แห้ง ก่อนเก็บในที่เย็นจนกว่าจะนำมาใช้

9. การเตรียมวัคซีน

วัคซีนที่ใช้เป็นวัคซีนเชื้อตาย เตรียมจากเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* บริสุทธิ์ที่แยกได้จากปลาดุกลูกผสมที่เป็นโรค นำมาเลี้ยงให้ได้ปริมาณมากพอในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI (Himedia) นาน 18 ชั่วโมง นำไปปั่นในเครื่องปั่นความเร็วสูง นาน 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% แล้วฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ทิ้งไว้ค้างคืน ตรวจสอบว่า เชื้อตายหมดหรือไม่ จากนั้นเก็บวัคซีนที่ได้ไว้ในสารละลายน้ำเกลือ 0.85% นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

ตารางที่ 2 สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองเลี้ยงปลาดุกลูกผสม

วัตถุดิบ	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
กระเจี๊ยบ	0	2.5	5.0	7.5
ปลาป่น	23	22	22	21
กากถั่วเหลือง	46	45	44	43
รำละเอียด	14	14	14	13
ปลายข้าว	16	15	14	14
วิตามินและแร่ธาตุ	1	1	1	1
โปรตีนรวม (%)	33.17	32.22	31.79	30.80
พลังงานรวม (กิโลจูลต่อกิโลกรัม)	1.76	1.74	1.73	1.70

10. การให้อาหารผสมกระเจี๊ยบ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ตัว ปลาดุกทุกกลุ่มจะได้รับอาหารที่มีโปรตีนและพลังงานดังที่ได้แสดงในตารางที่ 2 ให้อาหารจนปลาอิ่มและบันทึกปริมาณอาหารปลาที่ใช้ไปเพื่อใช้ในการคำนวณอัตราการแลกเนื้อหลังสิ้นสุดการทดลอง

11. การให้วัคซีนเพื่อศึกษาความสามารถของสารสมุนไพรในการช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันในปลาดุกลูกผสม

ให้วัคซีนแบคทีเรียเชื้อตายของ *Aeromonas hydrophila* แก่ปลาดุกอยู่ในวันที่ 10 และ 30 ของการทดลอง โดยการฉีดเข้าช่องท้องตัวละ 0.2 มิลลิลิตร (10^6 CFU) หลังจากทดลองตามข้อ 10 ครบ 60 วัน จะเก็บตัวอย่างเลือดของปลา เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านเชื้อโรคโดย bacterial agglutination ซึ่งทำโดยการแยกซีรัมมาทำให้เจือจางโดยวิธีการ serial two-fold dilution ด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จึงใส่แอนติเจน (เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์) จำนวน 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในตู้บ่ม 30 °C 24 ชม. แล้วอ่านผลเปรียบเทียบกับซีรัมไคเตอร์จากปลาก่อนให้อาหารผสมสมุนไพร

12. การตรวจสอบความสามารถปลาในการรอดตายจากการติดเชื้อแบคทีเรีย (Challenge test)

จะแบ่งปลาดุกลูกผสมเป็น 2 ชุด ปลาดุกชุดแรกไม่มีการให้วัคซีน ในขณะที่ปลากลุ่มที่สองจะให้วัคซีนด้วย

หลังจากให้อาหารผสมกระเจี๊ยบครบ 2 เดือน จะตรวจสอบความสามารถของปลาดุกต่อการป้องกันการตายอันเนื่องมาจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* โดยฉีดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกับที่นำไปผลิตวัคซีนเข้าช่องท้องจำนวน 0.2 มิลลิลิตรต่อตัว (10^4 CFU) บันทึกอัตราการตายภายในเวลา 7 วัน ตรวจอาการภายนอกและเขี่ยเชื้อจากไตเพื่อพิสูจน์ว่า ปลาตายจากเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว

ผลการศึกษา

1. ความสามารถของสารสกัดหยาบสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในระดับห้องปฏิบัติการ

สารสกัดจากพืชทุกชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ที่แยกได้จากปลาดุกทั้ง 2 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3) โดยกระเจี๊ยบจะให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด (ค่า MIC = 39.06 มก./มล.) ในขณะที่กระเทียมและบอระเพ็ดให้ผลดีรองลงมาและมีปริมาณ MIC เท่ากัน คือ 156.25 มก./มล. สารสกัดหยาบจากบัวบกและเปลือกมังคุดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ในความเข้มข้นต่ำสุด 312.5 มก./มล. ส่วนค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ oxytetracycline (Fluka) คือ 0.006 มก./ลิตร

ตารางที่ 3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากพืชต่าง ๆ ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* จำนวน 2 สายพันธุ์ (ผลการทดลองได้มาจากผลที่เหมือนกันสามครั้ง)

ชนิดของพืชที่ใช้สกัด	ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)						
	0	19.53	39.06	78.13	156.25	312.5	625
เปลือกมังคุด	—	—	—	—	—	+	+
กระเจี๊ยบแดง	—	—	+	+	+	+	+
กระเทียม	—	—	—	—	+	+	+
บอระเพ็ด	—	—	—	—	+	+	+
บัวบก	—	—	—	—	—	+	+

+ เชื้อแบคทีเรียไม่เจริญ

— เชื้อแบคทีเรียเจริญ

2. ผลของความเป็นกรดต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ในห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อตรวจสอบว่า ความเป็นกรดของกระเจี๊ยบไม่ได้เป็นตัวยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ในหลอดทดลอง (ตารางที่ 4) พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถเจริญได้ในความเป็นกรดที่ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 5.5

ตารางที่ 4 ความสามารถในการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* ในอาหารเหลวที่มีระดับความเป็นกรดต่างกัน ที่อุณหภูมิ 28 °C

	ความเป็นกรดต่างของอาหารเหลว Muller Hinton								
	7.0	6.8	6.5	6.3	6.0	5.8	5.5	5.3	5.0
การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>A. hydrophila</i>	—	—	—	—	—	—	+	+	+

+ เชื้อแบคทีเรียไม่เจริญ

— เชื้อแบคทีเรียเจริญ

3. คุณค่าทางอาหารของวัตถุดิบที่นำมาใช้ผสมอาหาร

จากการวิเคราะห์วัตถุดิบที่ใช้ผสมอาหาร โดยข้อมูลที่ได้ (ตารางที่ 5) นำไปคำนวณสูตรอาหารสำหรับทดลองเลี้ยงปลาดุกลูกผสม

ตาราง

5 องค์ประกอบทางเคมี (%) ของวัตถุดิบที่ใช้สร้างสูตรอาหาร

วัตถุดิบ	โปรตีน	ไขมัน	เยื่อใย	เถ้า	คาร์โบไฮเดรต
กระเจี๊ยบ	1.46 ± 0.11	2.26 ± 0.10	0.91 ± 0.07	14.21 ± 0.33	53.70 ± 0.58
ปลาป่น	52.72 ± 1.65	21.06 ± 0.70	0.60 ± 0.01	28.28 ± 0.64	9.27 ± 0.99
ปลายข้าว	4.66 ± 0.48	2.03 ± 0.23	0.33 ± 0.06	1.81 ± 0.16	82.81 ± 0.29
รำละเอียด	8.64 ± 0.46	18.23 ± 0.42	10.00 ± 0.26	10.67 ± 0.32	46.07 ± 0.40
กากถั่วเหลือง	41.50 ± 0.43	1.68 ± 0.06	7.16 ± 0.50	6.75 ± 0.05	38.28 ± 0.18

4. ความเป็นพิษของกระเจี๊ยบต่อปลาดุก

หลังจากใส่สารละลายกระเจี๊ยบลงในตู้เลี้ยงปลาดุก พบว่า ปลาดุกจะปรับตัวให้เข้มข้นตามลักษณะของสารละลาย โดยความเป็นกรดของน้ำมีค่าเท่ากับ 7.58 ± 0.06 , 6.46 ± 0.10 , 4.56 ± 0.07 และ 3.62 ± 0.05 ในกลุ่มการทดลองที่แช่ปลาในกระเจี๊ยบความเข้มข้น 0, 1200, 2400 และ 4800 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ จากนั้นปลาจะเริ่มกินอาหารลดลง โดยที่ระดับความเข้มข้นของกระเจี๊ยบ 4,800 ppm มีผลทำให้น้ำเกิดตะกอนหนืด มีฟองและมีกลิ่นฉุน ปลาไม่กินอาหาร นอกจากนี้พบว่า อัตรารอดตายของปลาดุกลูกผสมที่แช่ในสารละลายกระเจี๊ยบที่ระดับความเข้มข้น 0, 1200, 2400 และ 4800 มิลลิกรัมต่อ

หลัง 96 ชั่วโมง ซึ่งคาดว่าหากมีการดำเนินการทดลองต่อไปปลาอาจจะตายเนื่องจากคุณภาพน้ำที่แย่ง ไม่ใช่ความเป็นพิษของสารสกัดจากกระเจี๊ยบโดยตรง

ตารางที่ 6 ความเป็นกรดต่างของน้ำและเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดตายของปลาดุกลูกผสมหลังจากแช่ในสารละลายกระเจี๊ยบที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ระดับความเข้มข้นของกระเจี๊ยบ (มิลลิกรัม/ลิตร)	ความเป็นกรดต่างของน้ำ หลังเติมกระเจี๊ยบ	อัตราการรอดตาย (%)
0	7.58 ± 0.06	100.00 ± 0.00
1,200	6.46 ± 0.10	93.67 ± 5.77
2,400	4.56 ± 0.07	93.33 ± 7.64
4,800	3.62 ± 0.05	98.33 ± 2.83

5. การเจริญเติบโต

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 7 พบว่า ปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม (ไม่มีส่วนผสมของกระเจี๊ยบ) มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมกระเจี๊ยบทุกชุดการทดลองตลอดการทดลอง ซึ่งจากการสังเกตพบว่า ปลาดุกลูกผสมยอมรับอาหารที่มีส่วนผสมของกระเจี๊ยบน้อยกว่าอาหารชุดควบคุม และเมื่อเลี้ยงปลาดุกลูกผสมครบสองเดือน พบว่า น้ำหนักของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารผสมกระเจี๊ยบมีแนวโน้มน้อยกว่าปลาดุกที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ แม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 7 น้ำหนักของปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลอง ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ โดยค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$)

ชุดการทดลอง	ระยะเวลาการเลี้ยง	
	30 วัน	60 วัน
ชุดควบคุม	20.83 ± 0.29a	26.70 ± 5.98g
กระเจี๊ยบ 2.5 %	20.08 ± 0.14ab	26.27 ± 5.74g
กระเจี๊ยบ 5.0 %	20.17 ± 0.29ab	26.02 ± 5.60g
กระเจี๊ยบ 7.5 %	19.83 ± 0.58b	25.90 ± 5.46g

สำหรับปลาดุกกลุ่มผสมชุดนี้จะไม่มีการให้วัคซีน ดังนั้นเมื่อทำการทดลองครบ 60 วัน จึงทดสอบความสามารถของปลาดุกในการป้องกันการตายจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* พบว่า ปลาดุกที่ได้รับอาหารผสมกระเจี๊ยบในอัตราส่วน 0, 2.5, 5.0 และ 7.5% จะมีอัตราการตาย 35.00 ± 0.00 , 61.67 ± 2.89 , 65.00 ± 5.00 และ 80.00 ± 8.66 ตามลำดับ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลของการเสริมกระเจี๊ยบแดงอบแห้งในอาหารที่ต่างกัน 4 ระดับ เป็นเวลานาน 2 เดือน แล้วจึงให้ปลาได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* [ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)]

ชุดการทดลอง	อัตราการตาย (%)
ชุดควบคุม	$35.00 \pm 0.00a$
กระเจี๊ยบ 2.5 %	$61.67 \pm 2.89b$
กระเจี๊ยบ 5.0 %	$65.00 \pm 5.00b$
กระเจี๊ยบ 7.5 %	$80.00 \pm 8.66c$

ส่วนปลาดุกที่ให้วัคซีนเพื่อทดสอบความเป็นไปได้ของกระเจี๊ยบในการช่วยเสริมภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ โดยการตรวจสอบการเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคสำหรับปลาดุกกลุ่มผสม จากตารางที่ 9 จะเห็นได้ว่า กระเจี๊ยบมีส่วนทำให้แอนติบอดีไคเตอร์เฉลี่ยของปลาดุกกลุ่มผสมมีปริมาณที่สูงขึ้น

ตารางที่ 9 ปริมาณแอนติบอดีไคเตอร์เฉลี่ย (geometric mean) ของปลาดุกกลุ่มผสมที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายและได้รับอาหารผสมกระเจี๊ยบ 0, 2.5, 5.0 และ 7.5%

ชุดการทดลอง	ก่อนให้วัคซีน	หลังให้วัคซีนครั้งที่หนึ่ง	หลังให้วัคซีนครั้งที่สอง
ชุดควบคุม	12.60	21.60	31.74
กระเจี๊ยบ 2.5 %	13.61	21.60	40.00
กระเจี๊ยบ 5.0 %	13.61	34.29	50.40
กระเจี๊ยบ 7.5 %	10.00	47.57	50.40

เมื่อเลี้ยงปลาดุกกลุ่มผสมด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ กันดังกล่าวข้างต้น พร้อมทั้งให้วัคซีนครบ 2 เดือน ทำให้ปลาดุกมีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน โดยปลาที่ได้รับ

อาหารชุดควบคุม (ไม่มีกระเจี๊ยบเป็นส่วนผสม) มีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุด นอกจากนี้พบว่า ปลาที่โตช้าจะมีอัตราการแลกเนื้อที่สูง (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 อัตราการเจริญเติบโตและอัตราการแลกเนื้อ (FCR) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารผสมกระเจี๊ยบ 4 ระดับและได้รับวัคซีนเชื้อตาย

ชุดการทดลอง	อัตราการเจริญเติบโต (กรัม/ตัว/วัน)	อัตราแลกเนื้อ
ชุดควบคุม	0.942	1.40
กระเจี๊ยบ 2.5 %	0.661	1.55
กระเจี๊ยบ 5.0 %	0.854	1.69
กระเจี๊ยบ 7.5 %	0.704	1.72

จากการศึกษาพบว่า กระเจี๊ยบมีประสิทธิภาพช่วยเสริมฤทธิ์วัคซีนป้องกันการตายจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ได้ดีขึ้น โดยเฉพาะปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารผสมกระเจี๊ยบ 5.0 และ 7.5% (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ผลของการให้อาหารผสมกระเจี๊ยบแดงอบแห้งในอาหารที่แตกต่างกัน 4 ระดับแก่ปลาดุกลูกผสมที่ได้รับวัคซีนเชื้อตาย หลังจากการเลี้ยงนาน 2 เดือน จึงให้ปลาได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* [ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (P < 0.05)]

ชุดการทดลอง	อัตราการรอดตาย (%)
ชุดควบคุม	16.67 ± 17.56a
กระเจี๊ยบ 2.5 %	18.33 ± 12.58a
กระเจี๊ยบ 5.0 %	85.00 ± 13.25b
กระเจี๊ยบ 7.5 %	98.33 ± 2.89b

วิจารณ์และสรุปผล

จากการตรวจหาค่าต่ำสุดของสมุนไพรมีจำนวน 5 ชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ในห้องปฏิบัติการพบว่า กระเจี๊ยบแดงให้ค่า MIC ที่ต่ำสุด (39.06 ม.ก./ม.ล.) ดังนั้นจึงเลือกกระเจี๊ยบแดงเพื่อใช้ผสมอาหารให้ปลาอีก ส่วนค่า MIC ของพืชชนิดอื่น ๆ พบว่า มีค่ายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าวสูงมาก (มากกว่า 155 ม.ก./ม.ล.) จึงไม่ได้นำมาใช้ แม้ว่ามีรายงานว่าพืชเหล่านี้มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์บก ฉะนั้นในแง่ของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันจึงไม่ควรจะมองข้ามการศึกษาพืชสมุนไพรเหล่านั้น

กระเจี๊ยบแดงเป็นพืชที่มนุษย์ใช้บริโภคทั่วไป จึงสามารถลดความข้อใจในเรื่องปัญหาเรื่องความเป็นพิษและปัญหาสารตกค้างในเนื้อปลาได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาโดยเพิ่มเติมจำนวนสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของสารสกัดที่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าว เนื่องจากแบคทีเรีย *A. hydrophila* แต่ละสายพันธุ์มีความเป็นพิษของเชื้อและความสามารถที่ทำให้ปลาเกิดโรคที่แตกต่างกัน (Angka และคณะ 1995) นอกจากนี้การทำวิจัยเกี่ยวกับผลของสารสกัดยับยั้งจากกระเจี๊ยบต่อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่มีอยู่ในตัวปลาโดยที่ไม่ทำอันตรายต่อปลา (normal flora) เพื่อตรวจสอบว่ากระเจี๊ยบมีผลเสียต่อแบคทีเรียซึ่งเป็นประโยชน์ต่อปลาหรือไม่ เพราะว่าแบคทีเรียหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในปลาอาจมีส่วนในการป้องกันการบุกรุกของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ช่วยย่อยอาหารหรือช่วยในการกำจัดของเสียในแหล่งน้ำ

เมื่อเปรียบเทียบค่า MIC ระหว่างกระเจี๊ยบกับยาปฏิชีวนะออกซิเตตราซัยคลินพบว่า ที่ระดับความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เท่ากันต้องใช้ปริมาณของกระเจี๊ยบที่มากกว่าออกซิเตตราซัยคลินถึง 6.5×10^6 เท่า ดังนั้นหากมีการสกัดหาสารสำคัญจากกระเจี๊ยบอาจจะเป็นการง่ายต่อการนำไปใช้ เป็นการลดปัญหาเรื่องความแปรปรวนและความคงตัวของสารสำคัญที่ได้จากกระเจี๊ยบสด รวมทั้งเป็นการลดปัญหาเรื่องความแปรปรวนของวัตถุดิบที่มาจากต่างพื้นที่อันเกิดจากการได้รับสารอาหารที่ต่างกัน

จากผลการทดลองยังไม่มีข้อพิสูจน์ว่าสารออกฤทธิ์ในกระเจี๊ยบตัวใดหรือหลายตัวร่วมกันที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* การตรวจสอบหาสารสำคัญที่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ จะช่วยลดข้อสงสัยที่ว่า ผลของการเจริญของแบคทีเรียเกิดจากกระเจี๊ยบแดง ไม่ใช่จากการที่การสกัดกระเจี๊ยบมีรสเป็นกรด อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อตรวจสอบดูว่า ความเป็นกรดของกระเจี๊ยบไม่ใช่เป็นตัวการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ซึ่งพบว่า แบคทีเรีย *A. hydrophila* ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีสภาพกรดต่ำกว่าหรือเท่ากับ 5.5 (ตารางที่ 4)

Tsai และคณะ (2002) รายงานว่า สารที่สร้างสี anthocyanin ในกระเจี๊ยบเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ในขณะที่ Tseng และคณะ (2000) กล่าวว่า กรด protocatechuic (PCA) ที่สกัดจากกระเจี๊ยบมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ที่ติด

เชื้อ (cytotoxicity effect) ซึ่งกรดดังกล่าวนี้อาจจะเป็นประโยชน์ต่อการทำลายเซลล์ปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรีย การศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะอันเกิดจากกระเจี๊ยบเป็นสิ่งจำเป็นอีกอย่างหนึ่งที่ช่วยตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัด เป็นต้นว่า การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบเลือด ปริมาณเม็ดเลือดรวม ปริมาณเม็ดเลือดขาว จากการศึกษาของ Colic และคณะ (2002) พบว่า สารสกัดกระเทียมที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำและแอกอฮอลล์เมื่อใช้ร่วมกับสารกระตุ้นการสร้างเซลล์เม็ดเลือดขาว concanavalin A (Con A) พบว่า มีการเพิ่มการสร้างเซลล์เม็ดเลือดขาวของหนู แต่สารสกัดจากกระเทียมอย่างเดียวไม่สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวได้ และยังพบว่าปริมาณสารสกัดที่มากเกินไปจะมีฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว

จากผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการจะเห็นได้ว่า มีความเป็นไปได้ในการใช้สารสกัดจากพืชต่าง ๆ เพื่อป้องกันการเกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรีย จึงควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมความคงตัวของสารสำคัญที่สกัดได้จากกระเจี๊ยบ เพราะปัญหาดังกล่าวทำให้ประสิทธิภาพสมุนไพรหลายชนิดลดลงจนทำให้การใช้งานไม่ได้ผล เช่น ผลของอุณหภูมิ ความเป็นกรดต่างและระยะเวลาในการเก็บรักษาสารสกัด เป็นต้น วิธีการสกัดเพื่อให้ได้ปริมาณสารสำคัญในปริมาณที่สูงขึ้นหรือการวิเคราะห์หาสารสำคัญในพืชชนิดนั้น ๆ เพื่อนำมาเป็นตัวช่วยบ่งชี้ประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้ก็เป็นงานวิจัยต่อเนื่องอีกชิ้นหนึ่งที่ขาดไม่ได้ อย่างไรก็ตาม การใช้สารสำคัญจากสมุนไพรทดแทนการใช้สารสกัดหยาบเพื่อเป็นส่วนผสมอาหารสัตว์จะต้องคำนึงด้วยว่า การเสริมสารสำคัญนั้น ๆ ไม่มีผลกระทบต่อต้นทุนการผลิตมากนัก

Plumb (1994) กล่าวว่า ความเป็นกรดต่างของน้ำ (pH) ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงปลาอยู่ระหว่าง 6.5 – 9.0 ไมตรีและจาร์วรณ์ (2528) รายงานว่า ปลาที่เลี้ยงในน้ำที่มี pH 4.0 – 6.0 แม้ว่าจะไม่ทำให้ปลาบางชนิดตาย แต่ปลาจะโตช้าและระบบสืบพันธุ์ชะงัก จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของกระเจี๊ยบต่อปลาดุกลูกผสมในครั้งนี้ พบว่า ปลาที่ตายเนื่องจากความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบน้อยมาก ปลาที่ตายน่าจะเกิดจากสภาพความเป็นกรดของน้ำเหนียวน้ำทำให้ปลาอ่อนแอ กระเจี๊ยบ 4,800 มิลลิกรัมต่อลิตรละลายในน้ำ (pH = 3.6) จะเริ่มมีฟอง เกิดกลิ่นฉุนและเริ่มเน่าเสีย ซึ่งในทางปฏิบัติปริมาณของกระเจี๊ยบที่ใช้้น้อยกว่าระดับของกระเจี๊ยบที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษมาก ปริมาณความเป็นกรดของน้ำในชุดการทดลองในส่วนการให้อาหารผสมกระเจี๊ยบมีค่ามากกว่า 6.5 จึงคาดว่า กระเจี๊ยบไม่น่าจะมีผลทางลบชนิดเฉียบพลันต่อปลาดุกลูกผสม คณะผู้วิจัยจะศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) ของกระเจี๊ยบเพิ่มเติม

แม้ว่าสภาวะน้ำที่เป็นกรดจากกระเจี๊ยบอาจจะมีผลต่อการเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ อัตรารอดและผลผลิตของปลา การทดสอบความเป็นพิษเรื้อรัง (Chronic toxicity assay) อาจไม่มีความจำเป็น หากไม่มีการผสมกระเจี๊ยบจำนวนมากในอาหาร อย่างไรก็ตามควรศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของการให้อาหารผสมกระเจี๊ยบต่ออัตราการเจริญเติบโต อัตราการเจริญพันธุ์ ความดกของไข่ของปลาดุกลูกผสม หากมีการให้อาหารผสมกระเจี๊ยบแก่ปลา

ระยะยาว และควรศึกษาถึงจุลพยาธิวิทยาของปลาตุ๊กตากลูผสมที่ได้รับอาหารผสมกระเจี๊ยบ ในระดับที่แตกต่างกันควบคู่กันไปด้วย เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อและอวัยวะภายใน โดยในการศึกษาครั้งต่อไปจะต้องคำนวณปริมาณพลังงานของอาหารในแต่ละสูตรให้ได้เท่ากัน เพื่อลดความคาดเคลื่อนที่อาจจะมีผลต่อลักษณะการเจริญเติบโต (growth performance)

ในการทดลองครั้งนี้อาหารทดลองทุกสูตรได้รับการปรับให้มีปริมาณสารอาหารหลักที่สำคัญใกล้เคียงกันมากที่สุด อย่างไรก็ตามเนื่องจากกระเจี๊ยบมีปริมาณของโปรตีนที่ต่ำมาก (ประมาณ 1.46%) เมื่อเทียบกับโปรตีนในปลาป่น (ประมาณ 52.71%) จะเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีนของอาหารในแต่ละสูตรจะมีปริมาณโปรตีนที่ต่างกัน (ตารางที่ 2) ซึ่งเมื่อพิจารณาผลของการเสริมกระเจี๊ยบในอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตต่อปลาตุ๊กตากลูผสม (ตารางที่ 7 และ 10) ไม่สามารถสรุปผลได้ เนื่องจากสูตรอาหารที่ถูกทดแทนด้วยกระเจี๊ยบจะมีโปรตีนและพลังงานที่ลดลงตามระดับของกระเจี๊ยบที่เพิ่มขึ้น

โดยลักษณะนิสัยปลาตุ๊กตาสสามารถกินอาหารได้ทุกชนิดแต่จะชอบกินอาหารประเภทเนื้อ (วิเศษ 2536) ดังนั้นการยอมรับอาหารที่ผสมกระเจี๊ยบจะน้อยกว่าการยอมรับอาหารชุดควบคุมที่ไม่มีกระเจี๊ยบเป็นส่วนผสม การใช้วัตถุดิบจากพืชทดแทนปลาป่นในการผลิตอาหารสัตว์น้ำ มักจะทำให้การกินอาหารของปลาลดลง การเสริมวัตถุดิบบางอย่างเพื่อดึงดูดการกินอาหารของปลาตุ๊กตากลูผสมจึงเป็นสิ่งที่ควรศึกษาเพิ่มเติม เนื่องจาก การที่ปลากินอาหารที่ผสมกระเจี๊ยบได้น้อย อาจมีส่วนทำให้อัตราการเจริญเติบโตของปลาตุ๊กตากลูผสมในชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมกระเจี๊ยบต่ำกว่าอัตราการเจริญเติบโตของปลาตุ๊กตากลูผสมในชุดการทดลองที่ให้อาหารควบคุม และเมื่อให้อาหารครบ 2 เดือน จะทดสอบประสิทธิภาพของปลากินต่อการป้องกันการตายจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* พบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมกระเจี๊ยบกลับมียัตราการรอดที่สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม แสดงว่า ในกระเจี๊ยบอาจมีสารสำคัญบางอย่างที่ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลาตุ๊กตากลูผสม ซึ่งสารสำคัญอย่างหนึ่งอาจจะได้มาจากวิตามินซี เนื่องจากกระเจี๊ยบมีวิตามินซีเป็นส่วนประกอบค่อนข้างสูง และเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า วิตามินซีมีส่วนช่วยในการเพิ่มภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ (Sahoo and Mukherjee 2003; Cuesta และคณะ 2002; Sobhana และคณะ 2002) จึงควรมีการศึกษาซ้ำเพื่อยืนยันว่า กระเจี๊ยบมีศักยภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคก่อนที่จะวิจัยในระดับลึกต่อไป

โดยปกติแล้ว สมุนไพรหรือพืชธรรมชาติต่าง ๆ มักจัดอยู่ในสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ อย่างไรก็ตามความรู้และเทคนิคในการตรวจสอบภูมิคุ้มกันในปลาในประเทศไทยยังมีข้อจำกัด ส่วนหนึ่งของการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของกระเจี๊ยบในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะโดยทางอ้อม กล่าวคือ ทดสอบว่ากระเจี๊ยบสามารถเสริมประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคในปลากินได้ดียิ่งขึ้นหรือไม่ การศึกษาทำโดยการเพิ่มชุดการทดลองอีกชุดหนึ่ง โดยให้วัคซีนแบคทีเรียเชื้อตายแก่ปลาตุ๊กตากลู

ผสมในวันที่ 10 และ 30 ของการทดลอง และตลอดการทดลองจะให้อาหารที่มีส่วนผสมของ กระเจี๊ยบ 0, 2.5, 5.0 และ 7.5% ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบปริมาณของแอนติบอดีไคเตอร์ เฉลี่ย พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารผสมกระเจี๊ยบจะมีปริมาณของแอนติบอดีไคเตอร์ที่สูงกว่า ปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม

โดยสรุปแล้ว กระเจี๊ยบมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันสำหรับ ปลาดุกลูกผสม ควรมีการสนับสนุนการวิจัยระดับลึกต่อไป เช่น การวิจัยถึงกลไกการทำงานของสารสกัดที่ได้จากกระเจี๊ยบต่อการเสริมระบบภูมิคุ้มกันในปลา ก่อนที่จะนำไปทดสอบใน ภาควิชา และสุดท้ายจึงแนะนำให้เกษตรกรใช้อาหารผสมสมุนไพรแทนการใช้สารเคมีและ ยาปฏิชีวนะ ซึ่งจะเป็นผลดีต่อสุขภาพผู้บริโภค สิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังเป็นการลดการขาดดุล การค้ากับต่างประเทศอันเนื่องมาจากการนำเข้าสารเคมีและยาปฏิชีวนะ

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ (สัญญาเลขที่ HERB20515/2545) ขอขอบคุณสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำแห่งชาติที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียบางส่วนเพื่อประกอบการศึกษา ขอขอบพระคุณ รศ. ดร.ศิริพร โอโกโนกิ จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัยตลอดโครงการ ขอขอบคุณ Dr. Ralph Cooper ที่ช่วยแก้ไขบทความคัดย่อภาคภาษาอังกฤษ

บรรณานุกรม

- กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. 2546. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ.
2543. เอกสารฉบับที่ 4/2546. กรมประมง 91 หน้า.
- คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2540. สมุนไพรพื้นบ้าน. นันทวัน บุญยะประภัศร
และอรนุช โชคชัยเจริญพร บรรณาธิการ. สำนักพิมพ์ประชาชนจำกัด กทม.
นันทวัน บุญยะประภัศร. 2535. ก้าวไปกับสมุนไพร. โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง.
มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. 217 หน้า.
- นิวุฒิ หวังชัยและสุฤทธิ์ สมบูรณ์ชัย. 2544. เอกสารประกอบการสอนปฏิบัติการวิชา
อาหารปลา พล.403. ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง คณะผลิตกรรมการเกษตร
มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 44 หน้า.
- ไมตรี ดวงสวัสดิ์และจารุวรรณ สมศิริ. 2528. คุณสมบัติของน้ำและวิธีการวิเคราะห์สำหรับ
การวิจัยทางการประมง. กรมประมง กทม. 115 หน้า.
- วิเศษ อัครวิทยากุล. 2536. ปลาตุ๊กบักอูย. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน. กทม.
72 หน้า.
- สถาพร ตีระบุษราคม, สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์และอังคณา หิรัญสาสี. 2539.
ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรแก้ชนิดต่อเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลืองในกุ้ง
กุลาดำ. รายงานสัมมนาวิชาการประจำปี 2539 กรมประมง หน้า 412-414.
- อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2544. ปลาตุ๊ก. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 2.
140 หน้า.
- Angka, S.L., Lam, T.J., and Sin, Y.M. 1995. Some virulence characteristics of
Aeromonas hydrophila in walking catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*
130:103-112.
- Chanarat P, Chanarat N, Fujihara M, Nagumo T. 1997. Immunopharmacological
activity of polysaccharide from the pericarp of mangosteen garcinia:
phagocytic intracellular killing activities. *J Med Assoc Thai* 80 Suppl 1:
S149-154.
- Christofilogiannis, P. 2001. Current inoculation methods in MIC determination.
Aquaculture 196:297-302.
- Colic M, Vucevic D, Kilibarda V, Radicevic N, Savic M. 2002. Modulatory effects of
garlic extracts on proliferation of T-lymphocytes *in vitro* stimulated with
concanavalin A. *Phytomedicine* 9(2):117-124.

- Cuesta, A., M. A. Esteban and J. Meseguer. 2002. Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by vitamin C. *Fish & Shellfish Immunology*. 13(2):97-109.
- Direkbusarakum, S., Y. Ezura, M. Yoshimizu, and A. Herunsalee. 1998. Efficacy of Thai traditional herb extracts against fish and shrimp pathogenic bacteria. *Fish Pathology* 33:431-441.
- Plumb, J.A. 1994. Health maintenance of cultured fishes. CRC Press. 254 p.
- Sahoo, P.K. and S. C. Mukherjee. 2003. Immunomodulation by dietary vitamin C in healthy and aflatoxin B₁-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita*). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 26(1):65-70.
- Schnick, R.A. 2001. International harmonization of antimicrobial sensitivity determination for aquaculture drugs. *Aquaculture* 196:277-288.
- Sobhana, K.S., C. V. Mohan and K. M. Shankar. 2002. Effect of dietary vitamin C on the disease susceptibility and inflammatory response of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) to experimental infection of *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*. 207(3-4):225-238.
- Tsai, P., J. McIntosh, P. Pearce, B. Camden, and B.R. Jordan. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract. *Food Research International*. 35(4):351-356.
- Tseng T.H., T. Kao, C.Y. Chu, F.P. Chou, H.W. Lin Wu, and C.J. Wang. 2000. Induction of apoptosis by *Hibiscus* protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochemical Pharmacology*. 60:307-315.
- Tseng T.H., E.S. Kao, C.Y. Chu, F.P. Chou, H.W. Lin Wu, and C.J. Wang. 1997. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 35(12): 1159-1164.

ภาคผนวก

งบประมาณในการวิจัย

หมวดค่าใช้สอย

ค่าเตรียมสมุนไพรร.....	5,296.50
ค่าจ้างวิเคราะห์.....	7,947.00
ค่าพาหนะในการเดินทางเข้าร่วมแสดงผลงานโปสเตอร์.....	791.00

หมวดค่าวัสดุ

ค่าสัตว์ทดลองและค่าอาหาร.....	1,452.00
ค่าวัสดุเกษตร.....	4,050.00
ค่าวัสดุวิทยาศาสตร์.....	32,323.00
ค่าวัสดุสำนักงาน.....	1,963.00

รวมทั้งสิ้น.....53,822.50

(ห้าหมื่นสามพันสามสิบเอ็ดบาทห้าสิบสตางค์)

สิ่งที่ได้เรียนรู้และข้อเสนอแนะ

จากการที่ได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาเบื้องต้นเพื่อใช้สมุนไพรในการเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคในปลาดุกกอยและปลาช่อน” ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโครงการการสนับสนุนและสร้างเครือข่ายนักวิจัยใหม่ด้านการใช้ประโยชน์สมุนไพรในสัตว์ ได้เกิดการเรียนรู้ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อคณะผู้วิจัย ดังต่อไปนี้

1. ได้รับการฝึกหัดการเขียนโครงการวิจัยและการบริหารโครงการวิจัยขนาดเล็ก
2. ได้รู้จักนักวิจัยที่มีความสนใจเหมือนกัน เพื่อพัฒนาเครือข่ายงานวิจัย
3. สร้างองค์ความรู้ในการพัฒนาและปรับปรุงงานวิจัย ก่อนที่จะนำไปเผยแพร่ให้เกษตรกรหรือภาคเอกชน
4. ได้ทราบปัญหาที่ประสบในการทำวิจัย เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงและพัฒนางานวิจัยระดับลึกต่อไป

ผลงานนี้ส่วนหนึ่งจะนำเสนอสู่สาธารณชนในรูปของโปสเตอร์ในงาน Asian-Pacific Aquaculture 2003 ที่จัดที่กรุงเทพมหานคร ระหว่างวันที่ 22-25 กันยายน 2546

คณะผู้วิจัยขอเสนอว่า ควรมีการให้การสนับสนุนและให้โอกาสแก่นักวิจัยใหม่ต่อไป