สำนักงานหนังสือ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของสารสกัดสมุนไพรต่ออัตราการรอดตายของลูกปลานิลที่ได้รับเชื้อแอร์โรโมแนส ไฮโดรฟิล่า

ดร. ภัทรียา พลซา

คณะเกษตรศาสตร์ ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 05 ส.ค. 2564
เลขทะเบียน 103/1935
เลขเรียกหนังสือ ว QL
120
ภ๓๑๔
๒๕๖๓

สนับสนุนโดย

งบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร หมายเลขโครงการ R2559C103

ชื่อโครงการ การศึกษาผลของอาหารผสมโพลีแซคคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนต่อภูมิคุ้มกันปลานิล
Effect of herbal extract on survival rate of Nile tilapia fingerlings to *Aeromonas hydrophila*

หัวหน้าโครงการ ดร. ภัทรียา พลชา

บทคัดย่อ

สารสำคัญที่อยู่ในพืชสมุนไพรหลายชนิดสามารถนำออกมาใช้ในการรักษาตลอดจนกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำได้โดยการใช้ตัวทำลายหลายชนิด หรือการใช้จุลชีพระหว่างการหมักในการนำเอาสารสำคัญออกมา ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำน้ำหมักจากพืชสมุนไพรสองชนิด ได้แก่ ฟ้าทะลายโจรและลูกยอ ซึ่งเป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่เกษตรกรสามารถหาได้ และมีสารสำคัญที่ทราบกันว่าสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ แอนโดกราโฟไลด์ และสโคโปเลติน เพื่อทดสอบความเป็นไปได้ในการผสมน้ำหมักจากพืชทั้งสองชนิดในอาหารปลาต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยการนำพืชสมุนไพรมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ก่อนจะนำไปผสมกับกากน้ำตาลและน้ำ (รายละเอียดในวิธีการทดลอง) เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นจึงกรองเฉพาะส่วนของเหลวปริมาตร 500 มิลลิลิตร มาผสมกับอาหารเม็ดสำเร็จรูป (โปรตีน 30%) แยกตามชนิดสมุนไพร ก่อนจะนำไปเลี้ยงปลานิลขนาด 3-5 กรัมต่อตัว เป็นเวลา 60 วัน โดยเปรียบเทียบชุดการทดลองที่เป็นอาหารผสมน้ำหมักฟ้าทะลายโจร น้ำหมักลูกยอ กับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปรตีน 30% ชุดการทดลองละสามซ้ำ ซ้ำละ 70 ตัว ทำการสุ่มตัวอย่างปลาเพื่อตรวจสอบด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ปริมาณเม็ดเลือด ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ก่อนและหลังการทดสอบ นอกจากนี้ได้ติดตามการเจริญเติบโต อัตรารอด และคุณภาพน้ำทุกสัปดาห์ หลังจากการทดสอบอาหารแล้ว จึงนำปลาไปทดสอบความต้านทานเชื้อกับแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ความเข้มข้น 3.8 x 10^6 CFU/ตัว โดยฉีดเชื้อเข้าในช่องท้องปลา ทำการติดตามผลเป็นเวลา 14 วัน บันทึกอัตราการตาย ผลการทดลองพบว่าอาหารผสมน้ำหมักจากพืชทั้งสองชนิดไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของปลานิล ปริมาณเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาว ผลของการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อพบว่าปลาที่ได้รับเชื้อแสดงอาการได้แก่ตกเลือดที่ครีบและผิวหนัง และแสดงให้เห็นว่าปลาที่ได้รับน้ำหมักในอาหารมีอัตรารอดที่สูงกว่าปลาในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) สามารถสรุปได้ว่าการเสริมน้ำหมักจากพืชสมุนไพรทั้งสองชนิดในอัตราดังกล่าวไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำและน่าจะส่งผลที่ดีต่อภูมิคุ้มกันด้วย.

คำสำคัญ: น้ำหมักสมุนไพร, อาหารเสริม, ภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ

Abstract

Phytochemicals in herbal plants to be used as cure could be dissolved using variety of solvents or using microbes during fermentation to bring it out. This study used two herbal plants namely Kariyat and Noni. These two plants provide andographolides and scopoletin known to fight against pathogenic bacteria. In order to determine the feasibility of supplementing Kariyat and Noni bioextracts to fish feed for immunity enhancement, these two herbs were shredded into small pieces before fermenting with molasses (mentioned elsewhere) and water for 30 days. Then bioextracts (B.E.) were retrieved by sieving and 500 mL was individually mixed with a kilogram of pelleted feed (30% protein) prior to feeding to tilapia fingerlings size 3-5 grams/fish for 60 days. Experimental groups were feed supplemented with kariyat B.E., noni B.E. compared to control fish fed with 30% protein pelleted feed in triplicates, 70 fish per replicate. Fish were then sampling for checking immunity including blood cell counts, packed red blood cell before and after feeding. Growth, survival rate and water quality were monitored every week. After feed trial, fish were challenged with *Aeromonas hydrophila* at concentration 3.8 x 10^6 CFU/fish by intraperitoneally injection followed by monitoring for 14 days. Mortality

was recorded. Results from feed trial suggested that non-significant difference between treatments (control, feed supplemented with Kariyat B.E. and feed supplemented with Noni B.E.) in terms of growth, blood counts and survival rate. Fish symptoms from challenged test included hemorrhagic fins and skin, and fish fed with B.E. exhibited higher survival rate than the control fish ($P<0.05$). In conclusion, supplementing B.E. from Kariyat and Noni in fish feed regarding this study would be non-harmful to the fish and would possibly enhance immunity.

Keywords: herbal bioextract, feed supplement, aquatic immunity

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
สารบัญ	ค
สารบัญภาพ	ง
สารบัญตาราง	จ

บทที่

1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย.....1

2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....3

3 วิธีดำเนินการวิจัย.....4

4 ผลการวิจัย.....7

5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย..... 12

กิตติกรรมประกาศ.....14

เอกสารอ้างอิง.....15

สารบัญภาพ

ภาพ หน้า

1 การเจริญเติบโตของลูกปลานิลที่ได้รับอาหารทดลอง (A); ความยาวเฉลี่ย (ซม/ตัว) (B) น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม/ตัว) 7
2 อัตรารอดของปลาจากการทดลอง 9
3 อัตรารอดสะสมของปลานิลที่ได้รับเชื้อ Aeromonas hydrophila ในระยะ 14 วันที่ทำการประเมิน Control; กลุ่มควบคุม, Andrographis; อาหารผสมน้ำหมักฟ้าทะลายโจร และ Noni; อาหารผสมน้ำหมักลูกยอ 10
4 การแสดงออกของยีน *TP1-5* และ *Beta-defensin* จากไตของปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักฟ้าทะลายโจร 11
5 การแสดงออกของยีน *TP1-5* และ *Beta-defensin* จากไตของปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักฟ้าทะลายโจร 11

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน 6

2 พารามิเตอร์เลือด ปริมาณเม็ดเลือดขาว (WBC) ปริมาณเม็ดเลือดแดง (RBC) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (HCT) ก่อน (i) และหลังทำการทดลอง (f) 8

บทที่ 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่สำคัญทางเศรษฐกิจเพราะเลี้ยงง่ายโตเร็ว การเพาะเลี้ยงปลานิลส่วนใหญ่แล้วจะเลี้ยงแบบหนาแน่น ซึ่งในการเลี้ยงแบบนี้ปลาจะได้รับอาหารที่ไม่เท่ากันอาจทำให้ขนาดของปลาเล็กใหญ่แตกต่างกัน โดยพบการแพร่กระจายของโรคจะอยู่ในช่วงนำปลามาจากบ่ออนุบาลเพื่อนำมาเลี้ยงต่อให้เป็นปลารุ่นเพราะปลาจะอ่อนแอจากปัจจัยต่างๆเช่น การขนส่ง อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง จึงมีปัจจัยทำให้เกิดโรคได้ง่าย โรคในปลานิลส่วนมากเกิดจากการติดเชื้อ ปรสิต แบคทีเรียและโปรโตซัว โรคจะส่งผลกระทบต่อการกินอาหาร การว่ายน้ำ การหายใจ และกัดกินเนื้อเยื่อบางส่วนของปลาทำให้ปลาตายได้ง่ายในจำนวนมากมักพบการระบาดของโรคในลูกปลาขนาด 3-5 เซนติเมตร การระบาดของโรคทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตเป็นจำนวนมาก

การรักษาโรคในปัจจุบันส่วนมากนิยมใช้ยาปฏิชีวนะที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ร่วมกับวิตามิน หรือสารเคมีหลายชนิด เช่น ด่างทับทิม (Potassium permanganate) ฟอร์มาลิน (Formalin) เป็นต้น แต่ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีที่ใช้เมื่อใช้อย่างต่อเนื่องจะทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาและสะสมในตัวสัตว์น้ำ ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค อีกทั้งยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีที่ใช้ยังมีราคาแพง ด้วยเหตุนี้จึงคิดใช้สมุนไพรต่างๆที่หาง่าย ราคาถูกและมีฤทธิ์สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำได้ซึ่งฟ้าทลายโจรมีสารในกลุ่มLactone ช่วยกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันและลูกยอที่มีสาร Polysaccharides ที่มีสรรพคุณช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน าลดโอกาสในการเกิดโรค โดยนำสมุนไพรทั้งสองชนิดมาสกัดในรูปของน้ำหมักชีวภาพแล้วนำไปเคลือบอาหารให้ปลากิน เพื่อช่วยให้ปลานิลในระยะ 3-5 เซนติเมตร ที่เลี้ยงในระบบหนาแน่นมีความต้านทานโรคต่ำให้มีความแข็งแรงพอที่ต้านทานเชื้อโรคได้ จึงมีความสนใจทำการทดลองโดยใช้สารสกัดจากสมุนไพร ได้แก่ ลูกยอและฟ้าทะลายโจร มาผสมอาหารให้ลูกปลานิล เพื่อให้เกิดภูมิต้านทานต่อโรคจากเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* โดยประเมินจากอัตรารอดตายหลังจากการฉีดเชื้อ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และปริมาณเม็ดเลือด

1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อประเมินคุณสมบัติของสารสกัดจากสมุนไพรที่สามารถกระตุ้นในลูกปลานิลเกิดการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย

1.2 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สมุนไพรฟ้าทลายโจรและลูกยอมีสารกลุ่ม Lactone ซึ่งช่วยกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน โดยส่งผลต่อปริมาณเม็ดเลือด ยีนที่มีบทบาทในการลดอนุมูลอิสระซึ่งจะทำให้สัตว์ทดลองเกิดภาวะไม่สมดุล จึงน่าจะส่งผลให้ลดอัตราการติดเชื้อได้ และน่าจะลดอัตราการตายของลูกปลานิลขนาด 5-7 เซนติเมตร ได้

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาอิทธิพลของน้ำหมักสมุนไพร 2 ชนิดต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดโดยการใช้น้ำหมักฟ้าทลายโจร น้ำหมักลูกยอแก่ ผสมกับอาหารเม็ดในอัตราส่วน อาหาร 1 กิโลกรัม ต่อ น้ำหมัก 500 มิลลิลิตร (วุฒิชัย และคณะ, 2551) ให้ปลานิลกิน 3 ครั้งต่อวัน เวลา 8.00 น. 12.00 น. และ 16.00 น. ในถังไฟเบอร์ ขนาด 280 ลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วจึงสุ่ม

ตัวอย่างตรวจค่าโลหิตวิทยา คือ ปริมาณเม็ดเลือดแดง ปริมาณขาว และปรสิตภายนอก จากนั้นจึงทำการฉีดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* เข้าบริเวณช่องท้องของลูกปลานิล และนับจำนวนตัวตายตลอดระยะเวลา 14 วัน

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โรคสัตว์น้ำเกิดจากปัจจัยสำคัญสามสาเหตุคือ เชื้อก่อโรค สิ่งแวดล้อม และสุขภาพสัตว์น้ำ ซึ่งทั้งสามปัจจัยนี้มีความสัมพันธ์กันอย่างมาก เมื่อเกิดการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรคเนื่องด้วยสาเหตุต่าง ๆ เช่น การเกิดมลพิษในแหล่งน้ำ หรือความเป็นอยู่ของสัตว์ที่หนาแน่นจนเกินไป ก็จะส่งผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ทำให้เกิดโรค ในการเพาะเลี้ยงปลานิลเชิงพานิชย์ มีการเลี้ยงแบบหนาแน่น และให้อาหารเป็นจำนวนมาก (ประไพสิริ, 2546) ในสภาพการเลี้ยงแบบนี้ พบได้ทั้งในระบบกระชัง และบ่อดิน มักส่งผลให้ปลาเกิดโรคได้ง่าย โรคต่าง ๆ ที่พบได้แก่ โรคปรสิตภายนอก และโรคจากเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก เกษตรกรจึงต้องใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะ ในการควบคุมและรักษาโรค สารเคมีบางชนิดส่งผลต่อผู้ใช้ด้วย เช่น มาลาไคท์ กรีน ก่อให้เกิดมะเร็ง ส่วนยาปฏิชีวนะเมื่อใช้เป็นเวลานาน ๆ ก็จะเกิดปัญหาการดื้อยา ตลอดจนอนุพันธ์ของยานั้นเมื่อผ่านการย่อยแล้วอาจตกค้างในเนื้อปลาที่ใช้บริโภคได้ ปัจจุบันจึงมีผู้พยายามคิดหาวิธีที่จะควบคุมหรือป้องกันสัตว์น้ำจากโรคโดยจำกัดการใช้ยาและสารเคมีให้ได้มากที่สุด (Defoirdt et al., 2011)

นอกจากการจัดการกับเชื้อก่อโรค สิ่งแวดล้อมแล้ว การเร่งให้ปลามีภูมิคุ้มกันต่อโรคนับว่าเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความสนใจอย่างต่อเนื่อง การให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันกับปลาโดยที่ไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค เป็นเป้าหมายสำคัญในควบคุมและป้องกันโรค ตลอดจนสามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคในปัจจุบันที่สนใจอาหารเพื่อสุขภาพมากขึ้น (Harikrishnan et al., 2011) เนื่องจากในประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์ด้วยพืชเมืองร้อนหลายชนิดที่ใช้เป็นยารักษาโรคในมนุษย์ และงานวิจัยหลายชิ้นที่ได้มีการวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ที่สกัดจากสมุนไพร เช่น Eugenol จากน้ำมันกระเทียม Terpenoids จาก tea-tree oil (Tajkarimi et al., 2010) Andrographolides จากฟ้าทะลายโจร มีรายงานว่าสามารถสร้างภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะขึ้นในหนูได้ เป็นต้น สารออกฤทธิ์เหล่านี้สามารถต้านจุลชีพ (anti-microbial) ได้ด้วย โดยเมื่ออยู่ในธรรมชาติก็มักพบว่าเป็นสารที่หลั่งออกมาจากพืชเพื่อยับยั้งการติดเชื้อ เช่น การเกิด Gall ในพืชบางชนิดที่เกิดบาดแผล พบว่ามีสารแทนนินอยู่เป็นจำนวนมาก (วิภา และชิดชม, 2539)

สมุนไพรเหล่านี้ สามารถสกัดได้หลายวิธีเช่น การหมักกับจุลินทรีย์อีเอ็ม (อิทธิวัฒน์, 2555) เพื่อให้จุลินทรีย์ทำการย่อยสลายให้สารเหล่านี้ออกมา หรือการสกัดด้วยเมธานอล (ภัทราภรณ์ และปวีณา, 2554) ประสิทธิภาพของสารสกัดขึ้นอยู่กับความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำ เช่น *Vibrio harveyi, Vibrio parahaemolyticus, Aeromonas hydrophila, Psuedomonas sp., Streptococcus sp.* เป็นต้น โดยการบ่มเชื้อและสารสกัดไปพร้อมกันใน agar plate แล้วประเมินการเจริญเติบโตของเชื้อ (Direkbusarakom et al., 1998)

ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในสัตว์ทดลอง ส่วนใหญ่แล้วจะผสมสารสกัดให้สัตว์น้ำกินเป็นระยะเวลาหนึ่ง แล้วจึงทำการทดสอบภูมิคุ้มกันของปลา โดยประเมินจากพารามิเตอร์ต่าง ๆ เช่น ค่าโลหิตวิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว ค่าฮีมาโตคริต (Harikrishnan et al., 2010) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบความทนได้ต่อเชื้อก่อโรคด้วยการฉีดเชื้อก่อโรค ในปลามักจะใช้ *Aeromonas hydrophila* จากนั้นสังเกตพฤติกรรมและบันทึกอัตราการรอดชีวิต ที่ระยะเวลาต่าง ๆ หลังการฉีดเชื้อ (อัจฉรี เรืองเดช และคณะ, 2553: Harikrishnan et al., 2003)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ทำการทดลองที่โรงเพาะฟักสาขาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร วิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ ปลา เชื้อก่อโรค ที่ห้องปฏิบัติการสาขาวิทยาศาสตร์การประมง สำหรับการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์จะส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ การวิเคราะห์ทางอณูพันธุศาสตร์จะทำการวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพพืช ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร

3.2 การเตรียมปลานิลสำหรับทดลอง

ลูกปลานิลแปลงเพศขนาด 5-7 เซนติเมตร จากฟาร์มเกษตรกร จำนวน 400 ตัว นำลูกปลามาทำการปรับสภาพในโรงเพาะฟักก่อนการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในบ่อพลาสติกขนาด 500 ลิตร และให้อากาศตลอดเวลา ลูกปลาทดลองจะได้รับอาหารวันละสองครั้ง เช้า-เย็น โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป 3% ของน้ำหนักตัว เปลี่ยนถ่ายน้ำสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ตลอดการทดลอง

3.3 การเตรียมอาหารทดลอง

เตรียมอาหารทดลองจำนวน 3 สูตร ใช้อาหารปลากินพืชเพื่อผสมกับน้ำหมักให้ได้สูตรอาหารต่าง ๆ ดังนี้

สูตร 1 คือ อาหารเม็ด ผสม น้ำหมักฟ้าทลายโจร

สูตร 2 คือ อาหารเม็ด ผสม น้ำหมักลูกยอแก่

สูตร 3 คือ อาหารเม็ด

นำสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด มาหั่นหยาบชนิดละ 3 กิโลกรัม ใส่ในถังหมัก ขนาด 15 ลิตร จากนั้นจึงเติมกากน้ำตาล 1 กิโลกรัม และเติมน้ำเปล่า 10 ลิตร คลุกเคล้าส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปิดฝาถังหมักให้มีช่องระบายอากาศเพื่อป้องกันการเกิดแก๊ส เก็บไว้ในที่ร่ม ทำการหมักเป็นเวลา 28 วัน แล้วนำน้ำหมักมากรองและบรรจุใส่ขวดปิดฝาเก็บในที่ร่ม

นำอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำสำหรับปลากินพืช ผสมกับน้ำหมักในอัตราส่วน 500 มิลลิลิตร ต่อ อาหาร 1 กิโลกรัม คลุกเคล้าให้ผสมเข้าด้วยกัน ก่อนนำไปผึ่งลม ปล่อยให้อาหารแห้ง แล้วบรรจุอาหารใส่ถุงเก็บในที่ร่ม

3.4 การเปรียบเทียบความสามารถในการต่อต้านเชื้อ ตามวิธีการของ อัจฉรี และคณะ (2553)

3.5 การเก็บเลือดและวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือด

ทำการเก็บเลือดปลาด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร โดยทำการสลบปลาด้วยน้ำมันกานพลูก่อนเก็บตัวอย่างเลือด จากนั้นนำเลือดมาวิเคราะห์จำนวนเม็ดเลือด ตามวิธีการของ อัจฉรี และคณะ (2553) โดยการสุ่มตัวอย่างก่อนการทดลอง และเมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง

สุ่มปลาจากทุกชุดการทดลองๆ ละ 3 ตัว มาเจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณใต้แนวกระดูกสันหลัง (caudal vein) โดยทำการสลบปลาด้วยน้ำมันกานพลู แล้วใช้ผ้าชุบน้ำสะอาดในการปกคลุมตัวปลา สำหรับการนับปริมาณและชนิดของเม็ดเลือดจะใช้เข็มขนาด 24 g ร่วมกับกระบอกฉีดยาขนาด 1 ml ที่เคลือบด้วยสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยาได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดง (Total red blood cells), ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit values) (Ibrahem et al., 2010), ปริมาณเม็ดเลือดขาว (Total white blood cells) และอัตราส่วนชนิดของเม็ดเลือดขาว

วิธีการนับจำนวนเม็ดเลือดโดยทั่วไป เริ่มจากการเจือจางเม็ดเลือด (diluting of blood) โดยใช้น้ำยาเจือจางชนิดที่เหมาะสมกับเม็ดเลือดชนิดนั้น ๆ อัตราส่วนของเลือดกับน้ำยาเจือจาง (Sampling into measure volume) โดย ทั่วไปอัตราส่วนการเจือจางของเม็ดเลือดขาว มีค่า 1 : 20 และเม็ดเลือดแดงมีค่า 1 : 200 ใช้อุปกรณ์ที่สามารถวัดปริมาตรของอัตราเจือจางได้แม่นยำ และการนับจำนวนเม็ดเลือดในปริมาตรที่แน่นอน (counting in standard volumn) โดยนิยมใช้ Neubauer ซึ่งมีตาราง 9 ช่อง แต่ละช่องมีพื้นที่ 1 x 1 mm^2 และ chamber มีความลึก 0.1 มิลลิลิตร และนับจำนวนเม็ดเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ (บุญศรี มหากิตติคุณ, มป.ป.)

3.6 การประเมินอัตราการแสดงออกของยีน

สกัดสารพันธุกรรม total RNA จากตัวอย่างกล้ามเนื้อ ตับ ไต และม้าม ของปลาทดลอง จำนวน 3 ตัว ต่อหนึ่งหน่วยการทดลอง จากนั้นจึงสังเคราะห์เป็น cDNA ด้วย first-strand cDNA synthesis kit (Promega)

ทำการสุ่มปลา 3 ตัวต่อหนึ่งหน่วยทดลองเพื่อทำการจำแนกอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ กล้ามเนื้อ ไต ม้าม และตับ ทำการบดตัวอย่างปริมาณ 0.1 กรัม ต่อ TRIzol ® 1 ml เพื่อสกัด total RNA ตามวิธีที่ระบุมากับผลิตภัณฑ์ หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดย DNase I (Worthington Biomedical Cooperation) ตามวิธีที่ระบุมากับผลิตภัณฑ์ แล้วจึงทำการสร้างสาย cDNA จากต้นแบบจาก RNA ที่สกัดได้ โดยใช้เอนไซม์ Reversed transcriptase (Impromp II Reversed Transcription kit ®, Promega) ตามวิธีที่ระบุมากับผลิตภัณฑ์ แล้วทดสอบไพรเมอร์ของยีนเป้าหมายและยีนเจ้าบ้าน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมกับการทำปฏิกิริยา โดยเทคนิค PCR

ไพรเมอร์สำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และยีนควบคุม ดังแสดงในตาราง ได้สังเคราะห์ขึ้นโดยบริษัท Pacific Science ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 100 µM ทำการคัดแยกยีนที่สนใจโดยกระบวนการ PCR จากตัวอย่าง cDNA จากตับของปลานิล ปริมาณ 100 ไมโครกรัม โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังนี้ 1x Buffer A, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 µM Forward primer, 0.2 µM Reverse primer, 0.2 mM dNTPs, Taq Polymerase 1 unitและ 1st Strand cDNA 100 ไมโครกรัม หลังจากใช้ปิเปตผสมจนเข้ากันดีแล้ว จึงนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermo Cycler (Roche Diagnostic) โดยมีรอบปฏิกิริยาดังนี้ Predenature 94 °C 5 นาที Denature 94 °C 2 นาที Annealing 55-60 °C 30 วินาที Extension 72°C 5 นาที และ Final extension 72 °C 7 นาที ก่อนจะเก็บในอุณหภูมิ 4 °C สำหรับการเก็บที่ยาวนานขึ้นได้เก็บที่ -20 °C นำผลของ PCR ที่ได้ไปตรวจสอบบน 1.5% Agarose gel โดยวิธีการ Electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นำไปตัดเจล ทำการละลายตัวอย่างออกมาจากเจลโดยใช้

Gel Extraction Kit (Pacific Science) และส่งตัวอย่างเพื่อทำการหาลำดับของยีน ซึ่งเป็นขั้นตอนในการยืนยันการทำงานของไพรเมอร์

ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกันระบบภูมิคุ้มกันโดยเทียบกันระดับการแสดงออกของยีนเจ้าบ้าน โดยใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายดีเอ็นเอที่จำเพาะ ตรวจวัดปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นตามสภาพจริง ณ เวลาที่แท้จริง การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์จะทำเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาการเพิ่มขยาย โดยใช้หลักการเกิดสัญญาณการเรืองแสงที่ตรวจวัดได้ ในการทดลองนี้จะใช้คุณสมบัติเกาะติดกับดีเอ็นเอสายคู่ (DNA binding dye) คือสี SYBR Green I มีคุณสมบัติเป็นสีเรืองแสงที่สามารถเข้าจับกับ Minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสมจะมีการคลายพลังงาน (emission) ในรูปของแสง สามารถตรวจจับได้ด้วยตัวรับสัญญาณแสงที่ติดอยู่ภายในเครื่องเรียลไทม์พีซีอาร์ ในขั้นตอนของ annealing และ extension (วีระพงษ์, 2557) จากนั้นจึงประเมินปริมาณการแสดงออกยีนดังกล่าวในตัวอย่างด้วยวิธี quantitative PCR ในเครื่อง MyGO® (iScience)โดยใช้ SYBR Green Master Mixture (iScience) ตามวิธีที่ระบุมากับผลิตภัณฑ์

ตาราง 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน

Primer name	Sequences (5'-3')
Onβ-defensin-F1	TTCGCATTGTGTCCTCTGCT
Onβ-defensin-R1	CAAGTTAACACAAGACG
OnEF1a-F1	TTTCGAGGAAATCACCAAGG
OnEF1a-R1	CTTGTCACTGGTCTCCAGCA
TP1-F*	ATGAAGTCTGCTGTGATCTTTCTTGTGC
TP1-R*	CTAGTCAAATTCCCGTTGACGCA
TP2-F*	CTAGTCAAAATTAAGTCGACGAGGGT
TP2-R*	ATGAAGTGTGCTGCAGTATTTCTTATGCTGTCC
TP3-F*	ATGAAGTGCACCATGCTGTTCCTTGTGCTGTCGATGGTT
TP3-R*	CTAGTTAAAAGCAGCCCTTTCCC
TP4-F*	ATGAAGTGCACTATACTGTTCCTTGTGCTGTCGATGGTG
TP4-R*	CTAGTTAAAAGCAACTCTCTCTCGTTTG
TP5-F*	ATGAAGTCTGCCATAATCTTTCTTGTAT
TP5-R*	CTATGACATCACAGCATCTTCAAATTC
On18s-F1	CCTGAGAAACGGCTACCACAT
On18s-R1	CAGACTTGCCCTCCAATGGAT
OnAct-F1	CTGTCCACCTTCCAGCAGAT
onAct-R1	ATGTATGCCGAGCCAGTTGT
OnAct-R2	TGTGTGGTGTGTGGTTGTTTTG

ที่มา: *Peng et al. (2012)

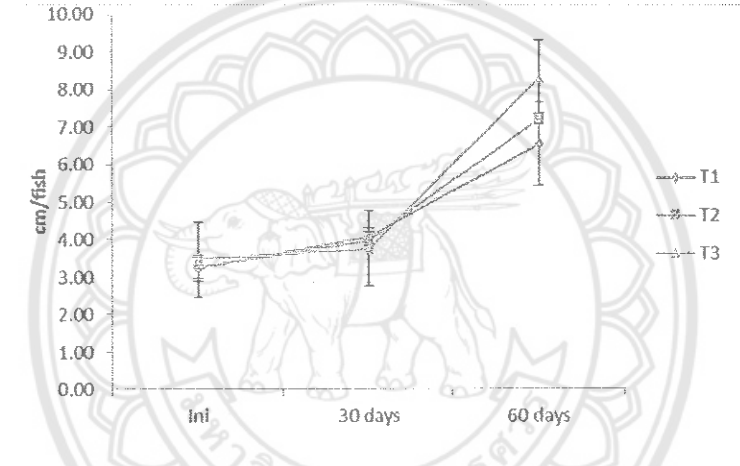
7
0 5 ส.ค. 2564
103/1435

บทที่ 4

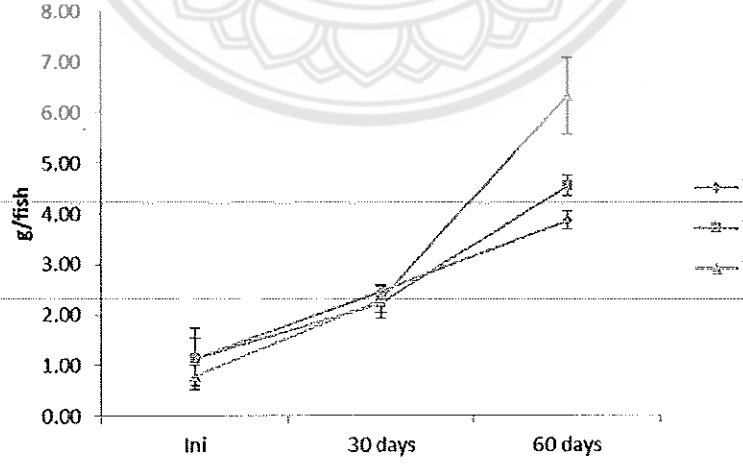
ผลการทดลอง

4.1 การเจริญเติบโตของลูกปลานิลที่ได้รับอาหารสามสูตร

การเจริญเติบโตของปลาที่เลี้ยงด้วยน้ำหมักชีวภาพไม่มีผลกระทบทางลบ แสดงให้เห็นในการทดลองนี้ว่า น้ำหมักชีวภาพทั้งสองอาจจะเพิ่มผลผลิตปลา (กรัม/ตัว) ในตอนท้ายของการทดลอง (60 วัน) ภาพ 1 แสดงการเจริญเติบโตของปลาในหน่วยเซนติเมตร/ตัว และกรัม/ตัว ส่วนสกัดจากลูกยอ (T3) มีน้ำหนักและความยาวสูงสุด จากผลการทดลองพบว่าในสามสิบวันแรกอัตราการเจริญเติบโตทั้งด้านความยาวและน้ำหนักของทั้งสามชุดการทดลองไม่แตกต่างกัน เมื่อครบ 60 วัน พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



(A)



(B)

ภาพ 1 การเจริญเติบโตของลูกปลานิลที่ได้รับอาหารทดลอง (A); ความยาวเฉลี่ย (ซม/ตัว) (B) น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม/ตัว)

4.2 สุขภาพปลา

ปริมาณเม็ดเลือดของลูกปลานิลเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลา โดยพบว่าเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลองอาหาร ปริมาณเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นสูงสุดในปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักลูกยอ เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วพบว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ดังตาราง 1

ปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลาในกลุ่มควบคุมเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย สำหรับปริมาณเม็ดเลือดขาวในลูกปลานิลที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักฟ้าทะลายโจร พบว่ามีค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดขาวต่ำลงเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่ลูกปลานิลที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักลูกยอมีปริมาณเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นมาก เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วพบว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ (P>0.05) ดังตาราง 1

ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักฟ้าทะลายโจร มีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น 22% สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักลูกยอ (20%) เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วพบว่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ดังตาราง 1

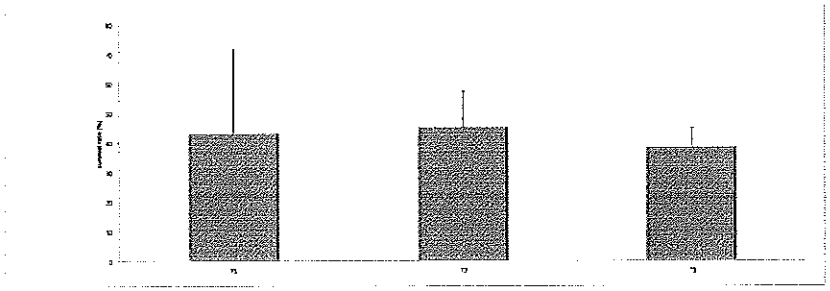
ตาราง 2 พารามิเตอร์เลือด ปริมาณเม็ดเลือดขาว (WBC) ปริมาณเม็ดเลือดแดง (RBC) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (HCT) ก่อน (i) และหลังทำการทดลอง (f)

Treatment	WBCi ($cell/mm^3$)	RBCi ($cell/mm^3$)	HCTi (%)	WBCf ($cell/mm^3$)	RBCf ($cell/mm^3$)	HCTf (%)
Control	54,194	1,742,000	14	59,000	2,022,333	22
Kariyat B.E.	71,472	1,735,000	16	48,000	1,963,667	22
Noni B.E.	67,568	1,693,000	16	102,750	2,389,667	20
P-value	0.3308	0.9887	0.5049	0.1418	0.2791	0.5106

ค่าของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีค่าเฉลี่ย 20-22% (P>0.05) โดยรวมแล้วมีค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเล็กน้อย

4.3. อัตรารอด

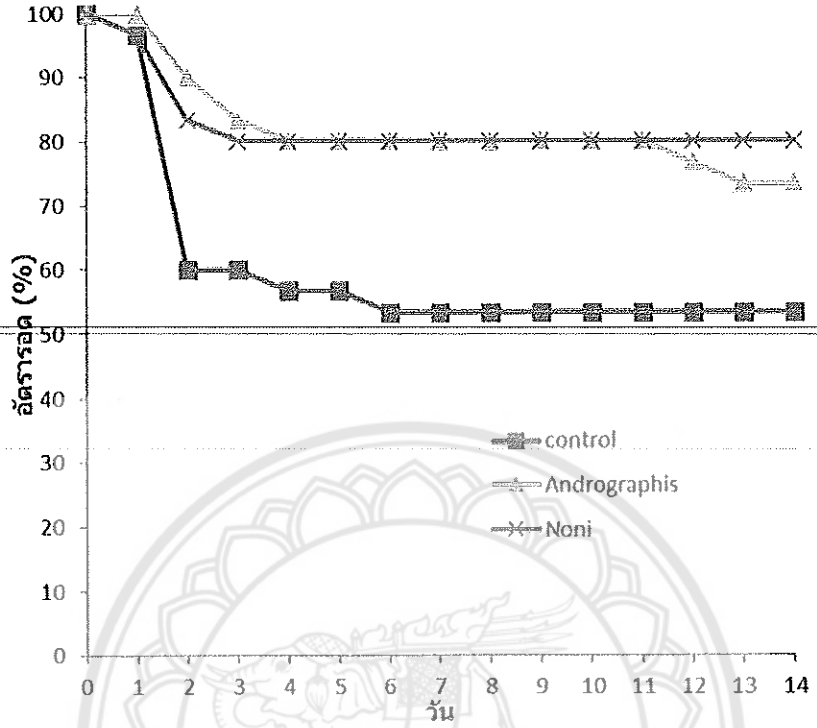
ลูกปลานิลที่ได้นำมาศึกษานี้ เบื้องต้นมีสุขภาพแข็งแรง หลังจากการปรับสภาพปลาให้คุ้นเคยกับโรงเพาะฟักแล้ว จึงนำปลาลงหน่วยทดลอง โดยมีการสุ่มชั่งน้ำหนักและวัดความยาวเริ่มต้น พบว่าขณะทำการทดลองปลาถูกรบกวนโดยตัวห้ำ จึงทำให้อัตราการตายของปลาทุกชุดการทดลองลดลงมาก ดังแสดงในภาพ 2



ภาพ 2 อัตรารอดของปลาจากการทดลอง T1; กลุ่มควบคุม T2; อาหารผสมน้ำหมักฟ้าทะลายโจร T3; อาหารผสมน้ำหมักลูกยอ

4.4 ผลการทดสอบด้วยเชื้อ

เมื่อครบ 60 วันในการให้อาหารผสมน้ำหมักสมุนไพร จึงนำปลานิลมาฉีดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* เข้าทางช่องท้อง แล้วบันทึกการตายในช่วง 14 วัน พบว่าปลานิลทุกชุดการทดลองเริ่มมีการตายในวันแรก เมื่อครบสามวันพบว่าปลานิลในกลุ่มควบคุมมีการตายมากที่สุด ลักษณะการตายของปลานิลพบว่ามีการตกเลือดบริเวณ operculum, ครีบหลัง ครีบหู และครีบหาง รวมถึงรอยเข็มที่ฉีดเชื้อ บางตัวมีลักษณะเกล็ดหลุด และตกเลือดตามซอกเกล็ด จากผลการบันทึกอัตราการตายพบว่า ปลานิลเริ่มตายตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกของการทดลอง (ภาพ 3) ในกลุ่มควบคุมมีการตายสะสมเพิ่มมากขึ้นในวันที่ 2 แล้วตายเพิ่มขึ้นเล็กน้อย จนกระทั่งหยุดตายในวันที่ 5 สำหรับปลาที่ได้รับน้ำหมักฟ้าทะลายโจรและน้ำหมักลูกยอมีการตายสะสมต่างกันเล็กน้อย แล้วหยุดตายในวันที่ 4 ปลาที่ได้รับน้ำหมักฟ้าทะลายโจร (ภาพ 3 Andrographis) ตายเพิ่มขึ้นในวันที่ 12-13 เป็นผลให้อัตราการตายของชุดการทดลองต่าง ๆ เป็นดัง ภาพ 3 โดยอัตราการตายสูงสุดในกลุ่มควบคุม และมีอัตราการตาย 16-20% ในปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักสมุนไพร

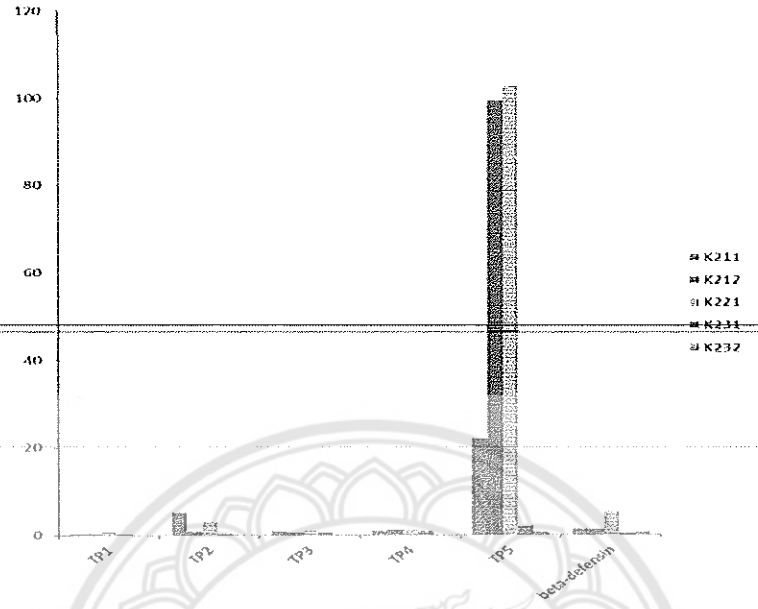


ภาพ 3 อัตรารอดสะสมของปลานิลที่ได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในระยะ 14 วันที่ทำการประเมิน Control; กลุ่มควบคุม, *Andrographis*; อาหารผสมน้ำหมักฟ้าทะลายโจร และ Noni; อาหารผสมน้ำหมักลูกยอ

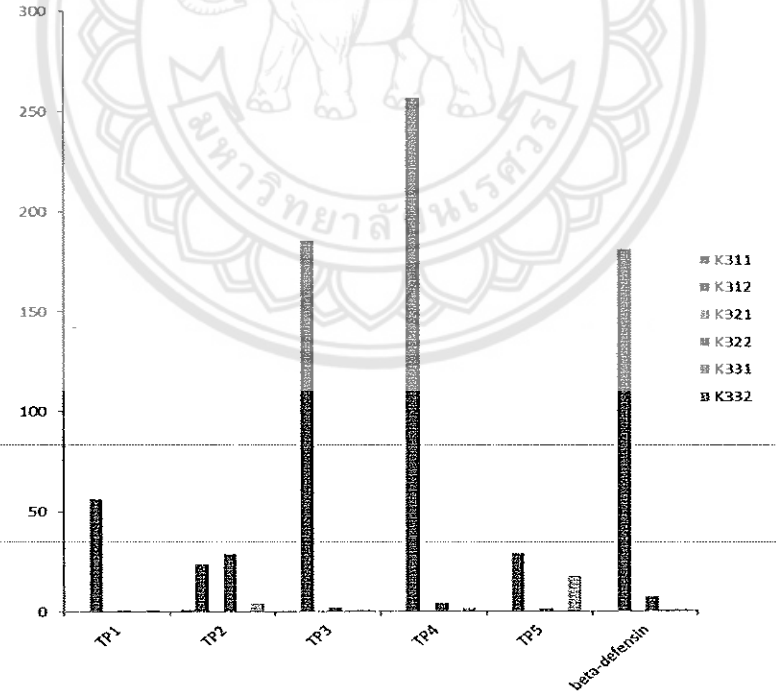
4.4 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันก่อนทำการ Challenge ด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila*

ยีนในกลุ่ม Tilapia Pistidin (*TP*) ได้แก่ *TP1-5* รวมถึง Beta defensin ถูกนำมาทดสอบในตัวอย่าง cDNA จากไตของปลานิลที่ได้รับอาหารเม็ดปกติ อาหารเม็ดผสมน้ำหมักฟ้าทะลายโจร และอาหารเม็ดผสมน้ำหมักลูกยอ การแสดงออกของยีนกลุ่มนี้ไม่มีแบบแผนที่แน่นอน ในการแสดงออกของยีนจากไตของปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักฟ้าทะลายโจรพบว่า *TP5* มีการแสดงออกสูงที่สุด (20-100 เท่าของปลาที่ได้รับอาหารปกติ) โดยพบความถี่จากปลาที่ทำการทดสอบ จำนวน 3 ใน 5 ตัว (K211, 212, 231, 232) ยีน *TP2* สำหรับยีน *Beta Defensin* พบว่ามีการแสดงออกของยีนนี้สูงสุด (5 เท่า) จากปลาเพียงตัวเดียว

การแสดงออกของยีนกลุ่ม *TP* จากไตของปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักฟ้าทะลายโจร พบว่ามีปลาเพียงตัวเดียว จากทั้งหมด 6 ตัว ตอบสนองด้านยีน *TP1*-5 รวมทั้ง Beta Defensin ด้วย ขณะที่ตัวอื่น ๆ พบว่ามีการแสดงออกบ้าง แต่ไม่เป็นแบบแผนแต่อย่างใด



ภาพ 4 การแสดงออกของยีน TP1-5 และ Beta-defensin จากไตของปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักฟ้าทะลายโจร



ภาพ 5 การแสดงออกของยีน *TP1-5* และ *Beta-defensin* จากไตของปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักฟ้าทะลายโจร

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

น้ำหมักสมุนไพรทั้งสองชนิด สามารถนำมาผสมอาหารเม็ดให้ลูกปลานิลขนาด 1 นิ้ว กินเป็นอาหารเพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน โดยในการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าปลาที่ได้รับน้ำหมัก มีการเจริญเติบโต และอัตรารอด ไม่ต่างกับชุดควบคุม สำหรับปัจจัยการเจริญเติบโตทางด้านน้ำหนักไม่แตกต่างกัน แต่ในด้านความยาวพบว่าปลาที่ได้รับน้ำหมักลูกยอมีขนาดตัวยาวกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) อย่างไรก็ตาม ปัจจัยความหนาแน่นมีผลต่อการเจริญเติบโต ในชุดการทดลองน้ำหมักลูกยอผสมอาหารมีอัตรารอดเฉลี่ยต่ำกว่าชุดอื่น ๆ จึงอาจเป็นไปได้ว่า ปัจจัยนี้ส่งผลต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ย และความยาวเฉลี่ยสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ในระหว่างการดำเนินงานพบว่ามีการรบกวนจากสัตว์เลี้อยคลาน ได้แก่ ตัวเงินตัวทอง ที่เข้ามาบุกรุก 1 ครั้ง และทำให้ปลาทดลองตาย

5.1 การเจริญเติบโต

อาหารเคลือบด้วยน้ำหมักสมุนไพรทั้งสองชนิดไม่ทำให้การเจริญเติบโตของลูกปลานิลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในระยะ 30 วันแรกของการทดสอบ แต่ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักปลา (กรัม/ตัว) เมื่อสิ้นสุดการทดลองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักลูกยอมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักปลา สูงที่สุด รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักฟ้าทะลายโจร จากงานวิจัยของ Panjanont *et al.* (2005) รายงานว่าในกระบวนการหมักสมุนไพรสี่ชนิด ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร เหงือกปลาหมอ ผลยอแก่ และเสลดพังพอน ทำให้เกิดการพลาสโมไลซิส (plasmolysis) คือสารละลายภายในเซลล์พืชที่ประกอบด้วยสารอินทรีย์ต่าง ๆ ไหลออกมาจากเซลล์ จุลินทรีย์ในการหมักจะช่วยสลายธาตุอาหารต่าง ๆ จะถูกปลดปล่อยออกมา เช่น โปรตีน กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง ฮอร์โมนควบคุมการเจริญเติบโต วิตามิน และนอกจากนี้สารสโคโปเลตินในผลยอก็ถูกสกัดออกมาเช่นเดียวกัน ด้วยเหตุนี้ จึงเป็นไปได้ว่าอัตราการเจริญเติบโตของปลาที่ได้รับน้ำหมักสมุนไพรทั้งสองชนิดในระยะ 60 วันที่ทดสอบนั้นมีความแตกต่างกันกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

5.2 ผลการประเมินทางโลหิตวิทยาของลูกปลานิล

ปริมาณเม็ดเลือดของลูกปลานิลเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลา โดยพบว่าเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลองอาหารปริมาณเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นสูงสุดในปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักลูกยอ เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วพบว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลาในกลุ่มควบคุมเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย สำหรับปริมาณเม็ดเลือดขาวในลูกปลานิลที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักฟ้าทะลายโจร พบว่ามีค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดขาวต่ำลงเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่ลูกปลานิลที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักลูกยอมีปริมาณเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นมาก เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วพบว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักฟ้าทะลายโจร มีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น 22% สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักลูกยอ (20%) เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วพบว่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ปริมาณเม็ดเลือดทั้งเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เนื่องจากค่าเม็ดเลือดมีความแปรปรวนมาก จึงไม่พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เพราะเทคนิคในการนับเม็ดเลือดมีความละเอียด และจำเป็นต้องมีการทดสอบเพิ่มเติม นอกจากนี้การรบกวนของสัตว์อื่นอาจส่งผลต่อค่าเลือดเป็นอย่างมากอีกด้วย

5.3 การแสดงออกของยีน

เนื่องจากความจำกัดทางด้านเทคนิค และงบประมาณ ทำให้สามารถทดสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน จำนวน 6 ยีน (TP1-5 และ Beta-defensin) ในไตเพียงอย่างเดียว ในส่วนของการแสดงออกของยีนนี้ เห็นได้ว่าไม่มีรูปแบบที่แน่ชัด และมีเพียง TP5 ที่มีแนวโน้มตอบสนองต่ออาหารผสมน้ำหมักฟ้าทะลายโจรที่ปลาได้รับตลอด 60 วัน การทดสอบในเชิงลึกดังกล่าว ยังคงต้องดำเนินการทดสอบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน (tissue expression) การโคลนนิ่งเพื่อยืนยันลำดับเบสของยีน เป็นต้น จึงจะสามารถหาข้อสรุปได้ ยีน TP เป็นกลุ่มของ Antimicrobial peptide จากรายงานของ

5.4 การทดสอบความต้านทานเชื้อ (Challenge test)

ปลาที่ได้รับเชื้อก่อโรคเริ่มตายตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรก และพบว่ามีการตายสูงสุดภายหลังการฉีดเชื้อ 48 ชั่วโมง ปลาที่ตายพบว่ามีการตกเลือดบริเวณครีบหู ครีบท้อง ครีบหลัง ปลาหาง และแผ่นปิดเหงือก ปลาในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักสมุนไพรมีอัตราการตายมากที่สุด และภายหลังจากการฉีดเชื้อแล้ว 14 วัน พบว่าปลาในกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสูงที่สุด รองลงมาคือปลาที่ได้รับน้ำหมักฟ้าทะลายโจร และน้ำหมักลูกยอ ตามลำดับ (ภาพ 2) เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ผลยอมีสารประกอบสำคัญหลายประการ ซีเรโทนิน อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ และสารสำคัญอื่นๆ โดยเฉพาะสารสโคโปเลตินซึ่งเป็นสารในกลุ่มคูมาริน มีฤทธิ์คล้ายกับอัลคาลอยด์ ในการสกัดเพื่อให้ได้สารสโคโปเลตินจากผลยอมีวิธีการหลายวิธีคือ น้ำลูกยอสด โดยการนำลูกยอสดมาฝานเป็นชิ้นแล้วต้มในน้ำเดือด จะได้สารสโคโปเลติน 3,653 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำลูกยอหมัก คือการหมักลูกยอด้วยน้ำตาลและน้ำ จะได้สโคโปเลติน 4,441 มิลลิกรัมต่อลิตร (Udomwongsap, 2005; Chaiyasut, 2000) สโคโปเลตินเป็นสารต้านการอักเสบและกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ในการหมักลูกยอจะได้สารสโคโปเลตินออกมามาก จึงอาจเป็นเหตุให้ลูกปลานิลที่ได้รับเชื้อก่อโรคสามารถต้านทานเชื้อได้สูงกว่าชุดควบคุม

สำหรับสารประกอบที่สำคัญในฟ้าทะลายโจรคือ สารแอนโดรกราโฟไลด์ สารชนิดนี้สามารถต้านการอักเสบและกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ Basha *et al.* (2013) ได้ผสมแอนโดรกราโฟไลด์ในอาหารสำหรับปลายี่สกเทศ *Labeo rohita* แล้วทดสอบกับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* พบว่าปลาสามารถต้านทานเชื้อได้ พบว่าสารชนิดนี้กระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลา Tonediew *et al.* (1997) รายงานว่า การเสริมฟ้าทะลายโจร 10% กับ 0.25% astaxanthin ลงในอาหารปลาทองพบว่าเมื่อให้อาหารทดลองระยะเวลา 4 สัปดาห์ เม็ดเลือดขาวของปลาทองมีเปอร์เซนต์ในการจับกินของเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และสรุปว่าฟ้าทะลายโจรส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเม็ดเลือดขาว ผลของสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรต่อปริมาณเม็ดเลือดขาวในการทดลองของRoongkamnertwongsa and Roongkamnertwongsa (n.d.) พบว่ามี

ปริมาณเม็ดเลือดขาวลดลงในสัปดาห์ที่ 6 ซึ่งผลจากการทดลองนี้คล้ายคลึงกันเนื่องจากปลาที่ได้รับน้ำหมักฟ้าทะลายโจรเมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 ก็พบว่ามีปริมาณเม็ดเลือดขาวลดลงเช่นกัน อย่างไรก็ตามปริมาณเม็ดเลือดขาวที่ลดลงนี้อาจไม่ส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกัน เนื่องจากอัตราการตายหลังการทดสอบด้วยเชื้อก่อโรคยังคงต่ำกว่าชุดควบคุม นอกจากนี้ปริมาณเม็ดเลือดแดงไม่ได้เปลี่ยนแปลงมากนัก Suppamataya *et al.* (1996) กล่าวว่าการผันแปรของเม็ดเลือดขาวอาจบ่งบอกสภาวะการติดเชื้อของปลา เมื่อเม็ดเลือดขาวเพิ่มจำนวนมากขณะที่เม็ดเลือดแดงลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับปลาปกติ ชี้ให้เห็นว่าปลานั้นติดเชื้อก่อโรค ผลการทดลองนี้อาจชี้ให้เห็นว่าการหมักสมุนไพรฟ้าทะลายโจรเพื่อนำมาใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลานิล ให้ผลลัพธ์ในแนวทางเดียวกับผลจากสารสกัดหยาบจากการทดลองของ Roongkamnertwongsa and Roongkamnertwongsa (n.d.) อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการทดสอบสมมติฐานนี้ การศึกษาเชิงลึกในเรื่องประสิทธิภาพของเม็ดเลือดขาวจึงควรจะทำการวิเคราะห์ต่อไป

เมื่อนำลูกปลามาทำการฉีดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค คือ *Aeromonas hydrophila* พบว่า ปลามีการตายเนื่องจากเชื้อ สังเกตจากการตกเลือดตามแผ่นปิดเหงือก ครีบ และผิวหนัง เป็นรอยจ้ำแดง ซึ่งเป็นอาการหลักของเชื้อนี้ ปลาในกลุ่มควบคุมตายประมาณครึ่งหนึ่งหลังการฉีดเชื้อ 5 วัน แล้วจึงเริ่มปรับตัวและไม่ตายอีก ส่วนปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักสมุนไพรมีการตายภายใน 3 วัน จากนั้นหยุดตาย แต่มีตายเพิ่มในตอนท้ายสำหรับน้ำหมักฟ้าทะลายโจร ปัจจัยที่ทำให้ปลาตายได้แก่ ความเข้มข้นของเชื้อ ตำแหน่งที่ฉีด และความแข็งแรงของปลาก่อนนำมาฉีด ในการทดลองนี้ หากพิจารณาสุขภาพของปลาก่อนฉีดโดยประเมินจากปริมาณเม็ดเลือดจากปลาที่สุ่มมาทดสอบ ก็ไม่พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าปลาโดยรวมมีสุขภาพดี ปลาในกลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นสูงกว่าชุดการทดลองน้ำหมักฟ้าทะลายโจร และน้ำหมักลูกยอ (18%, 10% และ 12% ตามลำดับ) ขณะที่เม็ดเลือดแดงในปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักลูกยอมีปริมาณสูงกว่า ที่ได้รับน้ำหมักฟ้าทะลายโจร และกลุ่มควบคุม (41%, 13% และ 6% ตามลำดับ)

5.5 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองนี้สรุปได้ว่าน้ำหมักสมุนไพรฟ้าทะลายโจร และผลยอ ไม่ส่งผลทางลบต่อการเจริญเติบโตของลูกปลานิลในช่วงอนุบาล (1-2 กรัม) มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เนื่องจากการทดสอบเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมัก เมื่อได้รับเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ปลายังคงมีอัตรารอดสูงขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณแหล่งทุนงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร หมายเลขโครงการ R2559C103 ที่สนับสนุนทุนวิจัยสำหรับการทดลองนี้ และขอขอบคุณคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ในการอนุเคราะห์สถานที่ทดลองวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ประไพสิริ สิริกาญจน. (2546). ความรู้เรื่องปรสิตของสัตว์ (พิมพ์ครั้งที่6). กรุงเทพฯ: รั้วเขียว.

ภัทราภรณ์ สืบสำราญ และ ปวีณา ทวีกิจการ. (2554). ผลของสารสกัดสมุนไพรพญาวานรต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา ค่าภูมิคุ้มกัน และความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *Sterptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49: สาขาประมง, วันที่1-4 กุมภาพันธ์ 2554. กรุงเทพ ฯ. หน้า 1-9ใ

วิภา สุโรจนะเมธากุล และชิดชม ธิรางะ. (2539). การสกัดแทนนินจากเปลือกกล้วย. รายงานผลงานวิจัย ประจำปี 2535-2538 ปีที่ 28 (ฉบับที่ 4): หน้า 278-286.

สมหมาย ปัตตาลี. (2551). การศึกษาคุณภาพน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากผลมะหลอด. บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพ

อัจฉรี เรืองเดช, นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และหัสชัย จันทร์ศรีทอง. (2553). การเพิ่มภูมิคุ้มกันของปลาโรซี่บาร์บด้วยอาหารเสริมเบต้ากลูแคน. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 12 (4), 37-72.

อิทธิวัฒน์ เยี่ยมไธสง.(2555). สูตรฟ้าทะลายโจร-ขมิ้นชัน ป้องกันโรคและลดการตายในการเลี้ยงปลา. สมุนไพร . กรุงเทพฯ: สารมวลชน.

Basha, K. A., R. P. Raman, K. P. Prasad, K. Kumar, E. Nilavan and S. Kumar. 2013. Effect of dietary supplemented andrographolide on growth, non-specific immune parameters and resistance against *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* (Hamilton). Fish Shellfish Immun. 5: 1433–1441.

Chaiyasut, C. 2010. Bioextract. Bangkok: Thaieffect studio. (in Thai)

Chitmanat, C. 2013. Effects of herbal products on fish immunity. KKU Res. J. 18(2), 257-269. (in Thai)

Defoirdt, T., Sorgeloos, P., Bossier, P. (2011). Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. Current opinion in microbiology, 14 (3), 251-258.

Direkbusarakom, S., Ezura, Y., Yoshimizu, M. and Herunsalee, A. (1998). Efficacy of Thai Traditional Herb Extracts against Fish and Shrimp Pathogenic Bacteria. Fish Pathology, 33 (4), 437-441.

Direkbusarakom, S., Y. Ezura, M. Yoshimizu and A. Herunsalee. 1998. Efficacy of Thai Traditional Herb Extracts against Fish and Shrimp Pathogenic Bacteria. Fish Pathol. 4: 437- 441.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Soo, H.M. (2010). Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology. 28,354-361

Harikrishnan, R., Nisha rani, M., Balasundaram, C. (2003). Hematological and biochemical parameters in common carp *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophil*a infection. Aquaculture. 211, 41-50.

Harikrishnan.R., Kim.J.S., Kim.M.C., Balasundaram.C., Heo.MS. (2011). *Styrax japonica* supplementation diet enhances the innate immune response in *Epinephelus bruneus* against bacterial and protozoan infections. Experimental Parasitology, 129, 260-265.

Panjanont, T., K. Choosaeng and T. Abhorn. 2003. Antibacterial potencial of noni extract. J. Herb 12(1): 19-29. (in Thai)

Peng K.C, Lee S.H., Hour A.L., Pan C.Y., Lee L.H., et al. (2012). Five Different Piscidins from Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*: Analysis of Their Expressions and Biological Functions. PLOS ONE 7(11): e50263. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050263

Poomkajorn, P. and P. Rattanachaikulsopon. 2010. Utilization of herb to protect and heal fish diseases. J. Sci. Tech. UBU 12(4): 63-71. (in Thai)

Roongkamnertwongsa, J. and S. Roongkamnertwongsa. n.d. Effects of crude extract *Andrographis paniculata* on blood component, immune system and disease resistance in Seabass (*Lates calcarifer* Bloch, 1790). Coastal Aquatic Animal Health Research Institute, Songkhla province. (in Thai)

Sudagar, M. and A. Hajibeglou. 2010. Effect of Plant Extracts Supplemented Diets on Immunity and Resistance to *Aeromonas hydrophila* in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *AJ* 5: 119-127.

Suppamataya, K., S. Silakes, W. Promkhuntong and S. Boonyarattapalin. 1996. Fish Diseases. Faculty of Natural Resources, Prince of Songkhla university. 212 pp. (in Thai)

Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food control 21, 1199-1218.

Tonediew, C., O. Jintasataporn, P. Tabtipwan and S. Chumkam. 2007. Effect of noni (*Morinda citrifolia*) and Fahtalaijons (*Andrographis* paniculata) on pigmentation and phagocytosis in goldfish (*Carasius auratus*). Proceedings of 45th Kasetsart University Annual Conference Fisheries, Bangkok (Thailand). 358-546. (in Thai)

Udomwongsup, K. 2005. Study on the changes of Noni juice fermentation and the quality of noni juice mixed with lime powder. Thesis for Master of Science (Biotechnology). Kasetsart university, Bangkok. 88 pp. (in Thai)

Yin. G., Jeney.G., Racz.T., Xu.P., Jun.X., Jeney.Z. (2006). Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture. 253, 39-47.

การถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

- ได้ทำการถ่ายทอดงานวิจัยในการประชุมวิชาการนานาชาติ การประชุม Asian-Pacific Aquaculture 2017 ณ กรุงกัวลาลัมเปอร์ ประเทศมาเลเซีย กรกฎาคม 2017 ในรูปแบบของการบรรยาย (https://www.was.org/meetings/ShowAbstract.aspx?Id=481)
- เผยแพร่บางส่วนของงานวิจัยลงใน Hatchery International เรื่อง Noni and Kariyat bioextracts improve immunity in tilapia fingerlings February 2018)
- ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์งานวิจัยลงในวารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร ปีที่ 50 ฉบับที่ 1 (พิเศษ) กรกฎาคม - ตุลาคม 2562