

อภินันทนาการ



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของสารสกัดต้นลูกใต้ใบต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกันโรค
และลักษณะทางพยาธิสภาพของตับและไตในปลา尼ล (*Oreochromis niloticus*)

Effect of *Phyllanthus amurus* Extract on Growth rate, Immune system
and Liver and Kidney Pathology of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

โดย

นงลักษณ์ อิ่มตระกูล

สำนักหอฉานฯ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
วันลงทะเบียน..... 15 ส.ค. 2559.....
เลขทะเบียน..... 1698649.....
เลขเรียกงานนั่งดีคือ.....

RM
๗ ๖๖
H33
๔๑๔๙๕
L558

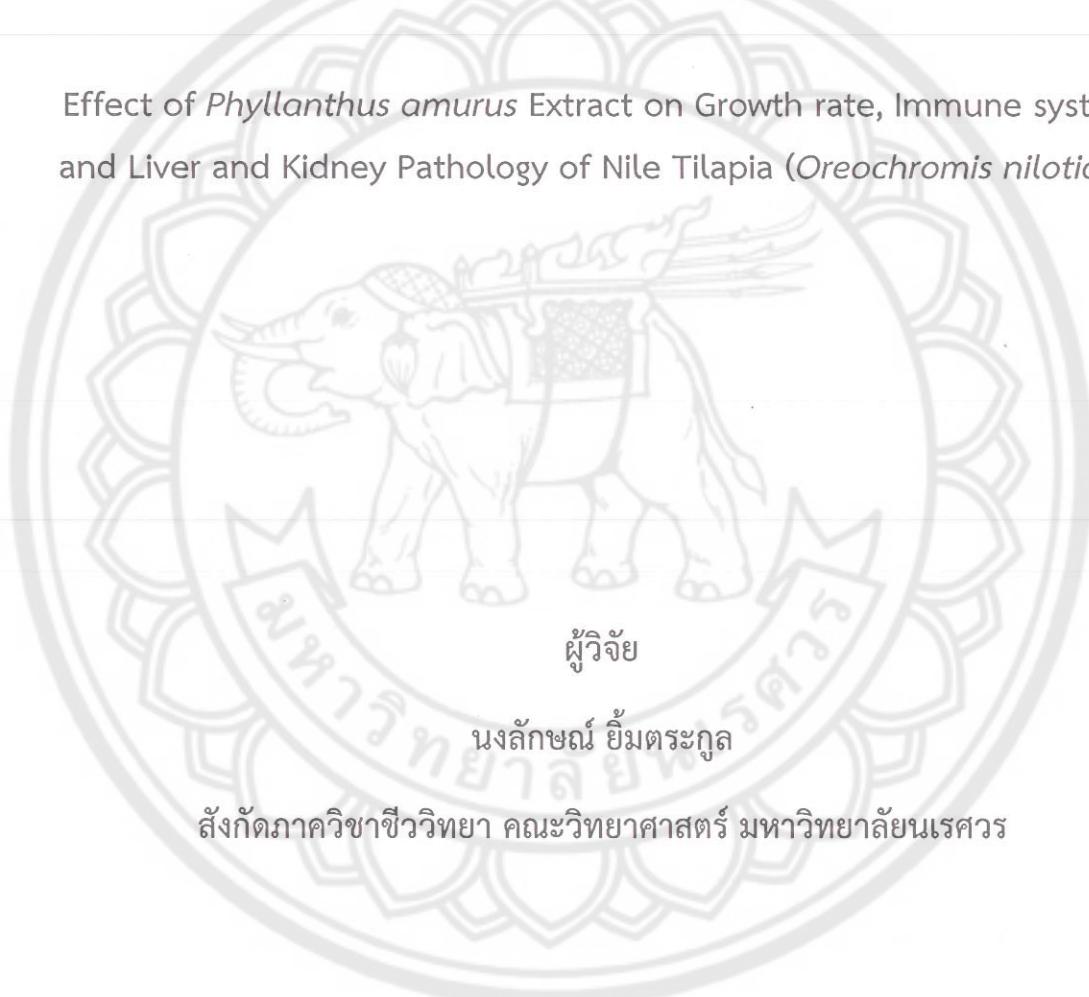
กันยายน 2558

สัญญาเลขที่ R2557C115

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของสารสกัดต้นลูกใต้ใบต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกันโรค
และลักษณะทางพยาธิสภาพของตับและไตในปลา尼ล (*Oreochromis niloticus*)

Effect of *Phyllanthus amurus* Extract on Growth rate, Immune system
and Liver and Kidney Pathology of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)



สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงได้โดยได้รับการสนับสนุนจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร งบประมาณปี พ.ศ.2557 และได้รับความอนุเคราะห์ทั่วอย่างจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ จังหวัดอุตรดิตถ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณบุคลากรในภาควิชาชีวิทยาทุก ๆ ท่าน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ ในการทดลองปฏิบัติการ

ขอขอบคุณเจ้าของเอกสาร บทความ ตำรา หนังสือ ทุกท่าน ที่ผู้วิจัยใช้ในการสืบค้นข้อมูลที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี่

ขอขอบคุณนิสิตโครงการศึกษาอิสระ ภาควิชาชีวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรทุกท่าน ที่ช่วยเหลือทำให้งานวิจัยสำเร็จราบรื่นไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผลของสารสกัดต้นลูกใต้ใบต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกันโรค และลักษณะทางพยาธิสภาพของตับและไตในปลา尼ล (*Oreochromis niloticus*)

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสารสกัดหยابจากต้นลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) ต่ออัตราการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกันโรค และการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและไต ในปลา尼ล (*Oreochromis niloticus*) เปรียบเทียบระหว่างปลา尼ลที่ได้รับอาหารเม็ดเคลือบสารสกัดหยابต้นลูกใต้ใบ ที่ระดับความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม) 1 5 และ 10 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร โดยเลี้ยงปลา尼ลในกระชังขนาด $0.6 \times 1.2 \times 1.5$ เมตร น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 60-66 กรัม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ให้อาหารวันละ 2 มื้อ เช้าและเย็น พบร่วงปลา尼ลในทุกชุดการทดลองมีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และพบว่าปลาในทุกชุดการทดลองมีอัตราการรอดตายสูงกว่าชุดควบคุม แต่ปลาที่ได้รับสารสกัดหยابต้นลูกใต้ใบที่ระดับความเข้มข้น 10 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร มีแนวโน้มว่ามีอัตราการรอดตายสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับระบบภูมิคุ้มกันโดยสารสกัดหยابลูกใต้ใบที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร สามารถระตุนให้ปลา尼ลมีปริมาณ Total Immunoglobulin เพิ่มสูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนปริมาณ Lysozyme activity พบร่วงไม่มีความแตกต่างกัน การศึกษาการแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับและม้ามของปลา尼ล ด้วยเทคนิค Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR) พบร่วงปลา尼ลที่ได้รับสารสกัดต้นลูกใต้ใบ ในแต่ละระดับความเข้มข้นมีการแสดงออกของยีน Complement C3 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้น 5 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร มีแนวโน้มที่จะสามารถกระตุนการแสดงออกของยีน Complement C3 ได้มากกว่าที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ และเมื่อศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและไตในปลา尼ล พบร่วงปลา尼ลที่ได้รับสารสกัดหยابต้นลูกใต้ใบที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร มีภาวะเลือดคั่งในเส้นเลือด เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อ ส่งผลให้มีการตายของเซลล์แบบ Necrosis ของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนบางส่วน นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงและการหลุดร่วงของ Glomerulus ในเนื้อเยื่อไต จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้ทราบว่า สารสกัดหยابต้นลูกใต้ใบสามารถนำมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของปลา尼ลได้ โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อตับและไต หากเลือกใช้ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งอาจเป็นทางเลือกหนึ่งของเกษตรกรในการนำมาใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพของสัตว์น้ำต่อไป

Effect of *Phyllanthus amarus* Extract on Growth rate, Immune system and Liver and Kidney Pathology of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Abstract

Effect of Egg woman (*Phyllanthus amarus*) crude extract on growth rate, immune system and histopathology change of liver and kidney in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). The commercial feed containing *P. amarus* crude extract at 0 (control), 1, 5 and 10 g/kg feed were used in this study. Experiment fishs, 60-66 g initial weight, were fed in the hapa size 0.6 x 1.2 x 1.5 m for 4 weeks with feeding twice per day. The results indicated that every group had growth rate not statistically different from the control and had survival rate higher than control group but 10 g/kg feed tend to the highest survival rate. The results corresponding to the study of immune system. The level of lysozyme activity did not different in all group but 1 g/kg feed significantly stimulate the total-Immunoglobulin level higher than control fish ($p<0.05$). Complement C3 gene expression in liver and spleen were studied by Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR). The results showed non-significant in every groups ($p>0.05$). However, 5 g/kg feed had tend to stimulate the Complement C3 gene expression higher than other levels. The histopathology change of liver and kidney, the result showed 5 and 10 g/kg feed of crude extract made histopathology change following: congestion, inflammation that the case of cell necrosis in liver and pancreas tissues. In addition, there are hemolytic and glomerulus contraction in kidney. The results from this study suggested the benefit of *P. amarus* that can be used for increase survival rate without case of toxicity to liver and kidney if we selected the appropriate concentration. These might be a great choice for dietary supplement in aquatic animals.

Executive summary

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) ผลของสารสกัดต้นลูกใต้ใบต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกันโรค และลักษณะทางพยาธิสภาพของตับและไต ในปลา尼ล

(ภาษาอังกฤษ) Effect of *Phyllanthus amurus* extract on growth rate, immune system and Liver and Kidney pathology of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ชื่อผู้วิจัย

ดร.นงลักษณ์ ยิ่มตระกูล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร งบประมาณปี พ.ศ.2557
งบประมาณที่ได้รับ 180000 บาท
ระยะเวลาทำวิจัย ตั้งแต่ เมษายน 2557 ถึง กันยายน 2558

สรุปโครงการวิจัย

การเพาะเลี้ยงปลานิลเชิงพาณิชย์ในปัจจุบันมีอย่างแพร่หลาย ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งในการเพาะเลี้ยงปลานิล คือ โรคในปลานิล โดยระยะหลังนี้ปานิลเป็นโรคได้ง่ายขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากเกษตรกรปล่อยปลาอย่างหนาแน่น ขาดการดูแลจัดการสภาพแวดล้อมที่ดี และความแปรปรวนของสภาพอากาศเนื่องจากภาวะโลกร้อน เป็นต้น โดยส่วนใหญ่แล้วเกษตรกรมักใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีในการรักษา ซึ่งอาจมีการตกค้างและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตให้สูงขึ้นด้วย

ปัจจุบันมีการใช้พืชสมุนไพรบางชนิดในการกรตะ tünnระบบภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันการเกิดโรคในปลาอย่างแพร่หลาย ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต้นลูกใต้ใบต่ออัตราการเจริญเติบโต และการกรตะ tünnภูมิคุ้มกันโรคในปลานิล และศึกษาถึงความเป็นพิษโดยศึกษาจากลักษณะทางพยาธิสภาพของตับและไตของปลานิล ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้เกษตรกรสามารถนำไป

ประยุกต์โดยเลือกใช้สารสกัดในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อกระตุนให้ปานีลมีภูมิคุ้มกันโรคเพิ่มขึ้น ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนการผลิตจากการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคและไม่เกิดสารตกค้างในปานีลอีกด้วย

โดยผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างปานีลที่ได้รับอาหารเม็ดเคลือบสารสกัดหยาบตันลูกไก่ใบ ที่ระดับความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม) 1.5 และ 10 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร โดยเลี้ยงปานีลในกระชัง ขนาด $0.6 \times 1.2 \times 1.5$ เมตร น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 60-66 กรัม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ให้อาหารวันละ 2 มื้อ เช้าและเย็น พบว่าปานีลในทุกชุดการทดลองมีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) และพบว่าปานีลในทุกชุดการทดลองมีอัตราการรอดตายสูงกว่าชุดควบคุม แต่ปานีลที่ได้รับสารสกัดหยาบตันลูกไก่ใบที่ระดับความเข้มข้น 10 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร มีแนวโน้มว่ามีอัตราการรอดตายสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับระบบภูมิคุ้มกันโดยสารสกัดหยาบลูกไก่ใบ ที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร สามารถกระตุนให้ปานีลมีปริมาณ Total Immunoglobulin เพิ่มสูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนปริมาณ Lysozyme activity พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน การศึกษาการแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับและม้ามของปานีล ด้วยเทคนิค Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR) พบว่าปานีลที่ได้รับสารสกัดหยาบตันลูกไก่ใบในแต่ละระดับความเข้มข้นมีการแสดงออกของยีน Complement C3 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้น 5 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร มีแนวโน้มที่จะสามารถกระตุนการแสดงออกของยีน Complement C3 ได้มากกว่าที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ และเมื่อศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและไตในปานีล พบว่าปานีลที่ได้รับสารสกัดหยาบตันลูกไก่ใบที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร มีภาวะเลือดคั่งในเส้นเลือด เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อ ส่งผลให้มีการตายของเซลล์แบบ Necrosis ของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนบางส่วน นอก จากนี้ยังพบว่ามีการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงและการหลุดตัวของเส้นเลือดฝอยของ Glomerulus ในเนื้อเยื่อไต จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้ทราบว่า สารสกัดหยาบตันลูกไก่ใบสามารถนำมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของปานีลได้ โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อตับและไต หากเลือกใช้ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งอาจเป็นทางเลือกหนึ่งของเกษตรกรในการนำมาใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพของสัตว์น้ำต่อไป

ผลจากการศึกษาระบบนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกร เนื่องจากตัวเกษตรกรเองไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการซื้อยาปฏิชีวนะ ตันลูกไก่ใบเป็นวัชพืชที่ขึ้นอยู่ทั่วไป ในการทดลองนี้ใช้สารสกัดที่สกัดด้วยน้ำเคลือบลงบนเม็ดอาหารสำเร็จรูป เกษตรกรสามารถทำได้เองที่บ้าน หรือใช้ตันลูกไก่ใบตากแห้งบดให้ละเอียดแล้วผสมลงในสูตรอาหารก็ได้ ซึ่งจะเป็นการกระตุนระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้ปานีลสามารถต้านทานต่อเชื้อโรคได้เพิ่มขึ้น ซึ่งผู้วิจัยเห็นว่าความมีการศึกษาความต้านทานต่อเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคจริงๆ เพื่อยืนยันผลของสารสกัดนี้ต่อไป

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	
1. ที่มาและความสำคัญ	1
2. วัตถุประสงค์	2
3. ขอบเขตของการวิจัย	2
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
5. สถานที่ทำการทดลอง	2
6. ระยะเวลาที่ทำการศึกษา	2
2 การตรวจเอกสาร	
1. อนุกรรมวิชานและชีววิทยาของปลานิล	3
2. ลักษณะทั่วไปของปลานิล	3
3. ประวัติความเป็นมาของปلانิล	5
4. ความสำคัญทางเศรษฐกิจของปلانิล	7
5. ระบบภูมิคุ้มกันของปลา	8
6. เนื้อเยื่อปกติของปลา	10
7. พยาธิสภาพในปลา	12
8. ลูกใต้ใบ	15
9. องค์ประกอบของสารเคมีในลูกใต้ใบ	17
10. การใช้สมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ และผลทางพยาธิสภาพ ของเนื้อเยื่อต่างๆ	19
3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
1. อุปกรณ์	21
2. สารเคมี	22
3. วิธีการทดลอง	23

สารบัญ (ต่อ)

บทที่

หน้า

4 ผลการทดลอง

1. ผลของสารสกัดหมายบลูก์ไปเบต่ออัตราการเจริญเติบโตของป้านิล 34
2. ผลของสารสกัดหมายบลูก์ไปเบต่อระบบภูมิคุ้มกันของป้านิล 37
3. ผลของสารสกัดหมายบลูก์ไปเบต่อลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและไตในป้านิล 40

5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

บรรณานุกรม

ภาคผนวก

48

51

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 ผลผลิตการเพาะเลี้ยงและมูลค่าปลานิลหัวโลกระหว่างปี 2549-2553	8
2 ส่วนผสมในการเตรียมสารละลายผสมโดยใช้ Helix cript two-step RT PCR kit (Nanohelix) ในการเปลี่ยน Total RNA เป็น cDNA	28
3 ส่วนผสมในการเตรียมสารละลายผสมในการเพิ่มปริมาณและตรวจสอบดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค Realtime RT-PCR	29
4 น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและอัตราการรอดชีวิต ของปลานิล ในแต่ละชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดหยาบตันลูกใต้ใบที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน	36

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 ภาพแสดงลักษณะของปลานิลเพซเมียและเพคต์	4
2 ลักษณะต้นลูกใต้ใบ (<i>Phyllanthus amarus</i>)	16
3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยืน β -Actin และบริเวณที่ไพรเมอร์ nActinF-RT และ Primer nActinR-RT เข้าไปจับกับ DNA template	31
4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยืน Complement C3 และบริเวณที่ไพรเมอร์ nC3F-RT และ Primer nC3R-RT เข้าไปจับกับ DNA template	32
5 กราฟน้ำหนักเฉลี่ยของปلانิลที่ได้รับสารสกัดหยาบต้นลูกใต้ใบที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน	34
6 Lysozyme activity ของปلانิลที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบต้นลูกใต้ใบ ระดับต่างๆ	37
7 ปริมาณ Total- Immunoglobulin เฉลี่ย ของปلانิลที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบต้นลูกใต้ใบระดับต่างๆ	38
8 การแสดงออกของยืน Complement C3 ในตับ ที่ได้รับสารสกัดหยาบลูกใต้ใบในปริมาณที่แตกต่างกัน	39
9 การแสดงออกของยืน Complement C3 ในม้าม ที่ได้รับสารสกัดหยาบลูกใต้ใบในปริมาณที่แตกต่างกัน	40
10 เนื้อเยื่อตับของปلانิลชุดควบคุม ที่กำลังขยาย 40X	41
11 การมีเลือดคั่งในเส้นเลือดไขñoชอยด์ของเนื้อเยื่อตับของปلانิลที่ได้รับสารสกัดหยาบต้นลูกใต้ใบ ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร กำลังขยาย 40X	41
12 กลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย Neutrophil ในเนื้อเยื่อตับของปLANiL ที่ได้รับสารสกัดหยาบต้นลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร ที่กำลังขยาย 40X	42
13 การมีเลือดคั่งในเส้นเลือดไขñoชอยด์ของเนื้อเยื่อตับของปLANiL ที่ได้รับสารสกัดหยาบต้นลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร ที่กำลังขยาย 40X	42
14 เนื้อเยื่อตับอ่อนของปLANiLชุดควบคุม ที่กำลังขยาย 40X	43

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
15 zymogen granule ที่อยู่ใน acinar cell ของเนื้อเยื่อตับอ่อนของป้านิล ที่ได้รับสารสกัดหยาบตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ที่กำลังขยาย 40X	44
16 การตายของเซลล์แบบ necrosis ในเนื้อเยื่อตับอ่อนของป้านิลที่ได้รับ [*] สารสกัดหยาบตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ที่กำลัง [*] ขยาย 40X	44
17 การตายของเซลล์แบบ necrosis ในเนื้อเยื่อตับอ่อนของป้านิลที่ได้รับ [*] สารสกัดหยาบตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ที่กำลังขยาย 40X	45
18 เนื้อเยื่อไตของป้านิลชุดควบคุม ที่กำลังขยาย 40X	46
19 Glomerulus ในเนื้อเยื่อไตของป้านิลที่ได้รับสารสกัดหยาบตันลูกใต้ใบ ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ไม่มีการหดตัว ที่กำลังขยาย 40X	46
20 การหดตัวของ Glomerulus ในเนื้อเยื่อไตของป้านิลที่ได้รับสารสกัดหยาบ ตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ที่กำลังขยาย 40X	47
21 การหดตัวของ Glomerulus ในเนื้อเยื่อไตของป้านิลที่ได้รับสารสกัดหยาบ ตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ที่กำลังขยาย 40X	47

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลา尼ล (Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*) เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยนิดหนึ่ง ซึ่งในปัจจุบันมีการเลี้ยงปลา尼ลทั้งแบบยังชีพและเชิงพาณิชย์กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากปลา尼ลเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย เดิมโดยได้เริ่wa สามารถกินอาหารได้เกือบทุกชนิด แพร่ขยายพันธุ์รวดเร็w และอาศัยอยู่ได้ในสภาพทั่วๆไป ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งในการเพาะเลี้ยงปลา尼ล คือ โรคในปลา尼ล โดยระยะหลังนี้ปลา尼ลเป็นโรคได้ง่ายขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากเกษตรกรปล่อยปลาอย่างหนาแน่น ขาดการดูแลจัดการสภาพแวดล้อมที่ดี และความแปรปรวนของสภาพอากาศเนื่องจากภาวะโลกร้อน (Global warming) เป็นต้น เชื้อสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในปลา尼ล ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* ซึ่งส่วนใหญ่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม หรือติดมากับปลาที่เป็นพาหะของโรค โรคเหล่านี้สามารถติดต่อกันได้ และต้องการการรักษาและการจัดการเพื่อที่จะควบคุมการระบาดของโรค โดยส่วนใหญ่แล้วเกษตรกรมักใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีในการรักษา ซึ่งอาจมีการตกค้างและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตให้สูงขึ้นด้วย

ปัจจุบันมีการใช้พืชสมุนไพรบางชนิดในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันการเกิดโรคในปลาอย่างแพร่หลาย ลูกใต้ใบ (Egg woman; *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn.) เป็นพืชสมุนไพรไทยนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไป ซึ่งมีสรรพคุณในต้านไวรัสตับอักเสบบี (Yeh et al., 1993) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ต้านการกระจายตัวของเชลล์นิยเริง (Rajeshkumar et al., 2002) เป็นต้น และมีรายงานว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichio coli* (Dhandapani et al., 2007) และ *Streptococcus agalactiae* (Amin, 2012) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคในปลา尼ลด้วย แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาการใช้สารสกัดจากต้นลูกใต้ใบเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคให้กับปลา尼ลและศึกษาถึงผลกระทบด้านความเป็นพิษของการใช้สารสกัดดังกล่าว

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต้นลูกใต้ใบต่ออัตราการเจริญเติบโต และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคในปลา尼ล และศึกษาถึงความเป็นพิษโดยศึกษาจากลักษณะทางพยาธิสภาพของตับและไตของปลา尼ล ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้เกย์ตบรรณาณนำไปประยุกต์โดยเลือกใช้สารสกัดในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อกระตุ้นให้ปลา尼ลมีภูมิคุ้มกันโรคเพิ่มขึ้น ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนการผลิตจากการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคและไม่เกิดสารตกค้างในปลา尼ลอีกด้วย

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากต้นลูกไトイเป็นต่ออัตราการเจริญเติบโตของป้านิล
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากต้นลูกไトイเป็นต่อการระบบภูมิคุ้มกันในป้านิล
3. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากต้นลูกไトイเป็นต่อต่อลักษณะทางพยาธิสภาพของตับและไทดของป้านิล

3. ขอบเขตการวิจัย

สกัดหยาบต้นลูกไトイ (Phyllanthus amarus Schum & Thonn.) ด้วยน้ำ และเคลือบสารสกัดหยาบลงบนอาหารปลาเม็ดสำเร็จรูป ที่ความเข้มข้นต่างๆ ให้ป้านิลกินวันละ 2 มื้อ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และศึกษาอัตราการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน และลักษณะทางพยาธิสภาพของตับและไทดของป้านิล

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

นำเสนอผลงานระดับชาติและ/หรือนานาชาติ เพื่อให้นักวิชาการ เช่น สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์ น้ำ และผู้ที่สนใจได้รับความรู้และเข้าใจเกี่ยวกับการเสริมภูมิต้านทานโรคของป้านิลมากยิ่งขึ้น

5. สถานที่ทำการทดลอง

หน่วยวิจัยพันธุศาสตร์และชีวิตพยาโนเลกุล ภาควิชาชีวิตพยาบาล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

6. ระยะเวลาที่ทำการศึกษา

ตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2557 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2558

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. อนุกรมวิธานและชีววิทยาของปลา尼ล

ปลา尼ลเป็นปลาห้าจีดชนิดหนึ่งในวงศ์ปลาหมก (Family Cichlidae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* และมีชื่อสามัญว่า Nile Tilapia (Nelson, 1994) มีการจัดลำดับอนุกรมวิธาน ดังนี้

Kingdom Animalia
 Phylum Chordata
 Subphylum Vertebrata
 Superclass Gnathosmata
 Class Actinopterygii
 Order Perciformes
 Family Cichlidae
 Genus *Oreochromis*
 Species *Oreochromis niloticus*

ปลา尼ลจัดเป็นปลากระดูกแข็ง (Teleost fish) มีถินกำเนิดเดิมอยู่ที่ทวีปแอฟริกา พบริ่่าไปตามหนอง บึง และทะเลสาบ ในประเทศซูดาน ยูกันดา แทนแกนอิกา เป็นปลาที่เจริญเติบโตรวดเร็ว เลี้ยงง่าย เนماะสมที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในบ่อ จึงได้รับความนิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในภาคพื้นเอเชีย รวมไปถึงในสหรัฐอเมริกา

2. ลักษณะทั่วไปของปลา尼ล

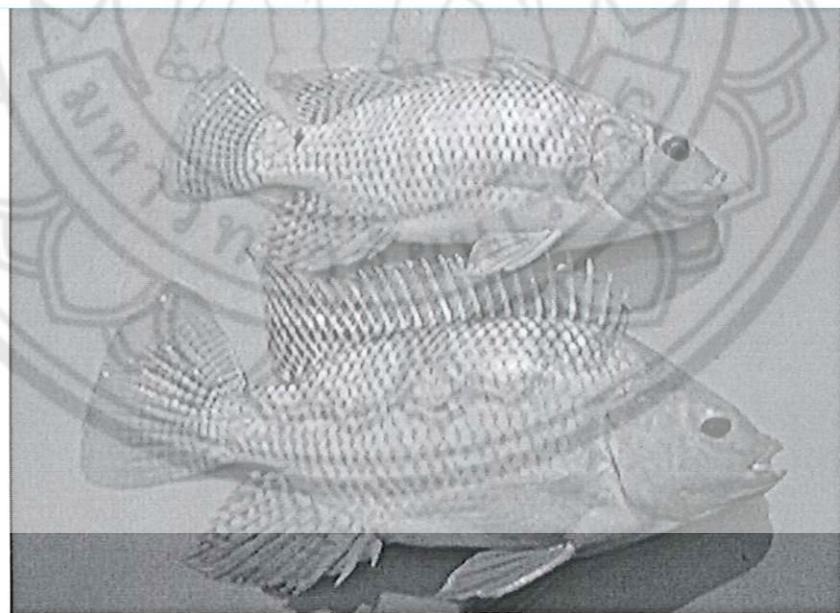
ปลา尼ลเป็นปลาห้าจีดชนิดหนึ่ง (อยู่ในตระกูล Cichlidae) มีรูปร่างคล้ายปลาหมกเทศ (*O. mossambicus*) ซึ่งแตกต่างกับปลา尼ลที่ ปลา尼ลมีลายสีดำและจุดสีขาวสลับกันไป มีริมฝีปากบนและล่างเสมอ กัน มีเกล็ด 3 แฉว ตรงบริเวณแก้ม และอีก 1 แฉว ตรงบริเวณเหนือเส้นข้างลำตัวเล็กน้อย มีลายพาดยาวตามลำตัวประมาณ 9 - 10 แฉว ลักษณะเป็นลายที่สมบูรณ์จากส่วนหลังสูงส่วนท้อง บริเวณครีบหลังประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 15-18 ก้าน และก้านครีบอ่อน 12-14 ก้าน ที่ครีบกันมีก้านแข็ง 3 ก้าน และก้านครีบอ่อน 9 -10 ก้าน และบริเวณส่วนอ่อนของครีบหลัง ครีบกัน และครีบหาง จะมีจุดขาวและเส้นสีดำตัดขวางอยู่ เกล็ดตามแนวเส้นข้างลำตัวมี 33 เกล็ด ทางด้านข้างมีเกล็ดตามแนวเส้นท่อนทันของครีบหลังลงมาถึงเส้นข้างลำตัว 5 เกล็ด และจากเส้นข้างทวารลงมาถึงส่วนหน้าของครีบกัน 13 เกล็ด ที่กระดูกแก้มมีจุดสีเข้ม 1 จุด ปลา尼ลชนิดนี้มีความยาว

สูงสุดถึง 16 นิ้ว (กรมประมง, 2509) ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล มีลายดำพาดขวางตามลำตัวมีความยาวประมาณ 10 - 30 เซนติเมตร

ปลา尼ลเพศผู้ : ปลาที่มีขนาดโตเต็มที่แล้วจะมีสีเข้มตรงบริเวณใต้คางและลำตัว ยิ่งใกล้ตดุไกล์ ผสมพันธุ์ สีก็จะเข้มยิ่งขึ้น อวัยวะเพศที่บริเวณไกล์กับช่องทวาร จะมีอวัยวะเพศลักษณะเรียวยื่นออกมาก

ปลา尼ลเพศเมีย : อวัยวะเพศที่บริเวณไกล์กับช่องทวาร จะมีลักษณะเป็นรูค่อนข้างใหญ่และกลม

ปลา尼ลแปลงเพศ : ลูกปลาที่ฟักเป็นตัวใหม่ๆ จะยังไม่มีการพัฒนาเป็นเพศใดเพศหนึ่งอย่างชัดเจน การเพิ่มฮอร์โมนเพศจากภายนอกในช่วงเวลาดังกล่าว จึงสามารถควบคุมให้แสดงออกเป็นเพศใดเพศหนึ่งได้ ขึ้นกับชนิดของฮอร์โมน โดยฮอร์โมนแอนโดรเจน (Androgen) ทำให้เป็นปลาเพศผู้ และเอสโตรเจน (Estrogen) ทำให้เป็นปลาเพศเมีย ส่วนปลา尼ลแปลงเพศนั้น จะได้รับฮอร์โมน 17α -methyltestosterone (MT) ซึ่งเป็นฮอร์โมนแอนโดรเจนที่นิยมใช้ในการแปลงเพศปลาให้เป็นเพศผู้ โดยใช้ผสมในอาหารใหกินทันทีที่ลุบไห่เดงของลูกปลาบุบ



ภาพที่ 1 ภาพแสดงลักษณะของปลา尼ลเพศเมีย(ตัวบน)และเพศผู้ (ตัวล่าง)
ที่มา: กรมประมง

ป้านิลเป็นปลาที่กินอาหารได้ทุกชนิด โดยเฉพาะพวงอาหารธรรมชาติที่มีอยู่ในบ่อ เช่น ไนดา ตะไคร่น้ำ ตัวอ่อนของแมลงและสัตว์เล็กๆ ที่อยู่ในบ่อ ตลอดจนสาหร่ายและแหน ถ้าต้องการให้ปลาโตเร็วควรให้อาหารสมบท เช่น รำ ปลายข้าว กาก ถั่วเหลือง กากถั่ลิสง กากมะพร้าว แหนเป็ด และปลาป่น เป็นต้น การให้อาหารแต่ละครั้งไม่ควรให้ปริมาณมากจนเกินไป ควรให้ในปริมาณที่พอดี กับความต้องการของปลาส่วนใหญ่ ควรเป็นน้ำหนักกร้อยละ 5 ของน้ำหนักปลาที่เลี้ยง ถ้าให้อาหารมากเกินไปปลาจะกินไม่หมด จะทำให้เสียค่าอาหารไปโดยเปล่าประโยชน์ และยังทำให้น้ำเน่าเสียเป็นอันตรายแก่ปลาได้ ป้านิลมีนิสัยชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง (ยกเว้นเวลาสืบพันธุ์) มีความอดทนและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี จากการศึกษาพบว่า ป้านิลทนต่อความเค็มได้ถึง 20 ส่วนในพันส่วน ทนได้ในค่า pH ช่วง 6.5-8.3 และสามารถทนต่ออุณหภูมิได้ถึง 40°C แต่ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10°C พบร่วงป้านิลปรับตัวและเจริญเติบโตได้ไม่ดีนักทั้งนี้เป็นเพราะถ้ากำเนิดเดิมของปลาชนิดนี้อยู่ในเขตหนาว

3. ประวัติความเป็นมาของป้านิล

พระจักรพรรดิอาคิสิโตเมื่อครั้งดำรงพระอิสริยศมกุฎราชกุมารแห่ง ประเทศญี่ปุ่นทรงจัดส่งป้านิล จำนวน 50 ตัว ความยาวเฉลี่ยตัวละประมาณ 9 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 14 กรัม มาทูลเกล้าฯ ถวายแด่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เมื่อวันที่ 25 มีนาคม 2508 ในระยะแรกได้ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้ปล่อยลงเลี้ยงในบ่อเดินเนื้อที่ประมาณ 10 ตารางเมตร ในบริเวณสวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต เมื่อเลี้ยงมา 5 เดือนเศษ ปรากฏว่ามีลูกปลาเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก จึงได้ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้เจ้าหน้าที่สวนหลวงชุดบ่อขึ้นใหม่อีก 6 บ่อ มีเนื้อที่เฉลี่ยบ่อละประมาณ 70 ตารางเมตร ซึ่งในโอกาสสนับสนุนพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวได้ทรงย้ายพันธุ์ปลาด้วยพระองค์เองจากบ่อเดิมไปปล่อยในบ่อใหม่ทั้ง 6 บ่อ เมื่อวันที่ 1 กันยายน 2508 ต่อจากนั้นทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้กรมประมงจัดส่งเจ้าหน้าที่วิชาการมาตรวจสอบการเจริญเติบโตเป็นประจำทุกเดือน โดยที่ป้านิลนี้เป็นปลา กินพืช เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตได้ รวดเร็ว ในเวลา 1 ปี จะมีน้ำหนักประมาณครึ่งกิโลกรัม และมีความยาวประมาณ 1 ฟุต จึงได้มีพระราชประสงค์ที่จะให้ป้านิลแพร่ขยายพันธุ์อันจะเป็นประโยชน์แก่สกนธิของพระองค์ต่อไป ดังนั้น เมื่อวันที่ 17 มีนาคม 2509 จึงทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ พระราชทานชื่อ ป้านิล และได้พระราชทานป้านิลขนาดยาว 3-5 เซนติเมตร จำนวน 10,000 ตัว ให้แก่ กรมประมงนำไปเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ที่ แผนกทดลองและเพาะเลี้ยงในบริเวณเกษตรกลางบางเขนและที่สถานีประมงต่างๆ ทั่วพระราชอาณาจักรอีก 15 แห่ง เพื่อดำเนินการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์พร้อมกัน ซึ่งเมื่อป้านิลแพร่ขยายพันธุ์ออกไปได้มากเพียงพอแล้วจึงได้แจกจ่ายให้แก่ราษฎรนำไปเพาะเลี้ยงตามความต้องการต่อไป ในเวลาต่อมากรมประมงโดยสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำได้นำป้านิลสายพันธุ์จิตลาดาพันธุ์แท้ ไปดำเนินการปรับปรุงพันธุ์ได้ป้านิลสายพันธุ์ใหม่จำนวน 4 สายพันธุ์ ดังนี้

3.1 ป้านิลสายพันธุ์จิตรดา 1 เป็นป้านิลที่ปรับปรุงพันธุ์มาจากป้านิลพันธุ์แท้แบบคัดเลือกภายในครอบครัว เริ่มดำเนินการปรับปรุงพันธุ์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2528 จนถึงปัจจุบันเป็นช่วงอายุที่ 7 ซึ่งทดสอบพบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตเกินกว่าป้านิลพันธุ์ที่เก่าแก่ถึง 22%

3.2 планนิสัยพันธุ์จิตรลดา 2 เป็นпланนิที่พัฒนาพันธุ์มารจากпланนิสัยพันธุ์จิตรลดาโดยการปรับเปลี่ยนพันธุกรรมในพ่อพันธุ์ให้มีโครโนไซมเป็น YY ที่เรียกว่า YY-Mail หรือ Super male ซึ่งเมื่อนำมาเพอร์ฟันธุ์ดังกล่าวไว้ผสมกับแม่พันธุ์ปกติ จะได้ลูกป่านิลเพศผู้ที่เรียกว่า ป่านิสัยพันธุ์จิตรลดา 2 ซึ่งมีลักษณะเด่นคือเป็นเพศผู้ที่มีโครโนไซมเพศเป็น XY ลำตัวมีลักษณะส่วนหัวเล็ก ลำตัวกว้าง สีขาวนวล เนื้อหนาและแน่น รศชาติดี อายุ 6-8 เดือน สามารถเจริญเติบโตได้ขนาด 2-3 ตัวต่อกิโลกรัม ให้ผลผลิตต่อไร่สูงกว่าป่านิลที่เกษตรกรเลี้ยง 45%

3.3 ปานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 เป็นปลาที่ปรับปรุงพันธุ์มาจากการนำปานิลสายพันธุ์ผสมที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างปานิลสายพันธุ์จิตรลดาและปานิลสายพันธุ์อีก 7 สายพันธุ์ ได้แก่ อีซิปต์ กานา เคนยา สิงคโปร์ เซเนกัล อิสราเอล และได้นวัน ซึ่งมีการเจริญเติบโตเร็วและมีอัตราการฟูฟุ้นสูง ในสภาพแวดล้อมการเลี้ยงต่างๆ มาสร้างเป็นประชากรพื้นฐาน จากนั้นจึงดำเนินการคัดเลือกในประชากรพื้นฐานต่อโดยวิธีถลอกษณะครอบครัวร่วมกับวิธีถลอกษณะภายนครอบครอบครัวปานิลชั่วอายุที่ 1-5 ดำเนินการปรับปรุงพันธุ์โดย ICLARM ในประเทศไทยปี พ.ศ.2538 จากนั้นจึงนำลูกปลาชั่วอายุที่ 5 เข้ามาในประเทศไทย ในปี พ.ศ.2538 สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำจึงดำเนินการปรับปรุงพันธุ์ปลาดังกล่าวต่อโดยวิธีการเดิมจนในปัจจุบันได้ 2 ชั่วอายุ และเรียกว่า ปานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 ปลาสายพันธุ์นี้มีลักษณะเด่น คือ ส่วนหัว เล็ก ลำตัวกว้าง สีเหลืองนวล เนื้อหนาและแน่นรากติด อายุ 6-8 เดือน สามารถเจริญเติบโตได้ขนาด 3-4 ตัวต่อโกลาร์ม ให้ผลผลติสูงกว่าปานิลพันธุ์ที่เก็บครองเลี้ยง 40%

3.4 ปานิชสหพันธ์จีตระด้า 4 ได้จากการคัดเลือกปานิชสหพันธ์ GIFE ของหน่วยงาน WorldFish จากนั้นกรรมประมงจึงนำคัดเลือกลักษณะเด่นอีกรัง จนได้ปลาสีเทาดำคล้ายกับปานิลที่นำไป แต่มีลักษณะส่วนหัวเล็ก ลำตัวกว้าง สันหนา เนื้อมาก เจริญเติบโตเร็วกว่าปานิลที่นำไป 20-30 % อายุ 6-8 เดือน จะมีน้ำหนักตัวประมาณ 500-800 กรัมและตัวใหญ่กว่า นอกจากนี้ยังสามารถเลี้ยงได้ในน้ำจืดและน้ำกร่อย ไม่เกิน 5 ppt ค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ระหว่าง 6-8 โดยให้อาหารเม็ดสำหรับเลี้ยงปานิชหรือปานิลได้ ให้ผลผลิตสูงกว่าปานิลที่นำไปประมาณ 36 % เกษตรกรสามารถนำปานิชสหพันธ์ใหม่นี้ไปเลี้ยงชนิดตั้งแต่อายุ 1 เดือน ทางศูนย์วิจัยฯ มีทั้งปานิชจีตระด้า 4 ที่แปลงเพศแล้ว และยังไม่แปลงเพศไว้จำหน่าย หากเกษตรกรเลี้ยงจนได้ พ่อ-แม่พันธุ์ ที่สามารถให้ผสมพันธุ์กันเองตามธรรมชาติได้ปัจจุบันสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำได้กระจายปานิลทั้ง 4 สายพันธุ์ ไปสู่ภาครัฐและเอกชนทั่วประเทศเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงแล้ว โดยหน่วยงานของสถาบันวิจัยในจังหวัดปทุมธานีและหน่วยพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำจีดจังหวัดพิษณุโลก ขอนแก่น และสุราษฎร์ธานี นอกจากนี้ยังดำเนินการดำเนินการสำรวจสายพันธุ์และทดสอบสายพันธุ์ปานิชจีตระด้าทั่วไป

4. ความสำคัญทางเศรษฐกิจของปลา尼ล

ปลา尼ลจัดว่าเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยและของโลก กำลังได้รับความนิยมจากผู้บริโภคอย่างกว้างขวาง เนื่องจากปลา尼ลเป็นปลาที่มีการพัฒนาสายพันธุ์จนมีลำตัวหนา มีส่วนของกล้ามเนื้อใหญ่ สามารถแล่เป็นชิ้นส่งขายตลาดต่างประเทศ สามารถปรุงแต่งเป็นอาหารได้หลายชนิด นอกจากนี้ห น่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนมีการส่งเสริมและพัฒนาการเลี้ยงปลา尼ลน้อยอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้มีผลผลิตมากขึ้น เพื่อเป็นการสร้างรายได้ให้กับผู้ประกอบการโดยเฉพาะเกษตรกรรายย่อยของประเทศไทย ปัจจุบันปลา尼ลเป็นปลาที่ได้รับความนิยมในการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ส่วนในระดับภูมิภาคเอเชียนั้นปลานิลมีแนวโน้มที่จะทำให้การเลี้ยงเป็นไปแบบบุตสาหกรรม โดยในระยะเวลากว่า 10 ปี ที่ผ่านมาได้มีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาระบบการเลี้ยงและสายพันธุ์ปลา尼ลอย่างต่อเนื่อง โดยผลผลิตมากกว่าครึ่งมาจากภูมิภาคเอเชีย ในปี พ.ศ.2553 ปริมาณการผลิตปลา尼ลทั่วโลกอยู่ที่ 2,538,052 ตัน คิดเป็นมูลค่า 4,018,626,000 เหรียญสหรัฐฯ (ตารางที่ 1) ซึ่งมีปริมาณการจับจากการประมงชาติอยู่ที่ 287,120 ตัน (FAO, 2012) สำหรับการเพาะเลี้ยงปลา尼ลในประเทศไทยนั้น มีอัตราการขยายตัวเพิ่มมากขึ้นโดยส่วนใหญ่ เป็นการเลี้ยงเพื่อบริโภคภายในประเทศ แต่ได้มีความพยายามปรับปรุงสายพันธุ์และพัฒนาเทคโนโลยีการเลี้ยงเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีลักษณะและคุณภาพตรงกับความต้องการของตลาดต่างประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันปลา尼ลสามารถส่งเป็นสินค้าส่งออกไปยังต่างประเทศในลักษณะของปลาແล่นเนื้อ ตลาดที่สำคัญๆ ได้แก่ ญี่ปุ่น อเมริกา อิตาลี เป็นต้น ผลผลิตปลา尼ลที่ประเทศไทยส่งออก จำเป็นต้องมีในการดำเนินการจ้างน้ำสัตว์น้ำ Fisheries Movement Document (FMD) ซึ่งออกโดยกรมประมง หากดูผลผลิตปลา尼ลจากการออกใบกำกับการจำหน่ายสัตว์น้ำ (FMD) ในปี พ.ศ.2554 มี จำนวน 2,167.0 ตัน ซึ่งลดลง 54.0 % เมื่อเทียบกับปี พ.ศ.2553 และสำหรับในปี พ.ศ.2555 คาดว่าจะมีผลผลิตปลา尼ลจำนวน 179,849 ตัน ซึ่งเพิ่มขึ้น 29.1% เมื่อเทียบกับปี พ.ศ.2554 (กรมประมง, 2555) โดยผลผลิตปลา尼ลส่วนใหญ่จะบริโภคภายในประเทศ เป็นรูปสัด 89% ในการแปรรูปทำเค็ม ตากแห้ง 5% ย่าง 3% และที่เหลือในรูปอื่นสำหรับปลา尼ลทั้งตัวและในรูปแข็งก็มีจำหน่ายในประเทศไทย ซึ่งผู้ผลิต คือ โรงงาน และจำหน่ายให้กับตัวการหรือร้านอาหาร เนื่องจากปลา尼ลในประเทศไทยมีราคาสูงกว่าปลาที่จำหน่ายในตลาดโลก โดยราคาเฉลี่ยที่เกษตรกรขายได้ในภาคกลางในปี พ.ศ.2554 ปลา尼ลขนาดเล็กอยู่ที่ 22.71 บาท/กก. ขนาดกลาง 36.01 บาท/กก. และขนาดใหญ่ 45.66 บาท/กก. ปลา尼ลทุกขนาดมีการปรับราคาเพิ่มขึ้น 2-15% เมื่อเทียบกับปี พ.ศ.2553 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) ปริมาณการส่งออกปลา尼ลและผลิตภัณฑ์ของไทยในปี พ.ศ.2554 มีจำนวน 11,910 ตัน คิดเป็นมูลค่า 747.7 ล้านบาท ซึ่งมีปริมาณการส่งออกลดลง 8.19% แต่มูลค่าของสินค้าเพิ่มขึ้น 11.8% เมื่อเทียบกับปี พ.ศ.2553 ตลาดส่งออกหลักของไทย คือ ชาอุดิอาระเบีย 17 % สหรัฐอเมริกา 17 % สหราชอาณาจักรเอมิเรตส์ 14% คุเวต 12% อังกฤษ 7% ฝรั่งเศส 6% เนเธอร์แลนด์ 4% และอื่นๆ 23% รูปแบบผลิตภัณฑ์ปลา尼ลที่ไทยส่งออกมากที่สุดคือ ปลา尼ลแซ่บแข็งหั่นตัว จำนวน 9,751.1 ตัน มูลค่า 431.6 ล้านบาท คิดเป็นสัดส่วนปริมาณและมูลค่า 81.9 % และ 57.7% ของปริมาณและมูลค่าการส่งออกปลา尼ลทั้งหมด รองลงมา คือ เนื้อแซ่บเย็น ปริมาณ 1201.1 ตัน มูลค่า 174.6 ล้านบาท คิดเป็นสัดส่วนปริมาณและ

มูลค่า 10.1 % และ 23.4% เนื้อปลาโนลิฟลเล่เซ็ชช์ จำนวน 860.4 ตัน มูลค่า 130.7 ล้านบาท คิดเป็นสัดส่วนปริมาณและมูลค่า 7.2 % และ 17.5% และรูปแบบอื่นๆ คิดเป็นสัดส่วนปริมาณและมูลค่า 0.8% และ 1.4% ตามลำดับ (กองประมาณต่างประเทศ, 2555)

ตารางที่ 1 ผลผลิตการเพาะเลี้ยงและมูลค่าปลาโนลิฟลทั่วโลกระหว่างปี 2549-2553

ปีพุทธศักราช	ผลผลิต	
	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (1,000 เหรียญสหรัฐฯ)
2549	1,890,696	2,106,466
2550	1,862,878	2,567,132
2551	2,061,816	2,840,701
2552	2,240,589	3,433,018
2553	2,538,052	4,018,626

ที่มา : องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO, 2012)

5. ระบบภูมิคุ้มกันของปลา

ระบบภูมิคุ้มกัน หรือ ภูมิต้านทาน คือ ระบบที่ใช้ปกป้องร่างกายต่อสิ่งแผลกปลอม ซึ่งเป็นการทำงานของกลุ่มเซลล์ที่จำเพาะ และการทำงานของโปรตีนที่จำเพาะในการทำลายสิ่งแผลกปลอมนั้นๆ ซึ่งเชื้อโรค ได้แก่ แบคทีเรีย ไวรัส เชื้อร้า ปรสิต จะมีสารเอนติเจน (antigen) มักจะเป็นสารประกอบจำพวกโปรตีนที่เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วสามารถทำให้สัตว์นั้น ๆ สร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมาต่อสู้ กับสิ่งแผลกปลอม โดยภูมิคุ้มกันมี 2 แบบ คือ

5.1 ภูมิต้านทานไม่จำเพาะ (nonspecific immunity หรือ innate immunity) ซึ่งร่างกาย มีอยู่แล้วโดยธรรมชาติ โดยไม่ต้องมีสิ่งแผลกปลอมเป็นตัวกระตุ้นให้สร้างขึ้น ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เชื้อ โรคเข้าสู่ร่างกายหรือทำลายเชื้อโรคพวงที่สามารถผ่านระบบภูมิคุ้มกันภายนอกเข้ามาได้ “ได้แก่”

5.1.1 พื้นผิวของร่างกาย (surface barrier) “ได้แก่ ผิวนัง (skin) และเยื่อเมือก (mucosa) บริเวณเหงือก เยื่อบุทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร ทางเดินปัสสาวะ และอวัยวะสืบพันธุ์ เหงื่อและน้ำมันซึ่งเกิดขึ้นที่ผิวนังนอกจากช่วยรบกวนความร้อนและทำให้ผิวชุ่มชื้น ยังมีสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อโรค ได้แก่ lactic acid ในเหงื่อ และกรดไขมัน (fatty acid) ในน้ำมัน สารเมือก (mucus) ซึ่งเคลือบอยู่บนเยื่อเมือกจะช่วยป้องกันไม่ให้สิ่งแผลกปลอมเข้าไปเก集体经济กับเยื่อเมือกได้ง่าย”

นอกจากนี้ยังมีสารคัดหลั่ง (secretion) จะมี lysozyme ซึ่งเป็น cationic enzyme ทำลาย β -1,4 glycosidic acid และ N-acetyl glucosamine ใน peptidoglycan ของผนังเซลล์แบคทีเรีย

5.1.2 การอักเสบ (inflammation) คือ การที่เซลล์ของร่างกายส่วนที่ถูกทำลายหลั่งสาร histamine ออกมาระบบริเวณที่ถูกบุกรุก ทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดก่อให้เกิดการไหลเวียนของเลือดมากขึ้น เป็นการดึงเซลล์เม็ดเลือดขาวมาอยู่บริเวณดังกล่าวขึ้นเพื่อเข้าทำลายเชื้อโรค โรคหรือสิ่งแผลกปลอม ผิวนังบริเวณนั้นจะมีสีแดงและร้อน

5.1.3 Interferon เป็นโปรตีนที่ผลิตขึ้นมาจากเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส มีฤทธิ์ต้านไวรัสแบบไม่จำเพาะและมีอายุการทำงานสั้น ช่วยกระตุ้นการทำงานของมาโครฟاجและ NK cells

5.1.4 การทำงานของฟากไซซ์ต์ (phagocyte) เป็นเซลล์ที่สามารถกินสิ่งแผลกปลอมเข้าไปไว้ข้างในแล้วทำลายสิ่งแผลกปลอมนั้นได้ ชนิดที่สำคัญคือ neutrophil และ macrophage การจับกินสิ่งแผลกปลอมของฟากไซซ์ต์ เรียกว่า phagocytosis

5.1.5 complement เป็นสารน้ำที่มีอยู่ทั่วร่างกาย ผลจากการถูกกระตุ้นของสิ่งแผลกปลอม คือ ฟากไซซ์ต์ออกมาระยะแสงเลือดเข้ามายังเนื้อเยื่อที่มีแบคทีเรียอยู่และทำการกำจัด

ระบบคอมพลีเมนท์เป็นกลไกหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ช่วยเหลือแอนติบอดีในการทำลายสิ่งแผลกปลอมออกจากร่างกายอย่างประสิทธิภาพ เป็นกลุ่มของโปรตีนมากกว่า 20 ชนิด โดยโปรตีนเหล่านี้จะอยู่ในรูป Inactive form เมื่อมีการกระตุ้นด้วยสารที่ทำหน้าที่กระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์ เช่น Molecule component ของจุลชีพ และ Antigen-antibody complex เป็นต้น เมื่อโปรตีนถูกกระตุ้นจะอยู่ในรูป Active form และทำงานต่อเนื่องกันแบบ Enzymatic cascade โดยการจับของโปรตีนตัวแรกจะกระตุ้นการทำงานของของโปรตีนตัวต่อไปใน Cascade ในช่วงแรกของการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์จะมีโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น Serine protease คอมพลีเมนท์เป็นโปรตีนที่สร้างที่ Hepatocyte และไม่ทนความร้อน ถูกทำลายได้ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 56°C 30 นาที ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด เช่น C1, C2 ถึง C9, Factor D, Factor B, Properdin เป็นต้น ที่ทำหน้าที่ร่วมกันในการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์ นอกจากนี้ยังมีโปรตีนที่ควบคุมการทำงานของระบบคอมพลีเมนท์ เช่น C1 inhibitor (C1 INH), C4-binding protein, Factor I, Factor H และ S-protein เป็นต้น โปรตีน C3 ถือได้ว่าเป็นโปรตีนหลักในการกระตุ้นแต่ละวิถีของระบบคอมพลีเมนท์

การกระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์ช่วยให้ระบบภูมิคุ้มกันในการทำลายเชื้อโรค มีประสิทธิภาพมากขึ้น ทำให้เกิดการแตกสลาย (Lysis) ของเซลล์แบล็อกปลอม แบบคทีเรีย และไวรัส โดยอาศัยการกระตุ้นของโปรตีนในระบบคอมพลีเมนท์ ทำให้เกิดการเคลือบ (Opsonization) ที่ผิวของเชื้อโรค เพื่อทำให้เกิดการจับกิน (Phagocytosis) ได้ง่ายขึ้นโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีหน้าที่ดักจับกิน (Phagocyte) เชื้อโรค (Boshra et al., 2006) นอกจากนี้การกระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์ยังทำให้เกิดการอักเสบ (Inflammation) และช่วยในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยมีเป็นไทด์ชั้น เล็กๆ ที่เกิดจากการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์ เป็นตัวออกฤทธิ์ทำให้เกิดการขยายตัวของผนังหลอดเลือด (vasodilatation) ที่บริเวณที่มีการอักเสบ ทำให้เกิดการเกาะติดของ Phagocyte บนผนังหลอดเลือด กระตุ้นให้ Phagocyte ออกจากเส้นเลือด ขักนำให้มีการซัมมูมของ Phagocyte บริเวณที่มีการอักเสบ และทำให้เกิดการกำจัดเชื้อโรคสิ่งแบล็อกปลอมไปจากร่างกาย

5.2 ภูมิต้านทานแบบจำเพาะ (specific immunity หรือ adaptive immune system) ซึ่งกำจัดสิ่งแบล็อกปลอมที่มีสมบัติเป็นแอนติเจน (antigen) จะเกิดขึ้นภายหลังจากแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายแล้ว และจะใช้กำจัดได้แต่เฉพาะแอนติเจนนั้นเท่านั้น โดยแอนติเจนจะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางอิมมุนขึ้น โดยมาโคโรฟาร์จในม้ามและตุ่มน้ำเหลืองจะจับกินแอนติเจน แล้วส่งส่วนย่อยของโมเลกุลแอนติเจนที่เรียกว่า antigenic determinant ให้แก่ลิมโฟไซท์ ที่ผิวนอกของ T-lymphocyte และ B-lymphocyte มีที่รับแอนติเจน (antigen receptor) ซึ่ง B-lymphocyte จะเปลี่ยนแปลงและแบ่งตัวเป็น plasma cell ซึ่งสร้างแอนติบอดี ที่จำเพาะกับ antigenic determinant เรียกภูมิคุ้มกันแบบนี้ว่า Humoral immunity หรือภูมิคุ้มกันที่เกิดจากสารน้ำ (humor) เมื่อนำเข้าร่วมมาแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) พบว่าแอนติบอดีส่วนใหญ่อยู่ในส่วนของ γ -globulin และมีส่วนน้อยที่อยู่ในส่วนของ β -globulin ดังนั้นจึงเรียกแอนติบอดีได้ว่า Immunoglobulin โดยมีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย polypeptides 4 สาย คือสายที่ยาวและมีน้ำหนักโมเลกุลมาก เรียกว่า Heavy chain (H) ซึ่งมี 2 สายที่เหมือนกัน ส่วนอีก 2 สายที่สั้นและมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าเรียกว่า Light chain (L) ซึ่งมีลักษณะเหมือนกันทั้ง 2 สาย และทั้ง 4 สายเชื่อมต่อกันด้วย interchain disulfide bonds สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 classes ตามความแตกต่างของ H-chain คือ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE ซึ่งมี H-chain เป็น γ , α , μ , δ และ ϵ ตามลำดับ ส่วน T-lymphocyte ที่พบกับ antigenic determinant จะเปลี่ยนเป็น T killer cell ซึ่งทำลายแอนติเจนได้ด้วยตัวเอง เรียกว่า Cellular immunity หรือ ภูมิคุ้มกันที่เกิดจากเซลล์

6. เนื้อเยื่อปกติของปลา

ตับ เป็นอวัยวะที่อยู่ส่วนบนสุดของห้องห้อง มีสีน้ำตาลเหลือง แบ่งเป็น lobule ไม่ชัดเจน เซลล์ตับมีรูปร่างหลายเหลี่ยม มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง แต่บางครั้งอาจถูกไขมันภายในเซลล์ดันไปติดอยู่บริเวณริมเซลล์ พบสีน้ำเงินเลือดไชนูซอยด์ขนาดเล็กได้ทั่วไปในตับ ตับมีหน้าที่สำคัญหลายประการ ด้วยกัน คือ ทำหน้าที่ metabolism สารอาหารชนิดต่างๆ สร้างโปรตีนของพลาสม่า ทำลายสิ่งแบล็อกปลอม ทั้งจุลทรรศ์และสารพิษ ขับสารพิษและของเสียออกทางน้ำดี และทำหน้าที่สร้างน้ำดีเพื่อ

ช่วยในการย่อยไขมันในลำไส้เล็ก ภายในตับยังพบท่อน้ำดี มีเซลล์เยื่อบุ ผิวเป็นแบบ simple cuboidal ไปจนถึง columnar epithelium ที่ล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และกล้ามเนื้อเรียบ ปลาบางชนิดพบตับอ่อน (Exocrine pancreas) แทรกอยู่ทั่วไปตามเนื้อเยื่อตับ (Takashima and Hibiya, 1995)

ไต มี 2 ส่วน คือ ไตส่วนต้น (Anterior kidney, Head kidney) และไตส่วนปลาย (Posterior, Trunk kidney) ไตส่วนต้น ประกอบด้วย Hemopoietic tissue และ Interrenal tissue ไตส่วนปลายประกอบด้วย Nephron ซึ่งเป็นหน่วยทำงานของไต แต่ละหน่วยไต ประกอบด้วย renal corpuscle และ ท่อน้ำยไต (Renal tubule) (Takashima and Hibiya, 1995) renal corpuscle ประกอบด้วย Glomerulus ที่ล้อมรอบโดย Bowman's capsule และ ท่อน้ำยไตเป็นท่อที่เชื่อมต่อระหว่าง renal corpuscle และ collecting duct ซึ่งจะเปิดออกสู่ ureter แต่ละช่วงของท่อน้ำยไตมีความแตกต่างตลอดความยาวของท่อน้ำยไตส่วนต้น เซลล์เยื่อบุผิวชั่วแรกเป็น cuboidal epithelium แต่ส่วนปลายจะเป็น columnar epithelium มีนิวเคลียสกลมอยู่กลางเซลล์และมี brush border ส่วนท่อน้ำยไตส่วนปลายมีเซลล์เยื่อบุผิวแบบ low columnar epithelium มีไซโโทพาชีมติดสีขมพูเข้มกว่าส่วนอื่น เมื่อย้อมด้วยสี Hematoxylin & Eosin นิวเคลียสค่อนข้างกลม บางครั้งพบว่าอยู่ที่ฐาน บางครั้งอยู่กลางเซลล์ ไม่มี brush border นอกจากนี้ยังพบ hemopoietic tissue แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อไต (สุปราณี และคณะ, 2536)

ม้าม รูปร่างรี มีสีแดงคล้ำ ด้านหนึ่งเรียบอักด้านโถงนูน ม้ามเป็นอวัยวะในระบบน้ำเหลือง ทำหน้าที่ ป้องกันร่างกายจากการรุกรานของเชื้อจุลทรรศ และทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจน (กรณีกา, 2541) ม้ามปลา มีหน้าที่หลักในการทำลายเม็ดเลือดแดง และเก็บสะสมธาตุเหล็กเพื่อนำกลับไปสร้างเม็ดเลือดแดงใหม่ เนื้อเยื่อปกติของม้ามประกอบด้วย red pulp และ white pulp โดย red pulp มีเส้นเลือดฝอยที่เรียกว่า ellipsoid มาเลี้ยงและเติมไปด้วยเม็ดเลือดแดง ส่วน white pulp เป็นบริเวณที่มี B-lymphocyte เป็นส่วนใหญ่ และมี T-lymphocyte ด้วยบางครั้งอาจพบ melanomacrophage เล็กน้อย (Agius, 1979; ชลอ และคณะ, 2530)

กระเพาะอาหาร เป็นส่วนที่ต่อมาจากหลอดอาหารประกอบด้วยชั้น mucosa ซึ่งบุด้วยเซลล์เยื่อบุผิวนิด columnar epithelium มีชั้น lamina propria เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบางๆ ค้ำจุนและมี gastric gland ถัดมาเป็นชั้น submucosa ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เกาะกันอย่างหลวมๆ ชั้นนี้ จะเห็นหลอดเลือดขนาดเล็กมากหล่อเลี้ยง ถัดออกมายจะเป็นชั้น muscularis ประกอบด้วย กล้ามเนื้อเรียบ ชั้นนอกสุดคือชั้น serosa เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Takashima and Hibiya, 1995)

สำหรับส่วนต้น ผนังชั้น mucosa จะยื่นยาวเข้าไปใน lumem เชลล์เยื่อบุผิวเป็นชนิด columnar epithelium มี goblet cell แทรกเป็นระยะอยู่ระหว่างเซลล์เยื่อบุผิว ลดลงไปจะเป็นชั้น lamina propria ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ต่อลงมาจะเป็นชั้น submucosa ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน มีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยง ต่อจากนั้นจะเป็นชั้น muscularis ซึ่งประกอบด้วยกล้ามเนื้อเรียบ ชั้นนอกสุดจะเป็นชั้น serosa ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบางๆ ระหว่างชั้น muscularis กับ serosa อาจจะพบเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงเช่นกัน (Takashima and Hibiya, 1995)

เหงือก เหงือกแต่ละอันประกอบด้วย gill arch gill filament และ gill lamellae ที่ gill filament จะพบ goblet cell บ้างเล็กน้อย gill lamellae เป็นส่วนที่แยกออกจาก gill filament บุ้ด้วยเซลล์เยื่อบุผิวชนิด multilayered squamous epithelium มี pillar cell เป็นตัวค้ำจุนระหว่างเซลล์เยื่อบุผิวทั้งสองด้านของ gill lamellae และส่วนที่เป็นนปีกของ pillar cell ทั้งด้านบนและล่างจะล้อมรอบเส้นเลือดไซนูชอยด์ ซึ่งจะเป็นช่องที่เม็ดเลือดเข้าไปเพื่อทำการแลกเปลี่ยนแก๊สเนื่องจากเหงือกทำหน้าที่แลกเปลี่ยนแก๊สระหว่างเลือดกับน้ำ มีความสำคัญมากในการรักษาสมดุลของร่างกาย (Philpott and Copeland, 1963)

7. พยาธิสภาพในปลา

ภัยนตรายหรือการบาดเจ็บ (Injury) หมายถึง ตัวนำทางพิสิกส์หรือสารเคมีที่รบกวนหรือเปลี่ยนแปลงระดับเสถียรภาพของเซลล์ การรบกวนนั้นอาจเกิดขึ้นชั่วคราว เชลล์จะสามารถปรับตัวต่อภัยนตรายนั้นได้อย่างรวดเร็ว และไม่เกิดผลเสียหายต่อเสถียรภาพของมัน หรืออาจเป็นผลลัพธ์ของการก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งรูปร่างและหน้าที่ของเซลล์ได้ บางครั้งภัยนตรายอาจมากจนเซลล์ตาย การบาดเจ็บของเซลล์สามารถแบ่งออกเป็นประเภทต่างๆ ดังนี้

7.1 Cell adaptation หมายถึงกระบวนการที่เซลล์ ยังสามารถคืนกลับสู่สภาพเดิมได้เมื่อเซลล์ปรับตัวให้เข้ากับสิ่งที่เข้ามาบุกรุกหรือสร้างภัยนตรายที่ไม่รุนแรง ได้แก่

7.1.1 Atrophy : เป็นการฝ่อเล็บของเซลล์ หรืออวัยวะ โดยเซลล์ หรืออวัยวะมีขนาดเล็กลง ขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจน ใช้โทพลาซึมย้อมติดสี eosin ลดลง ไม่พบการสะสมภายในเซลล์ นิวเคลียสและนิวคลีโอลัมมีขนาดเล็ก ติดสีเข้ม (Takashima and Hibiya, 1995)

7.1.2 Hypertrophy : เป็นการเพิ่มขนาดของเซลล์และทำให้เนื้อเยื่อย้ายใหญ่ขึ้น เนื่องจากการเพิ่มขนาดของโมเลกุล เช่น พอกโปรดีน กรดนิวคลีอิก และไขมัน เป็นต้น รวมทั้งการ

เพิ่มจำนวนของออร์แกเนลล์ ของเซลล์โดยที่รูปร่างลักษณะของเซลล์คล้ายกับเซลล์ปกติแต่มีขนาดใหญ่ขึ้น (Takashima and Hibiya, 1995)

7.1.3 Hyperplasia: เป็นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ทำให้วัยรุ่นนั้นๆ มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยปกติ hyperplasia จะเกิดขึ้นเมื่อมีตัวกระตุ้นตลอดเวลา และเซลล์ที่เพิ่มขึ้นมาใหม่ก็ทำหน้าที่คล้ายกับเซลล์ปกติมาก (Takashima and Hibiya, 1995)

7.1.4 Cell degeneration หมายถึง การเสื่อมสภาพของเซลล์ มีหลายลักษณะ ได้แก่

ก. Cloudy swelling : เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น ภายในไซโทพลาซึมชุ่น มีเกรนูลและปราภูเป็น Hyaline droplet ที่ติดสี eosin อยู่ในไซโทพลาซึม นิวเคลียสอาจมีรูปร่างใกล้เคียงกับเซลล์ปกติ หรืออาจมีลักษณะชุ่นกว่านิวเคลียสของเซลล์ปกติ หากสังเกตภายนอกจะพบว่ามีการบวมและขยายใหญ่ขึ้น ขอบของวัยรุ่นจะโป่งขึ้น มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีของเหลวไปสะสมมากขึ้น สีของวัยรุ่นจะมีการเปลี่ยนแปลง เช่น ซีดลง เพราะเซลล์ที่บวมหรือใหญ่ขึ้นจะไปกดทับกันเส้นเลือดที่อยู่ภายในวัยรุ่น ทำให้การไหลเวียนของเลือดไม่ปกติ (Takashima and Hibiya, 1995)

ข. Hyaline degeneration : เป็นการเสื่อมสภาพที่เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทำให้มองเห็นเป็นปืนสีชมพูอยู่ในไซโทพลาซึม ไม่มีรูปร่างแน่นอน โดยเกิดจากความผิดปกติในการขนส่งโปรตีนออกไปนอกเซลล์ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างย่อยเกิดขึ้นภายในตัวเซลล์โดยที่นิวเคลียสยังปกติ เซลล์และเนื้อเยื่อจึงยังไม่ตาย (พงษ์ศักดิ์ และพิเชฐ, 2541; Doull et al., 1980; Takashima and Hibiya, 1995)

ค. Hyaline droplet : เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับท่อห่วงไทด์ส่วนต้นที่มีความบกพร่องในการทำหน้าที่ดูดซึมกลับของสารไม่เลกุณขนาดใหญ่ ซึ่งรวมถึงโปรตีน จึงมีจำนวนโปรตีนเพิ่มมากขึ้นในไซโทพลาซึม ทำให้มองเห็นเป็นตะกอนหรือเม็ดสีชมพูขนาดเล็ก (พงษ์ศักดิ์ และพิเชฐ, 2541)

ง. Vacuolar degeneration : เป็นการเสื่อมสภาพอีกรูปแบบหนึ่ง ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ คือ มีช่องว่างเกิดขึ้นในไซโทพลาซึม สิ่งที่เห็นเป็นช่องว่างอาจเป็นน้ำ ไขมัน หรือออร์แกเนลล์ที่บวมมากก็ได้ การใช้คำว่า Vascular degeneration จึงมีความหมายสมในแห่งที่ไม่ระบุชนิดของสารที่อยู่ในช่องว่าง การเปลี่ยนแปลงแบบนี้ เกิดขึ้นที่ไซโทพลาซึมเป็นหลัก โดยเห็นช่องว่าง

ชัดเจน ตัวอย่าง เช่น การน้ำท่วมของเซลล์ตับ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของร่างกาย (พงษ์ศักดิ์ และพิเชฐ, 2541)

7.2 Cell necrosis เป็นการตายของเซลล์ที่มีสาเหตุจากเซลล์ไม่มีความสามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้ โดยมีการหลั่งเอนไซม์จากไลโซโซมออกมาย่อยตัวเอง ไลโซพลาซึมของเซลล์ที่เกิด necrosis จะติดสีข้มพูมากขึ้น บริเวณที่นิวเคลียสมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อย้อมด้วย Hematoxylin & Eosin เนื่องจากโครงสร้างกันเป็นกลุ่มก้อนและเกาๆ ติดอยู่กับเยื่อหุ้มนิวเคลียสหรือนิวคลีโอลัส ต่อมามะตินรวมตัวกันแน่น การเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสแบบนี้เรียกว่า Pyknosis การเปลี่ยนแปลงหลังจากนี้ คือ การสลายตัวของโครงสร้าง เรียกว่า Karyolysis ซึ่งเกิดจากการย่อยโดย DNase ที่หลั่งมาจากไลโซโซม ในเซลล์บางประเภทหลังจากเกิด Pyknosis แล้วนิวเคลียสกลับแตกตัวออกเป็นชิ้นๆ เรียกว่า Karyorrhexis ในที่สุดนิวเคลียสก็จะสลายไปจนหมดสิ้น อย่างไรก็ตามเซลล์ที่ตายจะถูกย่อยสลายเป็นของเหลวและถูกดูดซึมเข้าสู่กระเพาะเลือดและน้ำเหลือง (พงษ์ศักดิ์ และพิเชฐ, 2541)

7.3 กระบวนการอักเสบและการซ่อมแซม (Inflammation and Repair) การอักเสบ (Inflammation) เป็นกลไกการป้องกันของ host เพื่อตอบสนองกับเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บเนื่องจากมีบาดแผล สารเคมีหรือการติดเชื้อ บางกรณีอาจสังเกตได้จากการตายของเซลล์ การบวมแบบ cloudy swelling และการฟ่อสีบของเซลล์ ขณะเดียวกันอาจไปมีผลต่อระบบหมุนเวียนเลือด ของเหลวที่ออกจากระดับเส้นเลือดมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวและ fibroblast มากขึ้น (Takashima and Hibiya, 1995)

การอักเสบแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ ตามระยะเวลา คือ การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) และการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) ดังนี้

การอักเสบเฉียบพลัน เป็นปฏิกิริยาป้องกันตัวเองของสิ่งมีชีวิตซึ่งเกิดขึ้นอย่างทันทีเมื่อมีการติดเชื้อเกิดขึ้น โดยมีการเปลี่ยนแปลงการไหลของเลือด ทำให้เกิดภาวะเลือดคั่งในเส้นเลือดทั้งที่เส้นเลือดไซนูซอยด์ (Sinusoid) หรือเส้นเลือดดำ (Veins) อาจมีภาวะการตกเลือด โดยมีเลือดออกจากเส้นเลือดเข้าไปอยู่ตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย อาจจะไหลเข้าสู่ช่องท้องหรือไหลออกนอกตัวหรือไหลไปแทรกระหว่างเซลล์ ซึ่งเกิดจากการแตกของเส้นเลือด นอกจากนี้อาจพบการมีของเหลวสะสมอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ คือน้ำเลือดที่แพร่ออกมายู่รอบๆ เซลล์หรือรอบ เนื้อเยื่อเรียกว่าภาวะบวมน้ำ (สมพงศ์ และคณะ, 2533; Takashima and Hibiya, 1995)

การอักเสบเรื้อรัง เป็นการตอบสนองที่ไม่รุนแรง โดยอาจเกิดจากการได้รับสารพิษที่ร่างกายจัดไม่ได้เป็นระยะเวลานาน การอักเสบเรื้อรังอาจเป็นชนิด granuloma (Chronic granulomatous inflammation) ลักษณะเด่น คือ มี Macrophage ที่เปลี่ยนไปเรียกว่า epithelioid cell บริเวณรอบนอกของ granuloma จะล้อมรอบด้วย fibroblast และมี lymphocyte แทรกอยู่ เชลล์ที่อยู่ใน granuloma นานๆ นักจะตาย เมื่อนำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเชลล์ยังไม่ถลายเป็นเหลวไปหมด แต่ก็คงไม่เห็นขอบเขตของเชลล์แล้วถลายเป็นเศษเม็ดๆ หรือยุย ไม่มีรูปร่างแน่นอน มีสีขาวเทาคล้ายเนยแข็ง เรียกการตายแบบนี้ Caseous necrosis (สมพงศ์ และคณะ, 2533) ใน平原มี melanomacrophage ซึ่งเป็นเชลล์ที่มีสารสีน้ำตาลเหลืองหรือสีดำ เนื่องจากมี melanin สะสม มีลักษณะเป็นแกรนูลไม่ติดสีย้อมของ Hematoxylin & Eosin แต่สามารถมองเห็นได้

การซ่อมแซม (Repair) เป็นกระบวนการที่เชลล์ถูกทำลายหรือถลายไป แล้วถูกแทนที่ด้วยเชลล์ใหม่ที่มีสภาพดี การซ่อมแซมเกิดขึ้นเนื่องจากการออกใหม่ของเชลล์ชนิดเดิมที่ยังคงเหลืออยู่ หรือเกิดโดยการแทนที่ด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งเกิดตั้งแต่ในระยะต้นของการอักเสบภายหลังเกิดอันตรายกับเนื้อเยื่อ fibroblast และ endothelial cell เริ่มแบ่งตัวบริเวณขอบแผลแล้ว หลังจาก 3-5 วัน มีเส้นเลือดขนาดเล็กที่สร้างใหม่เกิดขึ้นอย่างมากภายในกลไกเป็นจุดสีแดง ที่เรียกว่า granulation (สมพงศ์ และคณะ, 2533)

8. ลูกใต้ใบ

ลูกใต้ใบมีการจัดลำดับทางอนุกรมวิธาน ดังนี้

Kingdom Plantae

Division Tracheophyta

Infradivision Angiospermae

Class Magnoliopsida

Superorder Rosanae

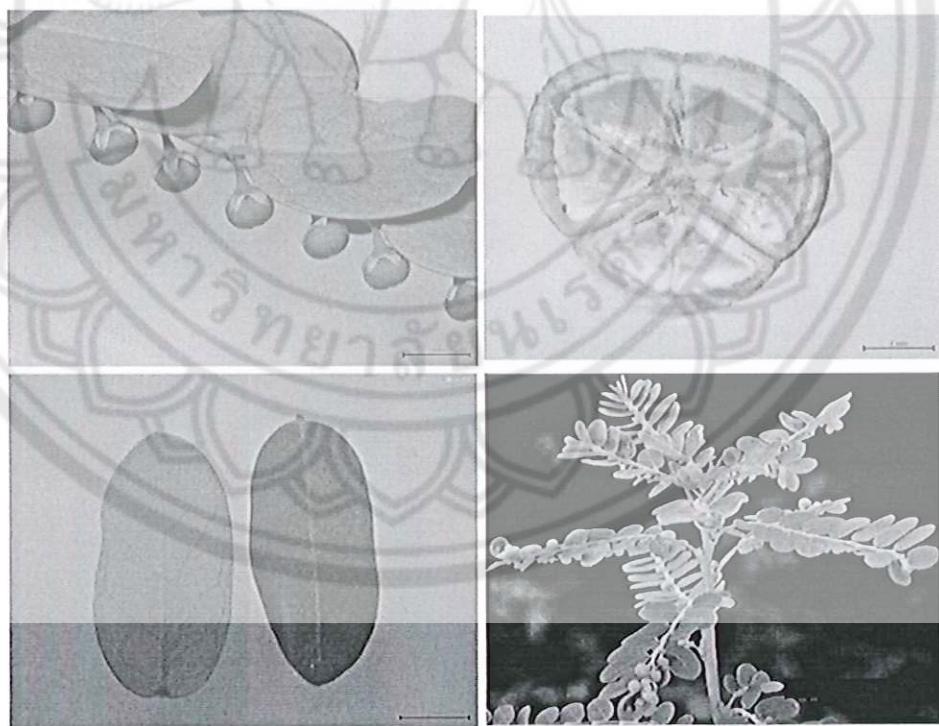
Order Malpighiales

Family Phyllanthaceae

Genus *Phyllanthus* L.

Species *Phyllanthus amarus*

ลูกใต้ใบมีถิ่นกำเนิดในอเมริกา แอฟริกา และเอเชีย อาจเรียกว่า มะขามป้อมดิน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Phyllanthus amarus* ชื่อสามัญ Egg Woman, Stonebreaker, Seed-underleaf เป็นต้น จัดอยู่ในวงศ์ Phyllanthaceae มีลักษณะทางพฤกษาศาสตร์ คือ เป็นไม้ล้มลุกสูง 10-60 เซนติเมตร ทุกส่วนมีรสมัน มีใบประกอบแบบขนนกขั้นเดียว มีใบย่อย 23-25 ในปลายใบมนกว้างโคนแคบขนาดประมาณ 0.4-1 เซนติเมตร ก้านใบสั้นมาก มีหูใบสีขาวนวล ดอกของลูกใต้ใบมีขนาดเล็กสีขาว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.08 เซนติเมตร ออกตามซอกก้านใบย่อย และห้อยลงเป็นดอกแยกเพศ คือ ดอกเพศเมียมักอยู่ส่วนโคนส่วนดอกเพศผู้มักอยู่ส่วนปลายก้านใบ ผลของลูกใต้ใบมีทรงกลมผิวเรียบสีเขียวอ่อนนวล ขนาดประมาณ 0.15 เซนติเมตร เกาะติดอยู่ที่โคนใบย่อย เมื่อแก่ จะแตกออกเป็น 6 พู แต่ ละพูจะมี 1 เมล็ด เมล็ดสีน้ำตาลรูปเสี้ยวของทรงกลม ลูกใต้ใบอาจเรียกว่า มะขามป้อมดิน (ภาคเหนือ) หญ้าใต้ใบ (นครสวรรค์ อ่างทอง ชุมพร) หญ้าใต้ใบขาว (สุราษฎร์ธานี) ไฟเดือนห้า (ชลบุรี) หมายไป่หลัง (เลย) จูเกี่ยเช่า (จีน) เจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ทุกภาคของประเทศไทย และยังกระจายอยู่ในหลาย ๆ ประเทศเขตต้อน ทั้งในบราซิล เปรู หมู่เกาะカリบีในสหรัฐอเมริกา อินเดีย ไทย ลาว พม่า กัมพูชา ทวีปแอฟริกา



ภาพที่ 2 ลักษณะต้นลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*)

สรรพคุณของลูกใต้ใบ มีดังนี้ รากใช้ฝนกับน้ำขาวข้าว แก้ไข้หวัด แก้ท้องเสีย แก้บวม แก้ปัสสาวะขัด แก้โรคตี่ช่าน ระดูไหลไม่หยุด บำรุงธาตุ แก้นิ่ว ขับปัสสาวะ (หน่วยปฏิบัติการวิจัยเคมีสารสนเทศ, mpgp.) ต้น ใช้ต้มเป็นยาระบาย ขับปัสสาวะ เป็นยาfadeสมาน แก้โรคตี่ช่าน แก้ปวด ปวดบวม ตามร่างกาย ต้มกับสมุนไพรอื่น (*Stachytarpheta jamaicensis*) ใช้ป้องกันพยาธิลำไส้ในเด็ก มีสรรพคุณช่วยลดไข้ แก้บวม แก้ปัสสาวะขัด แก้นิ่ว แก้ปวดฟี แก้ฟกช้ำบวม ไข้หวัด ไข้หวัดใหญ่ รวมทั้งแก้ท้องเสียได้ ชาวบ้านในหลายพื้นที่นิยมหากลูกใต้ใบให้แห้งเก็บใส่โถไว้ซึ่งเป็นชา กินเพื่อแก้ไข้ แก้ปวดข้อ แก้อักเสบ แก้ปวด มีรายงานการวิจัยพบว่าลูกใต้ใบมีฤทธิ์ในการแก้ไข้ แก้อักเสบ ใช้ต้มกินเป็นยาரักษาตี่ช่าน รักษาตับอักเสบตัวเหลือง ตาเหลือง ลูกใต้ใบจึงกลายเป็นสมุนไพรยอดนิยมของผู้ป่วยเบาหวาน หนองยาและชาวบ้านในหลายประเทศ รวมทั้งประเทศไทย เชื่อว่าลูกใต้ใบเป็นสมุนไพรช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในคนเป็นโรคเบาหวานได้ ซึ่งมีการศึกษาวิจัยทางเภสัชวิทยาพบว่าสารสกัดของลูกใต้ใบมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาล ในเลือดได้ ผลใช้แก้ไข้ พิษตานซาง แก้ร้อนใน น้ำต้มใบใช้แก้ปวดท้อง บำรุงธาตุ ลดไข้ ขับนิ่วในไต แก้ไอในเด็ก รักษามาลาเรีย ในประเทศไทยเดียวใช้บรรเทาอาการปวดท้อง ท้องมาน ตี่ช่าน บิด ท้องร่วง ไข้ อาการเกี่ยวกับการขับถ่ายปัสสาวะ โรคตา หิดและบาดแผล (Gruenwald et al., 2000; Padua et al., 1999)

9. องค์ประกอบของสารเคมีในลูกใต้ใบ

การทดสอบสารเคมีในลูกใต้ใบ พบร่วม มีสาร glycosides saponins tannins flavonoids และ lignans ซึ่งเป็นสารกลุ่มสารพฤกษ์เคมี (Fabian et al., 2007) สารพฤกษ์เคมี หมายถึงสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบเฉพาะในพืช สารกลุ่มนี้อาจเป็นสารที่ทำให้พืชผักชนิดนั้นๆ มีสี กลิ่นหรือรสชาติที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว สารพฤกษ์เคมีหลายชนิดมีฤทธิ์ต่อต้านหรือป้องกันโรค เช่น โรคมะเร็ง กลไกการทำงานของสารพฤกษ์เคมีเมื่อเข้าสู่ร่างกายอาจเป็นไปโดยการช่วยให้อีนไซม์บางกลุ่มทำงานได้ดีขึ้น อีนไซม์บางชนิดทำหน้าที่ทำลายสารก่อมะเร็งที่เข้าสู่ร่างกาย มีผลทำให้สารก่อมะเร็งหมดฤทธิ์ ซึ่งปัจจุบันพบสารพฤกษ์เคมีแล้วมากกว่า 15,000 ชนิด และพบว่าสารพฤกษ์เคมีสร้างประโยชน์ด้วยกลไกการออกฤทธิ์ในรูปแบบต่างๆ คือ ต้านออกซิเดชัน ทำลายฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ ลดความเสี่ยหายที่เกิดขึ้นกับตีอีนเอ เป็นกลไกสำคัญที่ทำให้สารพฤกษ์เคมีลดการเกิดโรคมะเร็งได้เพิ่มภูมิต้านทานโรค ควบคุมการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน เป็นต้น (วินัย, 2550)

ชาโภนิน (saponins) คือ สารที่ส่วนใหญ่สกัดได้จากใบชา (tea seed saponin) เป็นชาโภนินชนิด triterpenoid saponin ซึ่งโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วยสารชาโภเจนิน (sapogenin) สารอะไกลคอน (aglycon) และกรดอินทรีย์ มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวนิดไม่มีอ่อน ทำให้เกิดฟอง ได้ดี สารชาโภนินมีรสม เผ็ด ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อตาและจมูก

ได้ ชาเป็นนิจากชามีลักษณะเป็นผลึกสีขาวถูกความชื้นได้ง่ายจุดหลอมเหลว 224°C ละลายได้ดีในสารละลายนมิเซลแลกออยอล์ สารละลายนมิเซลแลกออยอล์และกรดอะซิติกเข้มข้น เป็นต้น สามารถนำไปใช้ ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น สารลดแรงตึงผิว สารทำความสะอาด สารกำจัดศัตรูพืช สารเคลือบกันชื้นขึ้น สารผสมสารกันบูด สารทำให้เกิดฟองในอุตสาหกรรมผลิตเบียร์ในทางการเกษตร การประมงมีการใช้เป็นสารกำจัดแมลง สารฆ่าเชื้อโรคใช้แทนยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ และใช้เป็นสารกำจัดสัตว์ป่าที่ไม่พึงประสงค์ในบ่อ พาหะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยสารชาเป็นนิจะทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์เลือดเย็น เช่น ปลา หอยเป็นต้น (บุณฑริกา, 2556)

แทนนิน (tannin) เป็นสารที่มีโมเลกุลใหญ่และโครงสร้างซับซ้อน มีสถานะเป็นกรดอ่อนรสเผ็ด เป็นสารให้ความเผ็ดในพืช พบได้ในพืชหลายชนิด แทนนิน มี 2 ชนิด คือ condensed tannins หรือเรียกอีกอย่างว่า proanthocyanin พบได้ในส่วนเปลือกต้น และแก่นไม้เป็นส่วนใหญ่ และ hydrolysable tannins คือแบบที่สามารถถูกแยกออกเป็นโมเลกุลเล็กๆ ได้ พบมากในส่วนใบ ฝัก และส่วนที่ปูดออกมาน้ำเป็นปมเมื่อต้นไม้ได้รับอันตราย แทนนินมีคุณสมบัติตักษอนโปรตีน ทำให้หนังสัตว์ ไม่เน่าเปื่อย จึงมีการใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนังด้วย แทนนินมีฤทธิ์ฟัดสมาน จึงใช้เป็นยารักษา โรคห้องเสียได้ แทนนินมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ (พีระศักดิ์, 2544)

ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) จัดเป็น nutraceutical มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยทำหน้าที่ในการหน่วงเหนี่ยวหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงช่วยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระได้ แหล่งอาหารที่พบฟลาโวนอยด์มาก ได้แก่ ผักและผลไม้ เช่น ผลไม้ ถั่วเหลือง กระชายดำ สารสกัดจากเมล็ดองุ่น รวมทั้งเครื่อง ดีมต่างๆ เช่น ชา ไวน์ นอกจากนี้แล้วยังพบสารพฤกษ์เคมีพวก alkaloids tannins flavonoids glycoside และ saponin (Akin-Osanaiye, et al., 2011) อัลคาโลยด์ (alkaloid) เป็นสารอินทรีย์กลุ่มที่มีรากฐานในไตรเจนอยู่ภายใต้โมเลกุล ในรูปของ amine amine oxide หรืออาจพบอยู่ในรูปของ amide และ imide ในไตรเจนในอัลคาโลยด์ได้มาจากการดอมนิโน่ โดยทั่วไปอัลคาโลยด์จะมีคุณสมบัติเป็นเบส แต่จะมากหรือน้อยขึ้นกับจำนวนของไนโตรเจน บางชนิดเป็นกลาง (Mc Naught and Wilkinson, 1997) หรือเป็นกรดอ่อน (Manske, 1965) มักมีฤทธิ์ทางยาในธรรมชาติจะพบอัลคาโลยด์มาก ตามส่วนต่างๆ ของพืช ขั้นสูง เช่น ใน ดอก ผล เมล็ด รากและเปลือก พบน้อยในพืชขั้นต่ำ สัตว์ และจุลินทรีย์ หน้าที่ของอัลคาโลยด์ในพืชสันนิษฐานว่าอาจเป็นแหล่งสะสมไนโตรเจนเพื่อสร้างโปรตีน ควบคุมการเจริญเติบโตหรือการออกของเมล็ดพืชบางชนิด ช่วยป้องกันพืชจากแมลง หรืออาจเป็นสารที่ได้จากการทำลายพิษที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมtabolism ของพืช อัลคาโลยด์ส่วนใหญ่มักมีรสมและมีพิษ

อย่างไรก็ตามมีพืชมากกว่า 80% ที่ไม่สร้างและไม่สะสมอัลคาลอยด์ ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารอัลคาลอยด์ เป็นสารที่ไม่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของพืชทุกชนิด (ประไพรัตน์, 2555)

10. การใช้สมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และกระตุนภูมิคุ้มกันในสัตว์ และ พลางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อต่างๆ

ในการศึกษาการเปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดลูกใต้ใบด้วยน้ำและ ethanol ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus agalactiae* ของ Amin และคณะ ในปี 2012 พบว่าการใช้น้ำเป็นตัวทำลายสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (20 mm. inhibition zone) และ *S. agalactiae* (12 mm. inhibition zone) ซึ่งความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในระดับสูงจากการใช้น้ำเป็นตัวทำลายของสารสกัดอาจเพราะมีปริมาณสารประกอบ Phenolic สูง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yin et al. (2004) ที่ศึกษา Phenolic compounds จากต้นโปกุกจี (*Psoralea corylifolia*) ในการยับยั้งแบคทีเรีย

สันธิวัฒน์ และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดหญ้าไตใบ (*Phyllanthus urinaria*) ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* การเจริญเติบโตและอัตราการรอดของกุ้งก้านกราม โดยใช้สารสกัดหญ้าไตใบที่ระดับความเข้มข้น 10 ระดับ คือ 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 กรัมเปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) พบว่าสารสกัดหญ้าไตใบที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.31 กรัมเปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. hydrophila* ในห้องปฏิบัติการได้ และที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อกรัม ทำให้กุ้งก้านกรามมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายสูงที่สุด

กัลยา (2540) ที่ได้รายงานไว้ว่าการได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดา (*Azadirachta indica*) เป็นระยะเวลานาน ส่งผลให้เนื้อเยื่ออปเลานิล้มีอาการบวมน้ำ เชลล์ตับตายในลักษณะเป็นหย่อมกระจายรอบเส้นเลือด มีการขยายตัวของไขนูชอยด์ เกิดการคั่งในเส้นเลือด พบการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุผิวขั้นในของเส้นเลือดและเกิดการอักเสบของเยื่อหุ้มตับร่วมด้วย

Adedapo et al. (2014) ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยน้ำของต้นลูกใต้ใบ (*P. amarus*) ในการรักษาหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย alloxan ให้เป็นโรคเบาหวานและมีความผิดปกติของลักษณะทางพยาธิสภาพเกิดขึ้น พบว่าหลังจากการได้รับสารสกัดเป็นเวลา 28 วัน สามารถช่วยรักษาความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับ ตับอ่อน และไต ของหนูหายจากการผิดปกติได้

Eweka and Enogieru (2011) ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากใบของต้นหลุกให้ไปต่อลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไตของหนู พบร่วมกับน้ำที่ได้รับสารสกัดจากหลุกให้ไปมีความผิดปกติเกิดขึ้น คือ มีภาวะเลือดคั่ง และมีการอักเสบของเนื้อเยื่อเกิดขึ้น

Phuong and Thieu (2013) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัด hairy abalone ให้ไปที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1 และ 1.5% ของน้ำหนักตัว ต่ออัตราการเจริญเติบโต ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและเยื่อบุทางเดินอาหาร พบว่าทำให้เกิดเพิ่มขึ้นต่อวัน และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ปราณี และคณะ ได้ศึกษาพิษเรื้อรังของของสารสกัดต้นหญ้าให้ไปพบว่าหนูขาวที่ได้รับสารสกัดจากต้นหญ้าให้ไป เป็นระยะเวลา 6 เดือน มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด และยังพบว่าสารสกัดยังส่งผลให้เกิดการอักเสบและการคั่งเลือดในเนื้อเยื่อไตของหนูขาวเพศผู้

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงนำต้นหลุกให้ไป (*Phyllanthus amarus*) ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับหญ้าให้ไป (*P. urinaria*) มาสกัด hairy abalone โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มที่ 1 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ที่เป็นเชื้อก่อโรคสำคัญในปลา尼ล และเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเป็น 5 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร เนื่องจากทุ่งก้ามกระมาที่ได้รับสารสกัดหญ้าให้ไป 5 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นกว่าความเข้มข้นอื่น และที่ระดับความเข้มข้น 10 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร เพื่อใช้เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ไม่พิษต่อปลา尼ล

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์

- ปลานิล อายุ 3 เดือน น้ำหนักประมาณ 60-68 กรัม จำนวน 360 ตัว
- กระชังปลา กว้าง 0.6 เมตร x ยาว 1.2 เมตร x สูง 1.5 เมตร
- อาหารเม็ดสำเร็จรูป
- เครื่องซึ่งสาร
- ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 250 และ 250 มิลลิลิตร
- กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 50 100 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- กระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman)
- Rotary evaporator (Resona)
- Freeze dryer (FTS system)
- น้ำมันกานพลู (Clove oil)
- ชุดเครื่องมือผ่าตัด
- หลอด Microcentrifuge ขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 ml
- Micropipette
- ปีเปต (Pipette)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roach)
- Light Microscope (Olympus)
- Eppendorf ขนาด 1.5 ml
- กระจะกสไลเดอร์ ขนาดมาตรฐาน 25x75 mm.
- Freeze dryer (FTS systems)
- Hot plate (Yellow line, yellow MAG HS7)
- Microplate reader และ Microplate 96-well
- Microcentrifuge (Hettich zentrifugen, Mikro 22R)
- Vortex mixer
- pH Meter (Metrohm, 713 pH meter)
- กระชังขนาด 0.6 เมตร x 1.2 เมตร x 1.5 เมตร

2. สารเคมี

- ไนโตรเจนเหลว
- Citric acid, C₆H₈O₇ (Ziggy)
- Disodium phosphate, Na₂HPO₄ (Riedel-de Haen)
- Sodium chloride, NaCl (วิทยาศรम)
- เซื้อ *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma)
- Bovine serum albumin, BSA (Fluka)
- Bradford reagent (Bio basic Canada inc.)
- Polyethylene glycol 6000, PEG (Unilab)
- Chicken egg white, Standard lysozyme (Fluka)
- Potassium chloride, KCl (Riedel-de Haen)
- Potassium di-hydrogen phosphate, KH₂PO₄ (Merck)
- Sodium di-hydrogen phosphate, NaH₂PO₄ (Unilab)
- Methanol (Riedel-de Haen)
- Deionize water (DI water)
- Distillation water
- Trizol (Invitrogen)
- Chloroform (Labscan)
- Isopropanal (Merck, Germany)
- 80% ethanol (Merck, Germany)
- Diethyl pyrocarbonate; DEPC (Bio basic INC.)
- Helix cript two-step RT PCR kit (Nanohelix)
- LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roach)
- Total Protein Kit, Micro Lowry (Sigma)

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมสารสกัดหยาบลูกได้ใบ

นำต้นลูกได้ใบทั้งราก ลำต้น ใน ลูกและดอก ล้างให้สะอาดแล้วหั่นให้ละเอียด จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 2 วัน หรือจนกว่าจะแห้ง บดด้วยครกให้ละเอียด นำไปชั่งน้ำหนักแห้ง แล้วแช่ในน้ำกลัน (อัตราพีซ : ตัวทำละลาย เท่ากับ 1 : 10) เป็นเวลา 2 วัน (48 ชั่วโมง) โดยใช้ด้วยเครื่อง Shaker 200 rpm ที่อุณหภูมิ 45°C ตลอดเวลา จากนั้นกรองเศษพีซ ออกด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และนำไประเหยตัวทำละลายออกเพื่อให้สารสกัดเข้มข้นด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50°C ทำให้แห้งด้วยกระบวนการ freeze dry ที่อุณหภูมิ -50°C ความดันต่ำกว่า 500 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมابดให้ละเอียด เก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น จะได้สารสกัดหยาบเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.2 การเตรียมปลาทดลอง

นำปลานิลอย่างประมาณ 3 เดือน พักไว้ในถังไฟเบอร์ขนาด 500 L เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ให้อาหารสำเร็จรูป วันละ 2 มื้อ (เข้าและเย็น) มีระบบให้อากาศและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันละ 20% และเปลี่ยนถ่ายน้ำ 100% สัปดาห์ละ 1 ครั้ง

3.3 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ประกอบด้วย 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ชิ้น (กระชัง) ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารเม็ดสำเร็จรูป (ชุดควบคุม) ไม่เติมสารสกัดลูกได้ใบ
 ชุดการทดลองที่ 2 สารสกัดลูกได้ใบ 1 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
 ชุดการทดลองที่ 3 สารสกัดลูกได้ใบ 5 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
 ชุดการทดลองที่ 4 สารสกัดลูกได้ใบ 10 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

โดยปลานิลที่เตรียมไว้จะถูกสุ่มปลานิลให้มีน้ำหนักอยู่ในช่วง 60-68 กรัม ลงกระชังขนาด 0.6 เมตร x 1.2 เมตร x 1.5 เมตร กระชังละ 30 ตัว เพื่อทำการทดลอง โดยปลานิลที่สุ่มลงในแต่ละกระชังมีน้ำหนักเริ่มต้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

3.4 การเตรียมอาหารปลา

ชั้นสารสกัดหมายลูกใต้ใบที่บดละเอียดแล้ว 0.3, 1.5 และ 3 กรัม ละลายน้ำ 15 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ฉีดพ่นลงบนอาหารปลาเม็ดสำเร็จรูปชนิดเม็ดคลอยน้ำ 300 กรัม ที่เกลี่ยให้เสมอ กันจนทั่ว เพื่อให้ได้อาหารปลาเคลือบสารกัดความเข้มข้น 1, 5 และ 10 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนอาหารชุดควบคุมให้ฉีดพ่นน้ำกลั่น ปริมาณ 15 มิลลิลิตร ผึ่งให้แห้งในที่ร่ม และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

3.5 การวิเคราะห์ผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อการเจริญเติบโต

ระยะเวลาการทดลองทั้งสิ้น 30 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองบันทึกความยาวมาตราฐาน ความยาวเหยียด น้ำหนัก ของปลาทุกตัว และบันทึกปริมาณอาหารที่ปลากินทั้งหมด วิเคราะห์หา เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (Percent of weight gain, %WG) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Food conversion rate, FCR) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, SGR) และอัตราการตาย

เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

$$= \frac{(\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง})}{\text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง}} \times 100$$

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ

$$= \frac{\text{น้ำหนักของอาหารที่ปลากิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}$$

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อตัวต่อวัน

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาทั้งหมด}} \times \frac{\text{จำนวนวันที่ทดลอง}}{\text{จำนวนวันที่ทดลอง}}$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

$$= \frac{(\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง})}{\text{จำนวนวันที่ทดลอง}} \times 100$$

AM
๖๖๖
๑๗๓
๑๔๙๕
๑๕๙
๑๖๙๘๖๔๑๙



สำนักหอสมุด

๑๕ มิ.ย. ๒๕๕๙

3. 6 การศึกษาผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อระบบภูมิคุ้มกัน

ในการวิเคราะห์ระบบภูมิคุ้มกัน ทำการเก็บตัวอย่างหลังจากเลี้ยงไปเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ กระชังละ 3 ตัว โดยสลบปลานิลด้วยน้ำมันกานพลู เข้มข้น 80 มิลลิกรัม ต่อ ลิตร (สำนักงาน ประมงจังหวัดพะเยา ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยา, ๒๕๔๙) ประมาณ ๕-๑๐ นาที เจาะ เสือดปลานิลบริเวณ caudal vein ด้วยเข็มขนาด 21G นำตัวอย่างเสือดไปปั่นให้วายที่ความเร็ว 5,000 rpm เพื่อเก็บซีรั่มไว้ใช้ในการวิเคราะห์ด้านภูมิคุ้มกันโรค โดยเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

3.6.1 วิเคราะห์ปริมาณ protein

เป็นการวัด total protein เพื่อใช้ในการหาปริมาณ total Immunoglobulin โดยใช้ชุดทดสอบโปรตีน total protein kit, Micro Lowry (Sigma) ตามวิธีของบริษัท ทำการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนทั้งหมดใน plasma กับสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (Sigma, St Louis, MO) ที่รู้ค่าความเข้มข้น

เตรียมสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ในบัฟเฟอร์ phosphate buffered saline ให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 0, 50, 100, 200, 300 และ 400 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร

นำ plasma มาวิเคราะห์ปริมาณ total protein โดยใช้ชุดทดสอบโปรตีน total protein kit, Micro Lowry (Sigma) ตามวิธีของบริษัท ด้วยการนำ plasma หรือสารละลายมาตรฐาน 60 ไมโครลิตร ผสมกับ lowry reagent 60 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 20 นาที และเติม folin 2 ciocalten's phenol reagent 30 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นให้วายที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไปวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500-800 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BSA

3.6.2 การวิเคราะห์ total Immunoglobulin

เป็นการวัดปริมาณ immunoglobulin ทั้งหมดที่มีอยู่ใน plasma ของปลา โดยใช้ชุดทดสอบโปรตีน Total Protein Kit, Micro Lowry (Sigma) ตามวิธีของบริษัท ทำการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนทั้งหมดใน plasma และปริมาณโปรตีนที่เหลือใน plasma หลังจาก ตกตะกอน immunoglobulin ด้วย 6% polyethylene glycol กับสารละลายมาตรฐาน BSA (Sigma, St Louis, MO) ที่รู้ค่าความเข้มข้น

เตรียมสารละลายน้ำ BSA ในบัฟเฟอร์ phosphate buffered saline ให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 0, 50, 100, 200, 300 และ 400 มิโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทำการทดสอบ immunoglobulin ใน plasma โดยนำ plasma จำนวน 72 มิโครลิตร ผสมกับสารละลาย 30% polyethylene glycol ปริมาตร 18 มิโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จะได้สารละลายใส่ด้านบนชั้นทดสอบ immunoglobulin ไปแล้ว จากนั้นทำการถูกด้วยเชือก plasma ที่ไม่ทดสอบใน plasma ที่ทดสอบ หรือสารละลายน้ำ BSA ปริมาตร 60 มิโครลิตร ลงในหลอดใหม่ เติม Lowry reagent 60 มิโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที และเติม folin 2 ciocalten's phenol reagent 30 มิโครลิตร ไม่โคลิกติร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 45 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถูกส่วนใสปริมาตร 50 มิโครลิตร ไปวัดค่าการถูกกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหักออกจากค่า total protein ที่ได้จากการรวมการที่ไม่ผ่านการทดสอบด้วย 30% polyethylene glycol เปรียบเทียบกับสารละลายน้ำ BSA

3.6.3 การวิเคราะห์ lysozyme activity

วิเคราะห์ค่าการทำงานอีนไซม์ lysozyme ตามวิธีการของ Kumari และ Sahoo (2006) ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบค่าการย่อยเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก *Micrococcus lysodeikticus* โดยตัวอย่าง serum กับการย่อยแบคทีเรีย *M. lysodeikticus* โดยสารละลายน้ำ BSA ไอลอไซซ์ (hen egg white lysozyme (Sigma, St Louis, MO) ที่รู้ค่าความเข้มข้น

เตรียมสารละลายน้ำไอลอไซซ์มิลลิกรัมในบัฟเฟอร์ 0.1 M phosphate citrate buffer (pH 6.0) ให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 มิโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารละลายน้ำไอลอไซซ์มิลลิกรัมในบัฟเฟอร์ 0.05 M phosphate citrate buffer (pH 5.8)

สร้างกราฟมิลลิกรัมของระดับอีนไซม์ โดยถูกสารละลายน้ำไอลอไซซ์ ตามความเข้มข้นที่เตรียมไว้ 10 มิโครลิตร ลงในไมโคเพลท หรือหยดตัวอย่าง serum 10 มิโครลิตร ลงในไมโคเพลทแต่ละช่อง จากนั้นหยดสารละลายน้ำไอลอไซซ์มิลลิกรัม 190 มิโครลิตร ลงไปผสมกับสารละลายน้ำ BSA หรือ serum จากนั้นทำการวัดค่าการถูกกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร หลังจากเขย่า นับเป็นค่าการถูกกลืนแสงที่เวลา 0 นาที และวัดค่าการถูกกลืนแสงอีกครั้งหลังจากเขย่าเป็นเวลา 30 นาที ทำการเปรียบเทียบระดับไอลอไซซ์ใน serum กับค่าการทำงานของสารละลายน้ำ BSA ไอลอไซซ์

3.6.4 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน Complement C3

ยีน Complement C3 เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งมีการแสดงออกมากที่ตับและม้ามของมนุษย์

ก. การสกัด total RNA

นำหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ที่เก็บตัวอย่างที่แช่ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ออกมาระลายในกล่องที่บรรจุน้ำแข็ง เพื่อให้เนื้อเยื่อของตัวอย่างค่อยๆ ละลายเติม Trizol 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ จากนั้นบดด้วยแท่งบดตัวอย่างให้ละเอียดหลังจากนั้นเติม Trizol 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทึ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติม Chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน (จนเห็นเป็นสีม่วงอ่อน) ตั้งทึ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที ต่อจากนั้นนำไปปั่นให้ยิ่งที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อปั่นให้ยิ่งแล้วสารละลายจะแยกชั้น ย้ายสารละลายส่วนใสที่อยู่ด้านบนใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ จากนั้นตั้งทึ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นให้ยิ่งที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะได้ตะกอนสีขาวติดอยู่บริเวณก้นหลอด ดูสารละลายที่ง่ายให้เหลือแต่ตะกอนสีขาวด้านล่าง จากนั้นล้างตะกอนด้วย 80% Ethanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้ยิ่งที่ความเร็วรอบ 12,500 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูสารละลายที่ง่ายจนเหลือแต่ตะกอนสีขาว แล้วตักตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ใช้เวลาประมาณ 15 นาที ละลายตะกอนด้วย DEPC โดยคำนวณปริมาตรจากปริมาณของตะกอนที่ได้ จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

ข. การวัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ใส่ลงใน DEPC water ด้วยอัตราส่วน Total RNA : DEPC water เท่ากับ 5 ไมโครลิตร : 1495 ไมโครลิตร (1:300) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm (A260) และ 280 nm (A280) โดยใช้ DEPC water เป็น Blank บันทึกผล ตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอ โดยหาอัตราส่วนของ A260 : A280 ถ้ามีค่าระหว่าง 1.65 – 1.85 แสดงว่ามีดีเอ็นเอป้อยู่ ถ้าได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าได้อาร์เอ็นเอบริสุทธิ์ และถ้าได้ค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือสารพิ็นอ่อนปนอยู่ในตัวอย่างอาร์เอ็นเอ และ คำนวณหาความเข้มข้นของ RNA โดยสามารถคำนวณได้จากสูตรต่อไปนี้

สูตรการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ

$$A260 \times 40 \times \text{Dilution factor} = \dots \mu\text{g/ml} \text{ หรือ } \text{ng}/\mu\text{l}$$

ค. การเปลี่ยนจาก Total RNA เป็น cDNA

เตรียมสารละลายที่มีส่วนผสมดังนี้

Total RNA 1 μ g	1 ไมโครลิตร
10 μ M dT-UPM	3 ไมโครลิตร
dNTP Mix (each 10 mM)	2 ไมโครลิตร
Water (Free nuclease)	7.5 ไมโครลิตร

ผสมสารข้างต้นให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำออกมาระบบน้ำแข็งทันที 5 นาที หรือจนกว่าจะเตรียมสารละลายผสมเสร็จ (ตาราง 2)

ตาราง 2 ส่วนผสมในการเตรียมสารละลายผสมโดยใช้ Helix cript two-step RT PCR kit (Nanohelix) ในการเปลี่ยน Total RNA เป็น cDNA

สาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
5X RT Reaction Buffer	4
0.1 M DTT	1
RNase inhibitor (40 unit/ μ l)	0.5
HelixCript Thermo Reverse Transcriptase	1
Total	6.5

เติมสารละลายผสมหลอดละ 6.5 ไมโครลิตร ลงในสารละลายที่วางไว้บนน้ำแข็งต่อจากข้อ 1 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ต่อด้วยที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 10 นาที, 50 องศาเซลเซียส 40 นาที และ 70 องศาเซลเซียส 10 นาที ตามลำดับ สามารถเก็บรักษา cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

ง. การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน Complement C3

ในการวิเคราะห์ครั้งนี้ใช้ β -Actin เป็นยีนอ้างอิง (Internal reference) เพื่อเป็นตัวมาตรฐานในการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของ mRNA ของยีน Complement C3 โดย Primers ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน β -Actin คือ

nActinF-RT : 5'-TGG CAA TGA GAG GTT CCG-3'

nActinR-RT : 5'-TGC TGT TGT AGG TGG TTT CG-3'

ขนาดของ PCR Product ที่ได้คือ 96 bp บริเวณที่ Primer เข้าไปเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอ (ภาพ 3)

Primer ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน Complement C3 คือ

nC3F-RT : 5'-TGT GAG TCT ACA GTG AGG AGC-3'

nC3R-RT : 5'-CCC AGA TCT AAA GCC ATT CTG-3'

ขนาดของ PCR Product ที่ได้คือ 195 bp บริเวณที่ Primer เข้าไปเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอ (ภาพ 4)

ใช้สารของ LightCycler ® 480 SYBR Green I Master ในการเตรียมสารละลายผสม (ตาราง 3) ผสมกับ DNA template 2 ไมโครลิตร โดยปริมาตรของสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 10 ไมโครลิตร

ตาราง 3 ส่วนผสมในการเตรียมสารละลายผสมในการเพิ่มปริมาณและตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Realtime RT-PCR

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
2x conc. LightCycler® 480 SYBR Green I Master	5
Primer forward (10μl)	0.25
Primer reverse (10μl)	0.25
Water PCR grade	2.5
Total	8

สภาวะการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ (PCR condition) ดังนี้

Pre-denature จำนวน 1 รอบ

ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 10 นาที

Amplification จำนวน 40 รอบ

ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 15 วินาที

ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 15 วินาที

ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 20 วินาที

Melting จำนวน 1 รอบ

ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 15 วินาที

ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 15 วินาที

Cool จำนวน 1 รอบ

ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 30 วินาที

หลังจากนั้นทำการบันทึกข้อมูลเพื่อนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีน Complement C3 โดยทำการวิเคราะห์ Melting temperature (TM) จำแนก Specific และ Non-specific PCR product ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ถูกต้องนักจะแสดง Peak เดียวที่อุณหภูมิสูง ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการจับแบบไม่จำเพาะ (Non-specific product) หรือ Primer-dimer จะให้ Peak ที่มีขนาดกว้างที่อุณหภูมิต่ำ (กำพล, 2555) (แสดงในภาคผนวก) วิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนด้วย Pfaffl method (Pfaffl, 2001) โดยคำนวณสัดส่วนระดับการแสดงออกของยีนจากสมการ

$$\text{ratio} = \frac{(E_{ref})^{CP_{sample}}}{(E_{target})^{CP_{sample}}} \div \frac{(E_{ref})^{CP_{calibrator}}}{(E_{target})^{CP_{calibrator}}}$$

1 acagctaacg gattcaactt gaggccgtc acactcacat ctttgtgcggg atatcatatt
61 cctgaaaccg ttcccattaa agcgaaaagc cccccaccca aagttcagcc atgaaagatg
121 aaatcgccgc actgggtgtt gacaacggat ccggtatgtc caaggccgga ttcgccggag
181 acgacgcccc tcgtgcgtc ttccccctcca tcgtcggtcg ccccaggcat cagggtgtga
241 tgggggtat gggtcagaaa gacagctacg ttgggtgtatga ggccccagage aagagaggta
301 teetgaccat gaagtacccc attgagcacg gtattgtgac caactggat gacatggaga
361 agatctggca tcacacccctt tacaacggc tgagagtgc ccctgaggag catcccgtcc
421 tgctcacaga ggctcccctg aaccccaaag ccaacaggga gaagatgacc cagatcatgt
481 tcgagacccctt caacacccccccc gcacatgtacg ttgcacatcca ggctgtgcgt tccctgtacg
541 cctctggtcg taccactggt atcgcatgg actccgggtga tgggtgtgacc cacacagtgc
601 ccatctacga gggttatgcc ctgccccacg ccatctcgcc tctggacctg gctggccgtg
661 acctcacaga ctacccctatg aagatcttgatg cagagcggtgg ctactccctt accaccacag
721 cccgagaggga aatcggtcgt gacatcaagg agaagctgtg ctacgtcgcc ctggacttgc
781 agcaggagat gggcaccgtgc ctcccttctt cctccctggga gaagagttac gagctgcctg
841 acggacaggat catcaccattt ggcataatggaga ggtttccgttgc ccctgaggcc ctcttcaggc
>>>>>>>>>>
Primer nActinF-RT
901 cttccttcct tggatggaa tcttcggaa tccacgaaac cacctacaac agcatcatga
<<<<<<<<<<<<<<<<
Primer nActinR-RT
961 agtgcgacgt cgacatccgt aaggacctgt acgccaacac cgtgcgtct ggaggtacca
1021 ccatgtaccc tggcategtgc gacaggatgc agaaggagat cacagccctg gccccatcca
1081 ccatgaagat caagatcata gccccacctg agcgtaaata ctccgtatgg atcggaggct
1141 ccatcctggc ctccctgtcc accttccagc agatgtggat cagcaagcag gagtacgtat
1201 agtccggccc ctccatcgtc caccgcaaat gtttctaaac agactgttcc ttctccctt
1261 ccccaaccaa acgcccaca acttcagctc tttgcaaaac aaccacacac cacatattc
1321 tcatacacaaa cteaggcgc aagaatagat gaccaactca ttggcatggc ttcatgttatt
1381 tttggcgctt gactcaggat taaaaaaaa aactggaaacg atgaaggaga cagtaatgtt
1441 tttggctagg ttttaaaaaaa gacaccccaag gtttctgcag ttcctatgttgg ggcttaaaaa
1501 aaaatgtaca tttttttttt ctttaagtca ttccaaatgt ttgttaactt cattgttcag
1561 acacatgtattt ccaaattttt acttgcattt ttcagatcttt tttttgtttt ttttttgg
1621 gccccatgttgg tggcgcatac ttaacatgtt tttttttttttt tttttttttt ttttttttt
1681 gggttttttt tttttttttttt tttttttttttttt tttttttttttttttt ttttttttttt
1741 atgcacccccc tcacccatgtt tttttttttttt tttttttttttttttt ttttttttttt
1801 ccgtggggca aggggggttc tcggatgtatgat ggggttaaca tgggggttc gaccgggtgg
1861 gccaacctgt acactgacta aacaatccca ataaagtgc aatgtgttcc gaa

ภาพ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน β -Actin และบริเวณที่ Primer nActinF-RT และ Primer nActinR-RT เข้าไปจับกับ DNA template

```

3841 tcaggccacg atgacagtgt accaggcaat agcagagta cggaccagtg aaaaagagcc
3901 agagtacgat ctgaatgtgg acatcttgtt gccggggagg tcaaagcctg acaaatacaa
3961 cttaactgg gataaccact ttgctacaag aacatctaaa atcaacgtca taaaccaaga
4021 cgtgaaagtg tcagccacag gaccaggaga agcaacactg acgataactt cgctgtattt
4081 tgaactgcct aaagaaaaag aaaacaactg tcagaaattt aacctgtcag tgcagtcct
4141 tccagagtcg ctgggtgatg atgaaaatat otacaacctg aaaattaagg ttttctataa
4201 gaacaaggag chtaatgca ccacaccagt ctggatatt ggcttgccta ctggttcac
4261 tggtagcaca aaagatttag atttacaage caaaggccat gcccgcacta tttccaaata
4321 caggctgaac agtgagtca agagacgctt gcteacaatc tacctgaaca aagttcotta
4381 cacggagctg gagattgcct ttagggtcca tcagaaactg aaagtggca ttctacaacc
4441 agctgtgtat tatgtctacg aattcagtga ccagctacaa agtgattata caaatgtgt
4501 gagatttat catccagaga gaaaagctgg agagctgtc cgctctgtia gaaatgtga
4561 atgcataatgt gctgaagaga actgttagtat gcagaagaag gaaaaatca acaatgtga
4621 acgcaaaagat aagatttgtg agtctacagt gaggagcaaa atagattatgt catacaaagt
>>>>>>>>>>>>>>>>>>
Primer nC3F-RT
4681 gagcgtggaa cagtttgcag atgggttgc cacagacatt tacacagtgc aggtgttgg
4741 agtcatcaaa gaaggaagtt atgatgtggg tgcteagggt agacagcgc aatcttagg
4801 ttatccacac tgcagaatgg cttagatct gggagttggc aaaaccttcc ttatgtggg
<<<<<<<<<<<<<<<<<
Primer nC3R-RT
4861 aacatctgga gatattttca aagatgaaaa ggtcaatcg tattcgtatg tccttggta
4921 gagaacctgg attgagtact ggcctacagt gacagaatgt acaactgagg aacataattc
4981 tacctttca gccattgacg agatggtaa tgaatacatg atccgaggat gtcgaaatta
5041 gtgaaactga agagaataaa aataatctat aatgtttt taaaggtta gtaagacact
5101 tctttaaaaa aggcaaacaa aaacctgcct tagcaacace aagagttagg ctatcttcc
5161 aaaggagaaa ataaagaaaa aatcataaac tgtatattaa agacagactt ccaggtctga
5221 agtgaagcga gtgaggaagt gtcttaatg tgcatttcc caccatatecc caaatgtgcc
5281 ctgttggact gagacagaaa gacaggaaga tgaagacagg caagaataga actggctcgc
5341 tgtaaggaga taacaggtga attttcaag tagtatacag aaacataatg acttactcca
5401 catttatatt acatttgaa aaaatacagt gtaaatggta cctatattt aacgaacatg
5461 taagaattgt ttgtaaaact tataacatca tgcacatca tgcgtacgaa ggtggtaat
5521 agatagttaa taataacaat aataaaaatgt cagcatgttt acccatgtta caagaaataa
5581 aattatataa cctga

```

ภาพ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน Complement C3 และบริเวณที่ Primer nC3F-RT และ Primer nC3R-RT เข้าไปจับกับ DNA template

3.7 การวิเคราะห์ผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อลักษณะทางกายภาพ

ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับ และไต ใส่ในสารละลาย 10% formaldehyde buffer ทันที แช่ไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำขึ้นเนื้อมาล้างด้วยน้ำที่หมุนเวียนอยู่ตลอดเวลาเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้น้ำยาตรึงสภาพถูกขับออกไปจากขึ้นเนื้อ นำเนื้อเยื่อที่ล้างเสร็จแล้วไปจัดน้ำออกจาก เนื้อเยื่อตัวอย่าง ethyl alcohol ตามลำดับความเข้มข้น จากความเข้มข้นน้อยไปความเข้มข้นมาก 25, 50, 70, 80, 95 และ 100% 2 ครั้ง อย่างละ 1 ชั่วโมง นำเนื้อเยื่อที่ล้างด้วย ethyl alcohol ตามลำดับแล้ว จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปล้างด้วย xylene ตามลำดับความเข้มข้น จากความเข้มข้นน้อยไป หาความเข้มข้นมาก 25, 50, 70, 80 และ 100% 2 ครั้ง อย่างละ 2 ชั่วโมง นำเนื้อเยื่อที่ได้ไปแข็งใน สารละลายพาร์ฟิน paraffin: xylene ที่อัตราส่วน 25: 75, 50: 50, 75: 25 และ 100% paraffin 2 ครั้ง อย่างละ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ นำเนื้อเยื่อที่ได้มาฝังตรึงด้วย 100% paraffin ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตัดขึ้นส่วนให้มีความหนาประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ทาสไลเดอร์ที่ทำความสะอาดแล้วด้วย น้ำยาทาสไลเดอร์ ให้พอเป็นพิล์มบางๆ ตั้งทึบไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ใช้ dropper หยดน้ำกลิ้นลงตรง กึ่งกลางของสไลเดอร์ที่ทา水สไลเดอร์ไว้แล้ว 1 หยด ใช้ปลายพู่กันค่อยๆ แตะขึ้นส่วนที่ตัดแล้วขึ้นวาง บนกึ่งกลางของหยดน้ำ อุ่นสไลเดอร์ ยกสไลเดอร์อุ่นเพื่อให้หยดน้ำไหลออกเสร็จแล้วให้แห้ง วางสไลเดอร์ไว้บน เครื่อง magaslide ตลอดทั้งคืน ย้อมสีด้วย haematoxylin & eosin (H&E) วัดความยาวของ intestinal villi ที่พบในลำไส้ส่วนต้นและส่วนกลาง อย่างละ 10 เส้น เพื่อหาค่าเฉลี่ย และนับจำนวน goblet cell ที่พบภายในตัวอย่าง

3.8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

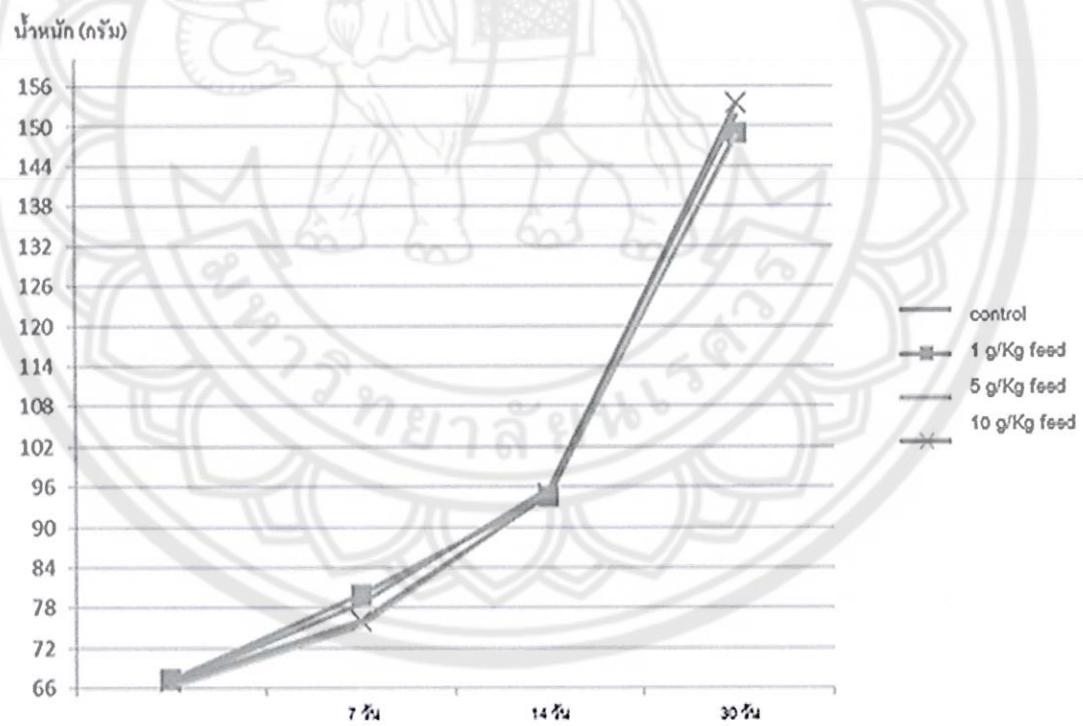
เปรียบเทียบความความแปรปรวน (Analysis of variances, ANOVA) ของปลาแต่ละ ชุดทดลอง และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าสั่งเกตตั้งกล่าวโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลของสารสกัดหยาบลูกใต้ใบต่ออัตราการเจริญเติบโตของป้านิล

จากการทดลองเลี้ยงป้านิลซึ่งมีน้ำหนักเริ่มต้นการทดลองอยู่ในช่วง 60-68 กรัม ลงกระชังขนาด $0.6 \text{ เมตร} \times 1.2 \text{ เมตร} \times 1.5 \text{ เมตร}$ กระชังละ 30 ตัว ด้วยอาหารเม็ดเคลือบสารสกัดหยาบตันลูกใต้ใบที่ระดับความเข้มข้น 0 (Control) 1 5 และ 10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบตันลูกใต้ใบที่มีต่อการเจริญเติบโตของป้านิล พบร่วมด้วยสิ่นสุดการทดลองป้านิลในทุกชุดการทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายอยู่ในช่วง 148-153 กรัม เมื่อวิเคราะห์พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) โดยป้านิลในชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดหยาบตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายสูงที่สุด คือ 153.480 ± 5.483 กรัม และน้ำหนักของป้านิลจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดการทดลอง



ภาพที่ 5 กราฟน้ำหนักเฉลี่ยของป้านิลที่ได้รับสารสกัดหยาบตันลูกใต้ใบที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight gain; WG)

ปานิลในทุกชุดการทดลองมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ปานิลในชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดหมายบตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหารมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงที่สุด คือ 86.597 ± 5.540 กรัม และปานิลในชุดการทดลองที่ได้รับปริมาณสารสกัดหมายบตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่ำที่สุดคือ 81.668 ± 9.189 กรัม

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (Average diary growth; ADG)

ปานิลในทุกชุดการทดลองมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวันไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ปานิลในชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดหมายบตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวันสูงที่สุด คือ 2.887 ± 0.185 กรัมต่อวัน และปานิลในชุดการทดลองที่ได้รับปริมาณสารสกัดหมายบตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวันต่ำที่สุด คือ 2.722 ± 0.306 กรัมต่อวัน

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate; SGR)

ปานิลในทุกชุดการทดลองมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) โดยปานิลที่ได้รับสารสกัดหมายบตันลูกใต้ใบที่ระดับความเข้มข้น 10 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด คือ 2.765 ± 0.121 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน และปานิลในชุดการทดลองที่ได้รับปริมาณสารสกัดหมายบตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำที่สุด คือ 2.637 ± 0.218 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed conversion ratio; FCR)

ค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปานิลที่ได้รับสารสกัดหมายบตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร มีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำที่สุด คือ 0.786 ± 0.033 ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) จากปานิลในชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดหมายบตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 1 และ 10 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร แต่ปานิลในชุดควบคุมมีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูงที่สุด คือ 0.817 ± 0.084

อัตราการรอดชีวิต (Survival rate)

เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะพบว่าปลา尼ลในทุกชุดการทดลองมีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) และยังพบว่าปลา尼ลในชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดหมายบตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดที่สุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่นๆ คือ 95.6 ± 2.94 เปอร์เซ็นต์

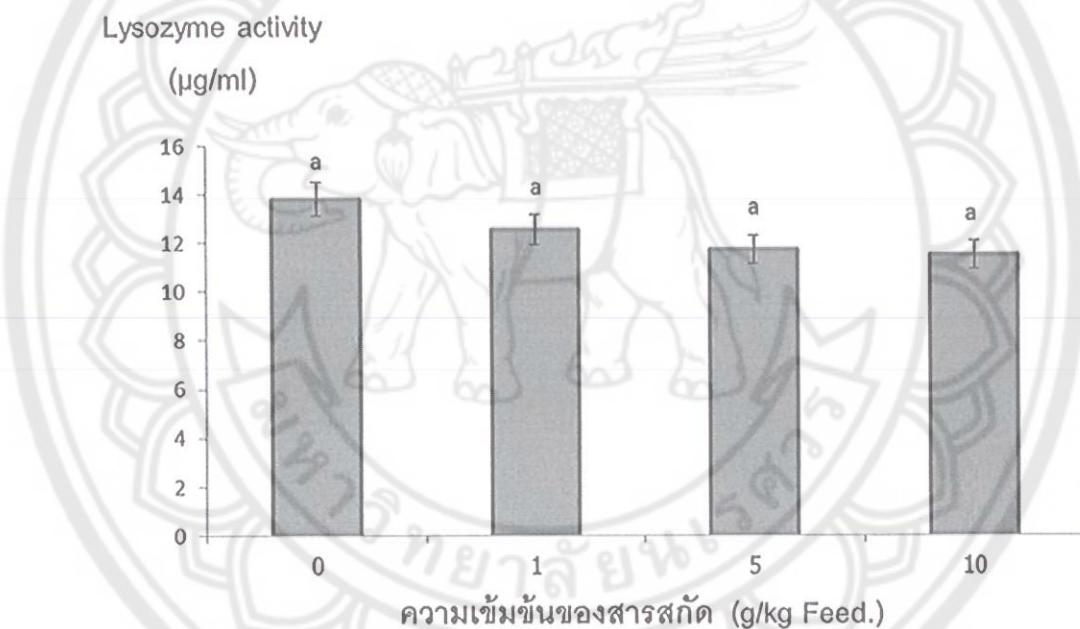
ตารางที่ 4 น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการรอดชีวิตของปลา尼ลในแต่ละชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดหมายบตันลูกใต้ใบที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

พารามิเตอร์	ชุดการทดลอง			
	0 g/kg (control)	1 g/kg	5 g/kg	10 g/kg
น้ำหนักเริ่มต้น	66.85 ± 0.29	67.27 ± 0.24	66.39 ± 0.59	66.88 ± 0.09
น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (g)	151.65 ± 10.06	148.94 ± 8.97	148.55 ± 1.45	153.48 ± 5.48
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (g.)	84.79 ± 10.36	81.67 ± 9.19	82.16 ± 1.12	86.59 ± 5.54
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (g/day)	2.83 ± 0.35	2.72 ± 0.31	2.74 ± 0.04	2.89 ± 0.19
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Percent per day)	2.72 ± 0.24	2.64 ± 0.22	2.69 ± 0.03	2.77 ± 0.12
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	0.82 ± 0.08	0.79 ± 0.07	0.79 ± 0.03	0.79 ± 0.03
อัตราการรอดชีวิต (Percent)	88.89 ± 4.44	92.22 ± 2.22	91.11 ± 2.94	95.56 ± 2.94

2. ผลของสารสกัดหมายบลูกใต้ใบต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลาโนล

2.1 Lysozyme activity

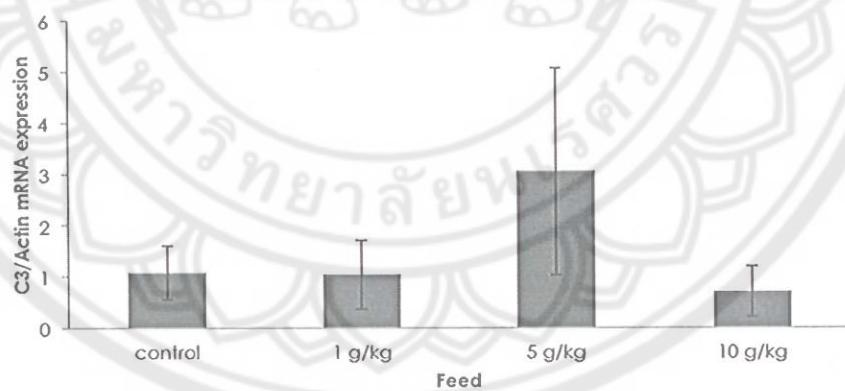
จากการทดสอบสารสกัดหมายบลูกใต้ใบต่อปริมาณ Lysozyme activity พบร่วมกับ Lysozyme activity ในอาหารที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดหมายบลูกใต้ใบความเข้มข้น 0, 1, 5 และ 10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีปริมาณ Lysozyme activity เฉลี่ย 12.56 ± 0.64 , 11.72 ± 0.62 และ 11.49 ± 0.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และชุดควบคุมซึ่งไม่ได้ผสมสารสกัดในอาหาร มีปริมาณ Lysozyme activity เฉลี่ย 13.83 ± 1.37 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อนำมาเปรียบเทียบทางสถิติ พบร่วมกับ Lysozyme activity ของชุดทดลองไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ภาพที่ 6)



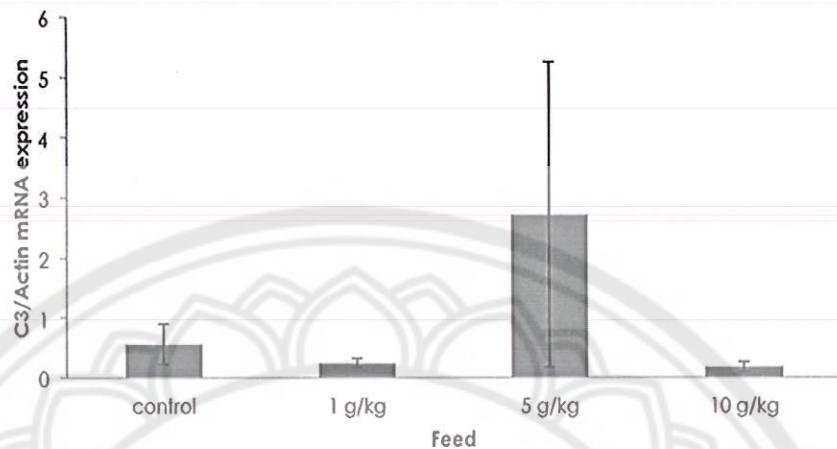
ภาพที่ 6 Lysozyme activity ของปลาโนลที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดหมายบลูกใต้ใบระดับต่างๆ

2.3 ผลของสารสกัดหยาบลูกใต้ใบต่อการแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับและม้ามของปลา尼ล

จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบลูกใต้ใบต่อการแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับและม้ามของปลา尼ล ด้วยเทคนิค Real-time RT PCR โดยพิจารณาการแสดงออกจากตับและม้ามของปลา尼ลที่ได้รับสารสกัดหยาบลูกใต้ใบในปริมาณที่แตกต่างกันคือ 0, 1, 5 และ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยใช้ β -Actin เป็น Internal control ตรวจสอบการแสดงออกของยีน Complement C3 ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR พบว่าการแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับทุกชุดทดลองมีการแสดงออกของยีนที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.161$) แต่ในชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีระดับการแสดงออกของยีนมากที่สุด เท่ากับ 3.05 ± 2.01 ในขณะที่ชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีระดับการแสดงออกของยีน เท่ากับ 1.08 ± 0.52 และ 1.05 ± 0.67 ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีระดับการแสดงออกของยีนต่ำที่สุด คือ 0.71 ± 0.49 (ภาพที่ 8) และพบว่าผลของการแสดงออกของยีนรองจากตับก็ให้ผลการทดลองเข่นเดียวกัน โดยทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.245$) (ภาพที่ 9)



ภาพ 8 การแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับ ที่ได้รับสารสกัดหยาบลูกใต้ใบในปริมาณที่แตกต่างกัน



ภาพ 9 การแสดงออกของยีน Complement C3 ในม้าม ที่ได้รับสารสกัดหยาบลูกใต้ใบในปริมาณที่แตกต่างกัน

3. ผลของสารสกัดหยาบลูกใต้ใบต่อลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและไตในป岚尼ล

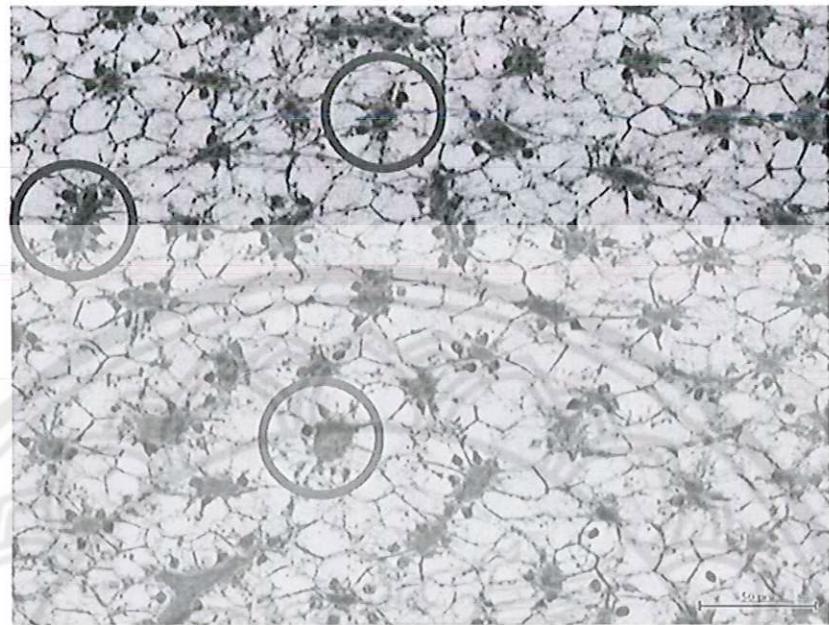
จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบลูกใต้ใบต่อลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและไตในป岚尼ล พบว่าในเนื้อเยื่อตับป岚尼ลชุดควบคุมมีเลือดคั่งภายในเส้นเลือดไซนูซอยด์ ซึ่งเป็นเส้นเลือดขนาดเล็กที่กระจายตัวอยู่ ทั่วไปในเนื้อเยื่อตับ (ภาพที่ 10) ในป岚นิลกลุ่มที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ลักษณะที่พบไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แต่พบว่าเส้นเลือดไซนูซอยด์มีขนาดใหญ่ขึ้น และพบ melanomacrophage สีน้ำตาลเข้มกระจายอยู่ทั่วไปและพบว่ามีเลือดออกในบางบริเวณของเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 11) ส่วนป岚นิลกลุ่มที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบที่ระดับความเข้มข้น 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่าเส้นเลือดไซนูซอยด์มีขนาดใหญ่ขึ้นจนสามารถเห็นได้ชัดเจน พบรกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย Neutrophil แทรกตัวอยู่กับเซลล์ตับ และพบว่ามีเลือดออกในบางบริเวณของเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 12) และป岚นิลกลุ่มที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบที่ระดับความเข้มข้น 10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ลักษณะที่พบไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร คือ พบว่าเส้นเลือดไซนูซอยด์มีการขยายขนาดขึ้นเนื่องจากการคั่งของเลือดภายในเส้นเลือด เซลล์ตับบางเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากการสะสมไขมันภายในเซลล์ และพบว่ามีเลือดออกบางบริเวณของเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 10 เนื้อเยื่อตับของป้านิลชุดควบคุม ที่กำลังขยาย 40X



ภาพที่ 11 การมีเลือดคั่งในเส้นเลือดไขนูซอยด์ของเนื้อเยื่อตับของป้านิลที่ได้รับสารสกัดหยาบตัน
ลูกใต้ใบ ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร ที่กำลังขยาย 40X

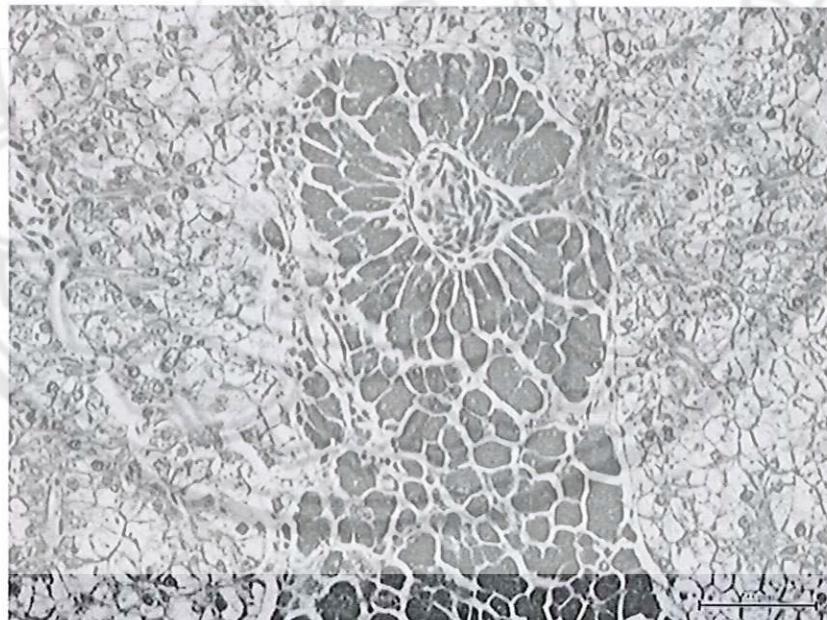


ภาพที่ 12 กลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย Neutrophil ในเนื้อเยื่อตับของป้านิลที่ได้รับสารสกัด
หยาบตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อกรัมอาหาร ที่กำลังขยาย 40X



ภาพที่ 13 การมีเลือดคั่งในเส้นเลือดไขนูชอยด์ของเนื้อเยื่อตับของป้านิลที่ได้รับสารสกัดหยาบ
ตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อกรัมอาหาร ที่กำลังขยาย 40X

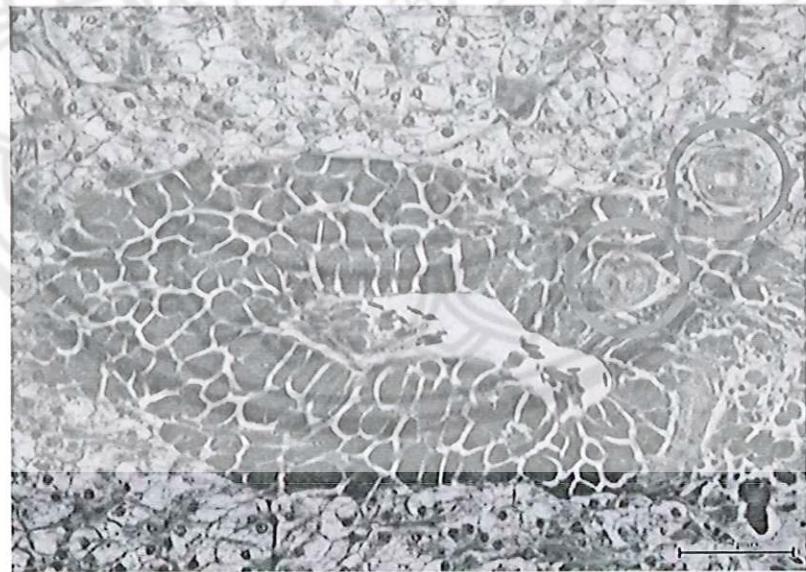
จากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบตันลูกใต้ใบในระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนซึ่งปานิลเป็นปลาที่พบว่ามีเนื้อเยื่อตับอ่อนแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อตับ พบร่วมๆ ชุดควบคุม ตับอ่อนมี zymogen granule ที่ย้อมติดสีชมพูอยู่ใน acinar cell มี Fibroblast แทรกตัวเข้ามาเป็นแนว และไม่พบส่วนของ melanomacrophage ในตับอ่อน (ภาพที่ 14) ที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัม ต่อกิโลกรัมอาหาร พบร่วมมีปริมาณ zymogen granule ที่สะสมใน acinar cell เพิ่มขึ้นจากเดิม (ภาพที่ 15) และที่ระดับความเข้มข้น 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบร่วมมี fibroblast แทรกตัวเข้ามาในเนื้อเยื่อตับอ่อน และมีการสะสมของ zymogen granule มากขึ้นจึงส่งผลให้ acinar cell มีขนาดใหญ่ขึ้นจากเดิมเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย Neutrophil แทรกตัวอยู่และพบการตายของเซลล์แบบ necrosis เกิดขึ้น (ภาพที่ 16) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบร่วมมี fibroblast เข้ามาโอบล้อมรอบเนื้อเยื่อตับอ่อน acinar cell มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบจากตับอ่อนของปลาที่ได้รับสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เนื่องจากมีการสะสมของ zymogen granule มากขึ้น และพบร่วมมีการตายของเซลล์แบบ necrosis เกิดขึ้น (ภาพที่ 17)



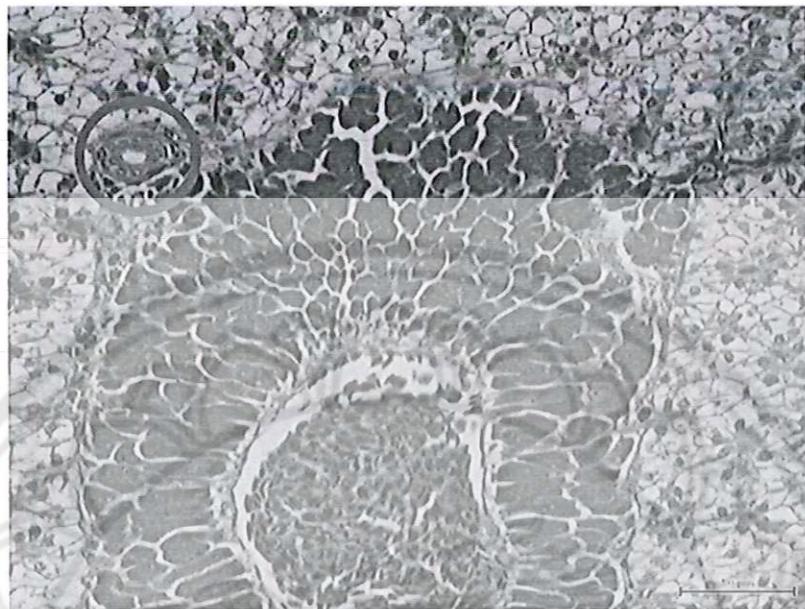
ภาพที่ 14 เนื้อเยื่อตับอ่อนของปานิลชุดควบคุม ที่กำลังขยาย 40X



ภาพที่ 15 zymogen granule ที่อยู่ใน acinar cell ของเนื้อเยื่อตับอ่อนของปลานิลที่ได้รับสารสกัดหมายต้นลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ที่กำลังขยาย 40X



ภาพที่ 16 การตายของเซลล์แบบ necrosis ในเนื้อเยื่อตับอ่อนของปลานิลที่ได้รับสารสกัดหมายต้นลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ที่กำลังขยาย 40X



ภาพที่ 17 การตายของเซลล์แบบ necrosis ในเนื้อเยื่อตับอ่อนของป้านิลที่ได้รับสารสกัดหยาบตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อกรัมอาหาร ที่กำลังขยาย 40X

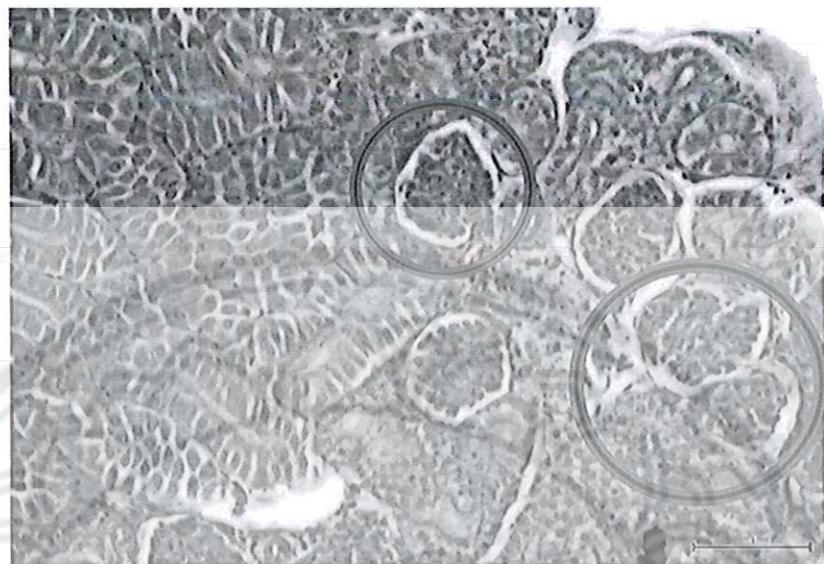
ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบตันลูกให้ไปในระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อเนื้อเยื่อไต มีดังนี้ ในชุดควบคุม เนื้อเยื่อไตพบว่ามีห่อไตส่วนต้น และห่อไตส่วนปลาย รวมทั้ง glomerulus ที่ประกอบด้วยเซลล์เลือดฟ้อยบรรจุอยู่ ใน Bowman's capsule ซึ่งทุกส่วนนี้อยู่ในสภาพะปกติ (ภาพที่ 18) เมื่อป้านิลได้รับสารสกัดหยาบตันลูกใต้ใบที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่อกรัมอาหาร Glomerulus อยู่ในสภาพะปกติ ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (ภาพที่ 19) เมื่อป้านิลได้รับสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 5 กรัมต่อกรัมอาหาร พบร่วมกับการขาดตัวของเส้นเลือดฟ้อยจนเห็นว่า Glomerulus มีขนาดเล็กลง ทำให้สามารถมองเห็น Bowman's space ในบริเวณที่กว้างขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และพบว่ามีเลือดคั่งในบางบริเวณของเนื้อเยื่อไต (ภาพที่ 20) ที่ระดับความเข้มข้น 10 กรัมต่อกรัมอาหาร พบร่วมกับ Glomerulus มีการขาดตัวมากกว่าเดิมจนเห็นว่ามีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัด 5 กรัมต่อกรัมอาหาร และพบว่ามีเลือดคั่งในหลายบริเวณของเนื้อเยื่อไต (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 18 เนื้อเยื่อไตของป้านิลควบคุม ที่กำลังขยาย 40X



ภาพที่ 19 Glomerulus ในเนื้อเยื่อไตของป้านิลที่ได้รับสารสกัดหมายบตันลูกใต้ใบ
ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร ไม่มีการหดตัว ที่กำลังขยาย 40X



ภาพที่ 20 การหดตัวของ Glomerulus ในเนื้อเยื่อไตของปลา尼ลที่ได้รับสารสกัดหยาบ
ตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ที่กำลังขยาย 40X



ภาพที่ 21 การหดตัวของ Glomerulus ในเนื้อเยื่อไตของปลา尼ลที่ได้รับสารสกัดหยาบ
ตันลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ที่กำลังขยาย 40X

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองเลี้ยงป้านิลด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปเคลือบสารสกัดหยาบตันลูกใต้ในเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบร่วมป้านิลที่ได้รับอาหารเม็ดผสมสารสกัดหยาบลูกใต้ในที่ระดับความเข้มข้น 1, 5 และ 10 กรัมต่อกิโลกรัม อาหาร มีอัตราการเจริญเติบโต ทั้งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการลดชีวิตไม่แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดควบคุมที่ได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมสารสกัด และพบว่าป้านิลในชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดหยาบจากตันลูกใต้ในที่ระดับความเข้มข้น 10 กรัมต่อกิโลกรัม มีแนวโน้มว่ามีอัตราการลดตายสูงที่สุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสันธิรัตน์ และคณะ (2553) ที่ได้รายงานไว้ว่าผลของสารสกัดหญ้าใต้ใน (*P. urinaria*) ชื่อยูไนวงศ์เดียวกันกับตันลูกใต้ใน (*P. amarus*) ที่ระดับความเข้มข้น 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารทำให้กุ้งก้ามกรามมีอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการลดตายจากการติดเชื้อ *A. hydrophila* สูงที่สุด และงานวิจัยของ Phuong and Thieu (2553) ที่ใช้สารสกัดลูกใต้ในที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1 และ 1.5 % ของน้ำหนักตัว กับໄก์โตเต้มวัย พบร่วมไก่ที่ได้รับสารสกัด มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ “ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)”

จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบลูกใต้ในยังมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในป้านิลบางอย่าง พบร่วมป้านิลที่ได้รับสารสกัดหยาบลูกใต้ในที่ระดับความเข้มข้น 1, 5 และ 10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีปริมาณ Lysozyme activity ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ทั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yin และคณะ (2005) พบร่วมป้านิลที่ได้รับอาหารผสมสารสกัด *Haung Qin (Scutellaria radix)* ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0% เป็นเวลา 4 สัปดาห์ “ไม่มีผลต่อปริมาณ Lysozyme activity ของป้านิลตลอดการทดลอง เช่นเดียวกัน”

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบลูกใต้ในสามารถกระตุ้นให้ป้านิลมีการสร้าง Total-Immunoglobulin “ได้เพิ่มขึ้น โดยพบร่วมป้านิลที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบลูกใต้ใน ความเข้มข้น 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีปริมาณ Total Immunoglobulin แตกต่างจากชุดควบคุม ซึ่งได้รับอาหารที่ไม่ได้ผสมสารสกัดหยาบลูกใต้ใน และกลุ่มทดลองที่อาหารผสมสารสกัดหยาบลูกใต้ใน ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นไปในทำนองเดียวกับการศึกษาของ Harikrishnan และคณะ (2011) ซึ่งทำการศึกษาการเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันในปลา Longtooth grouper (*Epinephelus bruneus*) โดยให้ปลากินอาหารผสมสารสกัด Indian Lettuce (*Lactuca indica*) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 1.0 และ 2% พบร่วมที่ความเข้มข้น 1.0 % สามารถเพิ่มปริมาณ Total Immunoglobulin ในพลาสมา “ได้ตั้งแต่อาทิตย์แรกจนถึงอาทิตย์ที่ 4 ของการทดลอง”

แทรกอยู่ตามบริเวณต่างๆ ในเนื้อเยื่อไต ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการตอบสนองต่อการอักเสบเรื้อรังของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการหดตัวของ glomerulus ทำให้มี Bowman's space ที่กว้างขึ้น เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของปราณี และคณะ พบร่วมกันที่ได้รับสารสกัดจากต้นหญ้าใต้ใบ มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด และยังพบว่าสารสกัดยังส่งผลให้เกิดการอักเสบและการคั่งเลือดในเนื้อเยื่อไตของหนูขาวเพศผู้ด้วยงานวิจัยของวนาน้อย (2556) รายงานไว้ว่าผลของการสกัดลูกใต้ใบส่งผลให้มีกลไกที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ตับในหนูขาว และรายงานการศึกษาของ Eweka และ Enogieru (2011) ที่พบว่าเนื้อเยื่อไตของหนูวิสตาร์ได้เติบโตที่ได้รับสารสกัดจากลูกใต้ใบมีความผิดปกติเกิดขึ้น คือ มีภาวะเลือดคั่ง และมีการอักเสบของเนื้อเยื่อเกิดขึ้น

ผลการทดลองซึ่งให้เห็นว่า ปานิลที่ได้รับสารสกัด hairy root ต้นลูกใต้ใบที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 กรัมต่อ กิโลกรัม อาหาร สามารถกระตุนให้ปานิลมีภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นทั้งในระดับของยืนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนคอมพลีเมนต์และปริมาณแอนติบอดี อีกทั้งที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 10 กรัมต่อ กิโลกรัม อาหาร ยังเพิ่มอัตราการลดชีวิตของปานิลได้อีกด้วย การได้รับสารสกัดลูกใต้ใบ เป็นระยะเวลานานก็ไม่ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโต แต่อาจมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและไตของปานิลเล็กน้อยในปานิลที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อ กิโลกรัมอาหาร แต่ไม่มีความแตกต่างกับชุดควบคุม ดังนั้นการใช้สารสกัดลูกใต้ใบในการกระตุนระบบภูมิคุ้มกันของปานิลจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับเกษตรในการใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษารังนี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการการศึกษาและหาแนวทางในการป้องกันโรคในปานิลได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

กันพิมานี พันธุ์วิเชียร. (2535). พยาธิวิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

กรมประมง. (25 มกราคม 2555). สถานการณ์เศรษฐกิจปานี ล. กรมประมงเกษตรกลาง สืบค้นเมื่อ 23 มีนาคม 2558, จาก http://fishco.fisheries.go.th/fisheconomic/situation/Tilapia_main.html,

กองประมงต่างประเทศ. (25 มกราคม 2555). ข้อมูลการส่งออกสินค้าประมง. กรมประมงเกษตรกลาง สืบค้นเมื่อ 23 มีนาคม 2558, จาก <http://www.fisheries.go.th/foreign/index.php>

ชนกันต์ จิตมนัส. (2556). ผลของผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรต่อภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ. วารสารวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 18(2), 257-269.

นวน้อย จุฑะพงษ์. (2556). ฤทธิ์ของลูกใต้ใบต่อหน้าที่ของไม้ตอกอนเตรียมในตับหมูขาว. วิทยานิพนธ์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.

บุณฑริกา ศิริ. (2556). สารชาโปนิน (Saponin). สืบค้นเมื่อ 23 มีนาคม 2558, จาก <http://www.fisheries.go.th/if-center/web2/images/pdf/saponin.pdf>.

ประเพรตัน ศิพลไกร. (2555). สารอินโดโลอลคาลอยด์ และฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นพญาสัตบธรรม. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 14(1), 54-65.

ปราณี ชาลิตธรรม และคณะ. พิษเรือรังของสารสกัดลูกใต้ใบ. สืบค้นเมื่อวันที่ 23 เมษายน 2558, จาก http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_herbal/researchpoison/abstract.php?id=35

พิรศักดิ์ วรสุนทรโสส. (2544). ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเฉียงตะวันออกเฉียงใต้ 3 พืชที่ให้สีย้อม และแทนนิน. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัด โรงพิมพ์ชานพิมพ์.

พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์ และพิเชฐ สัมปทานกุล. (2541). ตำราภาพจุลพยาธิวิทยา. กรุงเทพฯ:

สุปราณี чинบุตร, กัญญา จำเริญรัตน์ และชลอ ลี้สุวรรณ. (2536). เนื้อเยื่อของปลาช่อน. กรุงเทพฯ: พนนพับบลิชชิ่ง.

สันชิวัฒน์ พิทักษ์ผล, ประไฟ วงศ์สินคงมั่น, จาเรย์ บัณสิทธิ์, ธิดารัตน์ บุญรอด และ วีรยุทธ พรณ เกียรติ. (2553). ผลของสารสกัดหญ้าใต้ใบต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแอกโรไมแนส ไฮโดรฟิลา และการเจริญเติบโตและอัตราการลดของกุ้งก้ามgram. วารสารเศรษฐศาสตร์ฯ. 3(1), 15-21.

สมเจตన์ ปัญจวานิชย์ . (2550). วิชาการประมงเพื่อส่งเสริมการเลี้ยงปลาเศรษฐกิจของไทย.
กรุงเทพฯ.

สมพงษ์ สหพงศ์ , สุดา เรียมโรจน์พิทักษ์ , ปัญญา เต็มเจริญ, ศุภกิจ อังศุภากร และ สำนักงาน
เศรษฐกิจการเกษตร. (25 มกราคม 2555). สถานการณ์การผลิตและการตลาดรายสัปดาห์.
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, สืบคืบเมื่อ 23 มีนาคม 2558, จาก [http://www.oae.go.th/more_news.php? cid=95](http://www.oae.go.th/more_news.php?cid=95)

Agius, C. (1979). The role of melano-macrophage center in iron storage in normal and diseased fish. J. Fish Dis. 2, 337 – 343.

Akin-Osanaiye, C. B., Gabriel, A. F. and Alebiosu, R. A. (2011). Characterization and antimicrobial screening of ethyl oleate isolated from *Phyllanthus Amarus* (Schum and Thonn). Annals of Biological Research. 2(2), 298-305.

Amin ZA, Abdulla MA, Ali HM, Alshawsh MA and Qadir SW. (2012). Assessment of In vitro antioxidant, antibacterial and immune activation potentials of aqueous and ethanol extracts of *Phyllanthus niruri*. J Sci Food Agric. 92: 1874-1877.

Anupama, N. J., Sujata, D., Farhin, I. and Zahabiya, A. (2012). Elemental Analysis (Mineral and Heavy metal) composition of *Phyllanthus amarus*, *Jatropha gossypifolia* and *Ruta graveolens*. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 3(3), 43-48.

Dhandapani, R., Lakshmi, D., Balakrishnan, V., Jayakumar, S. and Anandha, K. (2007). Preliminary phytochemical investigation and antibacterial activity of *Phyllanthus amarus* Schum & Thorn. *Anc Sci Life.* 27(1), 1–5.

Eweka, A. O. and Enogieru, A. (2011). Effect of oral Administration Of *Phyllanthus amarus* leaf extract on the kidney of adult wistar rats a histology study. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 8(3), 307-311.

Gruenwald, J., Bredler, T. and Jaenicke, C. (2000). PDR for herbal medicines 2 nded. Montvale: Medical Economics Company, Inc. 91.

Nelson, J.S. (1994). Fishes of the World. 3rd ed. Wiley, New York.

Manske, R. H. F. (1965). The Alkaloids. Chemistry and Physiology. Volume VIII. New York : Academic Press. 1965, 673 p.

Mc Naught, A. D. and Wilkinson, A. (1997). Compendium of Chemical Terminology. 2nd ed. (The “Gold Book”). Oxford : Blackwell Scientific Publications.

Padua, L. S., Bunyaphraphatsara, N. and Lemmens, R. H. M. J. (1999). Plant Resources of South-East Asia. Medicinal and poisonous plant 1. Leiden: Backhuys Publishers. 12 (1), 387-388.

Philpott, H. C. W. and Copeland, D. E. (1963). Fine structure of chloride cells from three species of Fundulus. *J. Cell Biol.* 18, 389 – 401.

Phuong N. H. and Thieu N. Q. Effect of adding different *Phyllanthus amarus* powder concentration in chicken diet on their growth performance and health. Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine,Nong Lam University, Ho Chi Minh. Retrieved May 10, 2015, from <http://mekarn.org/workshops/dalat2012/html>

Popma, T. and Masser, M. (1999). Tilapia: Life history and Biology. Southern Regional Aquaculture Center Pub. 4, SRAC-283.

Rajeshkumar, N.V., Joy, K.L., Kuttan, G., Ramsewak, R.S., Nair, M.G. and Kuttan, R. (2002). Antitumour and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract. *J Ethnopharmacol.* 81(1), 17-22.

Takashima, F. and Hibiya, T. (1995). An Atlas of Fish Histology. Kodansha Ltd. Tokyo. U.S. Food and Drug Administration. (November 13, 2014). *Oreochromis niloticus*, Nile Tilapia, FDA Market Name: Tilapia. Retrieved May 7, 2015, from <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/RFE/ucm090070.htm>

Yeh, S.F., Hong, C.Y., Huang, Y.L., Liu, T.Y., Choo, K.B. and Chou, C.K. (1993). Effect of an extract from *Phyllanthus amarus* on hepatitis B surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Res.* 20(3), 185-192.

Yin S, Fan CQ, Wang Y, Dong L and Yue JM. (2004). Antibacterial prenylflavone derivatives from *Psoralea corylifolia*, and their structure-activity relationship study. *Bioorg Med Chem.* 12(16): 4387-92.





ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ นางนงลักษณ์ ยิ่มทะฤกุล

เกิดวันที่ 15 เดือนมกราคม พ.ศ. 2516

สถานที่เกิด อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

ประวัติการศึกษา วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยนเรศวร (พ.ศ. 2538)

วท.ม. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (พ.ศ. 2543)

ปร.ด. (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2557)

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

สถานที่ทำงานปัจจุบัน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร



วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา

BURAPHA SCIENCE JOURNAL

ISSN 0858-7612 ปีที่ 19 ฉบับพิเศษ การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ 6 [Special Volume 2014]

SCIENCE

RESEARCH

CONFERENCE

6th



วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ฉบับพิเศษ การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 6
20-21 มีนาคม 2557 มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

SPECIAL VOLUME 2014
FACULTY OF SCIENCE - BURAPHA UNIVERSITY

ผลของสารสกัดหยาบตันลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) ต่อการแสดงออกของยีน Complement C3 ในปลา尼ล (*Oreochromis niloticus*) ด้วยเทคนิค Real Time RT-PCR
 Effect of Egg Woman (*Phyllanthus amarus*) Extract on Complement C3 Expression in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by Real Time RT-PCR Technique

ธีระพงศ์ สีสมุทร และ มงคลยิ่มตระกูล*

Teerapong Seesamut and Nonglak Yimtragool*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากต้นลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) ต่อการแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับและม้ามของปลา尼ล (*Oreochromis niloticus*) ด้วยเทคนิค Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR) โดยเลี้ยงปลา尼ลน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 15-20 g เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยเปรียบเทียบระหว่างปลา尼ลที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปเคลือบสารสกัดหยาบจากต้นลูกใต้ใบ ความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม), 1, 5 และ 10 g/kg เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าปลา尼ลที่ได้รับสารสกัดต้นลูกใต้ใบในแต่ละระดับความเข้มข้นมีการแสดงออกของยีน Complement C3 ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีแนวโน้มที่ความเข้มข้น 5 g/kg จะสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน Complement C3 ได้มากกว่าที่ระดับความเข้มข้น 0 จากผลที่ได้นำจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาและพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันในปลา尼ลต่อไป

คำสำคัญ : ปลา尼ล / ยีน Complement C3 / ลูกใต้ใบ / เทคนิค Real Time RT-PCR

Abstract

Effect of the crude extract from Egg woman (*Phyllanthus amarus*) on Complement C3 gene expression in liver and spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR). Experimental fish, 15-20 g initial weight, were fed for 3 weeks on diet containing *P. amarus* crude extract at 0 (control), 1, 5, and 10 g/kg feed. The analysis of data by ANOVA showed non-significant in every groups ($p>0.05$). The results indicated that 5 g/kg feed of Egg woman extract tend to stimulate the Complement C3 gene expression higher than other dose. The result from this study showed the benefit of Egg woman extract that can be used to improve the immune system of Nile tilapia.

Keywords : Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) / Complement C3 gene / Egg woman (*Phyllanthus amarus*) / Real Time RT-PCR

*Corresponding author. E-mail : nonglak.yim@yahoo.com

1. บทนำ

ปลา尼ิต (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาที่น้ำจืดชนิดหนึ่งซึ่งมีความสำคัญมากต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงปลาที่น้ำจืดในประเทศไทย และยังเป็นที่นิยมเพาะเลี้ยงกันอย่างกว้างขวางในทั่วภูมิภาคของโลก เนื่องจากสามารถเลี้ยงได้ในทุกสภาพ และเนื้อปลา มีรสชาติดี ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลา尼ิตในประเทศไทยมีอัตราการขยายตัวอย่างรวดเร็ว ร้อยละ 90 เป็นการเพาะเลี้ยง เพื่อปรุงอาหารในประเทศไทย จากรายงานของ FAO เดือนสิงหาคม 2555 ประเทศไทยสามารถผลิตปลา尼ิตได้เป็นอันดับ 4 ของเอเชีย รองจาก จีน อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ ตามลำดับ (กรมประมง, 2553) การเพาะเลี้ยงปลา尼ิตเพื่อขายชื่นทั่วโลกก็คุ้มค่ากับระบบเศรษฐกิจของเชื้อโรค หลากหลายชนิดและส่งผลต่อผลผลิตปลา尼ิตที่ได้ ซึ่งสาเหตุมาจากการที่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลา尼ิต เลี้ยงปลาให้อยู่กันอย่างหนาแน่น และขาดการ จัดการสภาพแวดล้อมที่ดี ทำให้ปลา Nicid ติดเชื้อแล้วก่อให้เกิดโรคในปลา尼ิตได้ โภคในปลา Nicid สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดหลัก คือ โภคไมติดเชื้อ (Non-infectious diseases) และโภคติดเชื้อ (Infectious diseases) (ชนกันต์, 2556) เชื้อสำคัญที่เกิดการระบาดในปลา Nicid ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* และ *Aeromonas hydrophila* เป็นต้น (Milan et al., 2009) ดังนั้นเพื่อเป็นการลดความเสียหาย จากจำนวนผลผลิตที่ลดลงทำให้เกษตรกรจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีเพื่อลดอัตราการเจ็บป่วยและการตายในปลา Nicid แห้ว่าการใช้ ยาปฏิชีวนะและสารเคมีจะลดผลกระทบจากความเสียหายที่เกิดจากปลา Nicid ได้ แต่การใช้สารเคมียังก่อให้เกิดการสะสมของสารเคมี ในผู้บริโภค และมีการตกค้างในสัตว์และสารเคมีนี้ไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค (ชนกันต์, 2556) โดยสมุนไพรต้นสูกได้ใน (*Phyllanthus amarus*) เป็นพืชต้มถุงอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ที่มีผลเป็นสูกคอมขนาดเล็กเรียงได้ใบไปคลอดก้าน สามารถพบได้ง่ายในท้องถิ่นทั่วทุกภาคของ ประเทศไทย จากการตรวจสอบสารกรดสูมเทอกซ์เคมีในต้นสูกได้พบว่าประกอบด้วย Alkaloids, Tannins, Lignans, Flavonoids, Saponins และ Glycosides (Islam et al., 2008) มีรายงานว่าต้นสูกได้ใบมีสรรพคุณในด้านไวรัสตับอักเสบบี (Yeh et al., 1993) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Amin et al., 2012) มีฤทธิ์ต้านการกรราจายตัวของเชลล์มะโรง (Rajeshkumar et al., 2002) และสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus*, *S. albus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* (Dhandapani et al., 2007) จึงทั้งยังสามารถยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ที่ทำให้เกิดโรคในปลา Nicid ได้อีกด้วย (Amin et al., 2012)

ในปัจจุบันความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลมีบทบาทสำคัญในการศึกษาวิจัยทางด้านระบบภูมิคุ้มกันโรคของสัตว์น้ำ การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของปลา Nicid ซึ่งมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อเป็นข้อมูลที่ฐานในการศึกษาการ ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไป โดยระบบคอมพลีเม้นท์ (Complement system) เป็นภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่โบราณ (Innate immunity) หรือภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Non-specific immunity) การทำงานอาศัยกลุ่มของโปรตีนประมาณ 35 ชนิด ในกรณีเกิดปฏิกิริยา ระบบคอมพลีเม้นท์จะถูกกระตุ้นได้จากจุลทรรศน์จาก Antigen-antibody complex (Ag-Ig) ทำให้ปรตีนถูกกระตุ้นและเปลี่ยนจาก Inactive form เป็น Active form ซึ่งโปรดีน Complement C3 เป็นตัวกลางในระบบคอมพลีเม้นท์ จึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันและการทำลายเชื้อ โรค (Claire et al., 2002)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการแสดงออกของยีน Complement C3 ในอวัยวะต่างๆ ของปลา Nicid และศึกษาเบรียบเทียบ การแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับและม้ามของปลา Nicid ที่ได้รับสารตัดน้ำยาบดต้นสูกได้ใบเมบิโนมาโนที่แตกต่างกัน หัวหินเทคนิค Real Time RT-PCR ซึ่งข้อมูลที่ได้จะมีความสำคัญอย่างยิ่งในการหาแนวทางในการป้องกันโรคในปลา Nicid ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป ในอนาคต

2. วิธีการ

2.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน Complement C3 ในอวัยวะต่างๆ

2.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากปลา Nicid สายพันธุ์จิตราดา 3 ทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ได้เติบโตและมีสุขภาพดีไม่เป็นโรค ขนาดประมาณ 400-500 g ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ จังหวัดอุตรดิตถ์ ทำให้ลดโดยนำปลาใส่ลงในน้ำที่ส่วนผสม ของน้ำมันกานพู (Clove oil) ความเข้มข้น 80 mg/L อาจปล่อยให้มีการเคลื่อนไหว หลังจากนั้นเก็บอย่างระมัดระวังที่ต้องการ ได้แก่ ตับ ไต ม้าม ก้อนสามเหลี่ยม หัวใจ ลำไส้ ถุงน้ำดี และรังไข่ นำไปสักด้วย Total RNA ต่อไป

2.1.2 การสกัด Total RNA และการสังเคราะห์ First-strand cDNA

สกัด Total RNA จากตัวอย่างเนื้อเยื่อ โดยใช้ TRIzol reagent (Invitrogen) ปริมาณ 1 ml บดตัวอย่างให้ละเอียด ตั้งทึ้งให้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติม Chloroform 200 μ l ผสมให้เข้ากัน ตั้งทึ้งให้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที ต่อจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ข่ายสารละลายส่วนใส่ออกไซด์ด้านบนใส่ลงในหลอดใหม่ เติม Isopropanol 500 μ l ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ แล้วตั้งทึ้งให้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที ล้างตะกรอนด้วย 80% Ethanol ที่แช่เย็น ปริมาณ 1 ml จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที คุณภาพจะถูกตรวจสอบด้วย 80% Ethanol ที่แช่เย็น ปริมาณ 15 นาที ลากตะกรอนด้วย DEPC treated-water นำ Total RNA ที่สกัดได้รับค่าความเข้มข้นโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer

ทำการสังเคราะห์ First-strand cDNA จากตัวอย่าง Total RNA ที่สกัดได้ โดยใช้ Helix cript two-step RT PCR kit (Nanohelix) นำ Total RNA 1 μ g เติม 10 μ M dT-UPM 3 μ l, dNTP Mix (each 10 mM) 2 μ l และ Water (Free nuclease) 7.5 μ l แล้วผสมให้เข้ากัน ปั่นที่ อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นวางบนน้ำแข็งทันที 5 นาที เติมสารละลายผสม หลอดละ 6.5 μ l ลงในสารละลายที่เตรียมไว้ (มีส่วนประกอบดังนี้ 5X RT Reaction Buffer 4 μ l, 0.1 M DTT 1 μ l, 40 unit/ μ l RNase inhibitor 0.5 μ l และ HelixCript Thermo Reverse Transcriptase 1 μ l) จากนั้นนำไปปั่นที่ อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 40 นาที ต่อตัวอย่างที่ อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 40 นาที และ อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที ตามลำดับ เก็บสารละลาย cDNA ที่ได้ ให้ที่ อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้เป็น Template สำหรับทำ Real Time RT-PCR ต่อไป

2.1.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน Complement C3

ศึกษาการแสดงออกของยีน Complement C3 โดยออกแบบ Gene-specific primers จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (XM_003450016) และใช้ยีน β -Actin เป็น internal control โดยใช้ Gene-specific primers จากรายงานการศึกษาของ Phumyu et al. (2012) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 Gene-specific primers สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real Time RT-PCR

Name	Sequences	Primer order	Product length (bp)
nC3F	5'-TGT GAG TCT ACA GTG AGG AGC-3'	Sense	
nC3R	5'-CCC AGA TCT AAA GCC ATT CTG C-3'	Antisense	196
nActinF	5'-TGG CAA TGA GAG GTT CCG-3'	Sense	
nActinR	5'-TGC TGT TGT AGG TGG TTT CG-3'	Antisense	95

นำ First-strand cDNA ที่สังเคราะห์ได้จาก Total RNA ของแต่ละอย่างมาใช้เป็น Template ใช้สารละลายของ LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) เตรียมสารละลายผสม (มีส่วนประกอบดังนี้ 2x conc. LightCycler® 480 SYBR Green I Master 5 μ l, 10 μ M Primer forward 0.25 μ l, 10 μ M Primer reverse 0.25 μ l, Water PCR grade 2.5 μ l) ผสมกับ cDNA 2 μ l โดยปริมาณของสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 10 μ l เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบการแสดงออกของยีน Complement C3 ด้วยเครื่อง Roche Light Cycler LC-480 Real Time PCR System (Roche) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ Pre-incubation 95 °C เป็นเวลา 10 นาที, Amplification ที่ อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 วินาที ต่อตัวอย่าง อุณหภูมิ 63 °C เป็นเวลา 15 วินาที และ อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 15 วินาที จำนวน 45 รอบ และ Cool ที่ อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 30 วินาที ทำการวิเคราะห์ Melting temperature (TM) จำแนก Specific และ Non- specific PCR product ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ถูกต้องมักจะแสดง Peak เดียวที่ อุณหภูมิสูง ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการจับแนวไปมาเพะ (Non-specific product) หรือ Primer-dimer จะให้ Peak ที่มีขนาดกว้างที่ อุณหภูมิต่ำ เมื่อปฏิริยาสมบูรณ์จะได้ค่า Crossing point (Cp) โดยโปรแกรมของเครื่อง Roche Light Cycler LC-480 Real Time PCR System (Roche) จะแปลงค่า Cp เป็นค่า Real Time PCR Efficiency (E) ของยีน Complement C3 (Target gene) และ β -Actin (Reference gene) เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนด้วย Pfaffl method โดยคำนวณสัดส่วนระดับการแสดงออกของยีนจากสมการ (Pfaffl, 2001)

$$\text{ratio} = \frac{\frac{(E_{\text{ref}})^{\text{CP}_{\text{Sample}}}}{(E_{\text{target}})^{\text{CP}_{\text{Sample}}}}}{\frac{(E_{\text{ref}})^{\text{CP}_{\text{Calibrator}}}}{(E_{\text{target}})^{\text{CP}_{\text{Calibrator}}}}}$$

โดย $(E_{\text{ref}})^{\text{CP}_{\text{Sample}}}$ คือ Real Time PCR Efficiency ของยีน β -Actin ตัวอย่างที่ 2, 3, 4, ...n
 $(E_{\text{target}})^{\text{CP}_{\text{Sample}}}$ คือ Real Time PCR Efficiency ของยีน Complement C3 ตัวอย่างที่ 2, 3, 4, ...n
 $(E_{\text{ref}})^{\text{CP}_{\text{Calibrator}}}$ คือ Real Time PCR Efficiency ของยีน β -Actin ตัวอย่างที่ 1
 $(E_{\text{target}})^{\text{CP}_{\text{Calibrator}}}$ คือ Real Time PCR Efficiency ของยีน Complement C3 ตัวอย่างที่ 1

2.1.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในอวัยวะต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรม SPSS ชี้วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบ One way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

2.2 การศึกษาผลของสารสกัดสูญได้ใบต่อการแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับและม้ามของปลา尼ล

2.2.1 การเตรียมสารสกัดหมายจากตันฉูกใต้ใบ

นำตันฉูกใต้ใบ ทั้งตันประกอบด้วย ราก ลำต้น ใน ผล และดอก ล้างให้สะอาดแล้วหั่นให้ละเอียด นำไปปobile แห้งที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 2 วัน หรือจนกว่าจะแห้ง บดให้ละเอียด นำไปซึ่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำลงสูญได้ใบแห้ง 100 กรัม แช่ในน้ำเกลือ บริมาณ 1,000 ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเรียกว่าด้วยเครื่อง Shaker ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 45°C ตลอดเวลา กรองเศษที่สอกัดด้วยผ้าขาวบางและกรองด้วยกรองเบอร์ 1 ชิ้น กั้นแล้วนำส่วนใสไปรีดเย็นด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50°C และทำให้แห้งด้วยกระบวนการ Freeze dry ที่อุณหภูมิ -50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาดัดให้ละเอียด เก็บไว้ในขวดศี霞เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.2.2 การเตรียมอาหารปลา

อาหารที่ใช้ในการทดลอง คือ อาหารเม็ดสำเร็จรูปคลอยน์ โปรตีนเนื้อสัมภាពกกว่า 25% (ตรา ซีพี มีส่วนประกอบดังนี้ ปลาปืน กากถั่ว เหลือง รำล耽误 อั้วไโพด ปลายข้าว และวิตามิน) อาหารเม็ดสำเร็จรูปจะถูกเคลือบด้วยสารสกัดจากตันฉูกใต้ใบ ในระดับความเข้มข้น 0, 1, 5 และ 10 g/kg feed ตามลำดับ โดยทำการสเปรย์สารสกัดบนอาหารเม็ดสำเร็จรูป ผึ่งลมทิ้งไว้ประมาณ 6-8 ชั่วโมง แล้วเคลือบด้วยน้ำมันพืช ในอัตราส่วน น้ำมันพืช 30 ml ต่อ อาหารสำเร็จรูป 1 kg เพื่อป้องกันการละลายของสารสกัด จากนั้นเก็บอาหารที่เตรียมไว้ที่ 4°C จนกว่าจะใช้งาน

2.2.3 การเตรียมปลานิล

ปลานิลอายุประมาณ 3 เดือน (น้ำหนักประมาณ 15-20 g) ทำการพักฟื้นและปรับสภาพปลาให้ชินกับอาหารและวิธีการเลี้ยง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ไม่ได้เคลือบสารสกัด วันละ 2 มื้อ เช้า-เย็น หลังจากนั้นสูตรตัวอย่างปลานิลใส่ลงในตู้ขนาด $30^{\prime\prime} \times 16^{\prime\prime} \times 18^{\prime\prime}$ (ใส่น้ำตู้จะประมาณ 120 L) ตู้ละ 10 ตัว เพื่อทำการทดลอง โดยปลานิลที่สูตรลงในแต่ละตู้มีขนาดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

2.2.4 การเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มหมุนเวียน (CRD) ประกอบด้วย 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ชั้้ (ตู้) คือ

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารเม็ดสำเร็จรูป ไม่เคลือบสารสกัดฉูกใต้ใบ (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารเม็ดสำเร็จรูป เคลือบสารสกัดฉูกใต้ใบ 1 g/kg feed

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารเม็ดสำเร็จรูป เคลือบสารสกัดฉูกใต้ใบ 5 g/kg feed

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารเม็ดสำเร็จรูป เคลือบสารสกัดฉูกใต้ใบ 10 g/kg feed

ให้อาหารทดลองกันละ 2 มื้อ (เข้าและเย็น) จนอิ่ม โดยเมื่อคำนวณปริมาณการกินอาหารของปลา尼ลในแต่ละชุดการทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.459$) ดังนี้ ชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัด 0, 1, 5, 10 g/kg feed มีอัตราการกินเท่ากัน 0.94 ± 0.04 , 0.92 ± 0.03 , 0.89 ± 0.04 , 0.93 ± 0.04 g/ตัว/วัน (ตามลำดับ) โดยปริมาณอาหารที่กินในแต่ละวันประมาณร้อยละ 4 ของน้ำหนักตัว ระบบการเติบโตของปลาจะเปลี่ยนถ่ายน้ำหนักตัวทุกวัน วันละ 20% (ควบคุมให้ค่า Dissolved oxygen อยู่ในช่วง 5-8 mg/L) เดียวกันเป็นเวลา 3 สัปดาห์ เมื่อศึกษาผลการทดลองทำการเก็บข้อมูลปริมาณอาหารที่ให้ในแต่ละตัว น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น จากนั้นนำไปหาค่าเฉลี่ยเพื่อประเมินค่า น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight Gain, WG) อัตราการเจริญเติบโต (Average Daily Growth, ADG) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Food Conversion Rate, FCR) โดยคำนวณจากสูตร ดังนี้

$$\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (\%)} = [(\text{น้ำหนักปลาเมื่อต้นการทดลอง} - \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง}) / \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง}]$$

$$\times 100$$

$$\text{อัตราการเจริญเติบโต (g/day)} = (\text{น้ำหนักปลาเมื่อต้นการทดลอง} - \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง}) / \text{จำนวนวันที่ทดลอง}$$

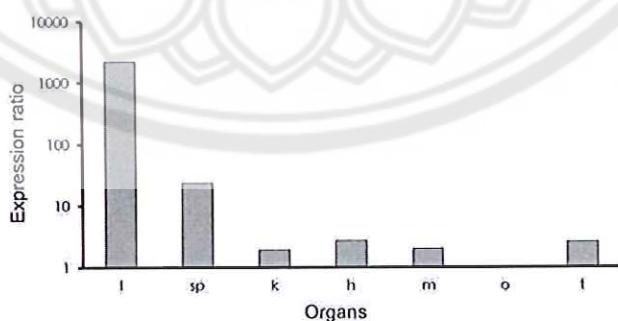
$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ} = \text{น้ำหนักของอาหารที่ป่วยกิน} / \text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}$$

2.2.5 การศึกษาผลของสารสกัดถูกใต้ใบต่อการแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับและม้ามของปลา尼ล

เก็บตัวอย่างปลา尼ล ตู้ละ 3 ตัว โดยครองดับน้ำในตู้แล้วปามาอยู่เป็นผู้ในมุมด้านหนึ่งของตู้ที่เดียว แล้วสูบด้วยที่ตักปูด้าให้ได้จำนวนตู้ละ 3 ตัว โดยปลา尼ลแต่ละตัวจะถูกเก็บตัวอย่างทั้งตับและม้าม ดังนั้นในแต่ละชุดการทดลองจะประกอบด้วยตัวอย่างตับและม้าม อย่างละ 9 ตัวอย่าง ทำการตัด Total RNA จากตัวอย่างและสังเคราะห์ First-strand cDNA จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของยีน Complement C3 และทำการวิเคราะห์ทางสถิติ ตามข้อ 2.1.2-2.1.4 ตามลำดับ

3. ผลและอภิปราย

การศึกษาการแสดงออกของยีน Complement C3 (Target gene) ในตับ ม้าม ไต ลำไส้ กัลามเนื้อ หัวใจ รังไข่ และถุงน้ำเชื้อ ด้วยเทคนิค Real Time RT-PCR โดยใช้ยีน β -Actin เป็น Internal control (Reference gene) และใช้รังไข่เป็นอวัยวะที่มีการแสดงออกน้อยที่สุดเป็นตัวเบริ่ร์บเทียบ (Calibrator) พบว่ายีน Complement C3 มีการแสดงออกในทุกอวัยวะที่ทำการศึกษา ยกเว้นลำไส้ ซึ่งในแต่ละอวัยวะ นั้นมีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน โดยตับเป็นอวัยวะที่มีการแสดงออกของยีนมากกว่ารังไข่ถึง 2,223 เท่า รองลงมา คือ ม้าม เท่ากับ 25 เท่า ส่วนในอวัยวะอื่น ๆ คือ ไต หัวใจ กัลามเนื้อ และถุงน้ำเชื้อ มีการแสดงออกของยีน Complement C3 ที่ใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 1.89 – 3 เท่า (ภาพที่ 1) ให้ผลทดสอบค้องกับการศึกษาในปลาชนิดอื่น ๆ เช่น ปลา Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) พบว่า Complement C3 มีการแสดงออกในทุก ๆ อวัยวะที่ทำการศึกษา ได้แก่ กล้ามเนื้อ ตับ ไต สมอง ตา กล้ามเนื้อ กระเพาะ และลำไส้ (Lange et al., 2004a) เช่นเดียวกับการศึกษาในปลา Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) (Lange et al., 2004b) และปลา Spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) (Ellingsen et al., 2005)



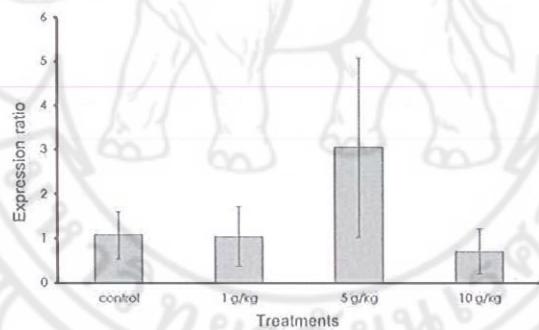
ภาพที่ 1 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน Complement C3 ในอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ตับ (I), ม้าม (sp), ไต (k), หัวใจ (h), กัลามเนื้อ (m), รังไข่ (o) และ ถุงน้ำเชื้อ (t) แสดงข้อมูลอยู่ในรูปของ log10 และกำหนดให้รังไข่เป็น Calibrator

ตารางที่ 2 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ของป岚ินิดที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ (Mean \pm SE, n = 3)

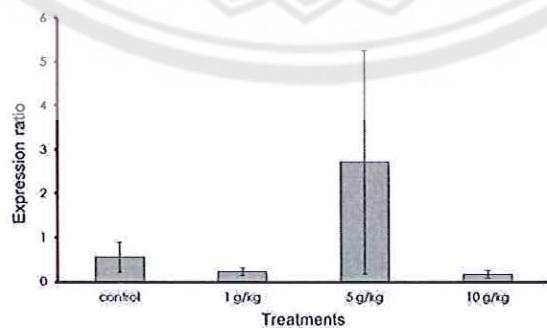
Parameters	Treatments			
	0 g/kg (Control)	1 g/kg	5 g/kg	10 g/kg
WG (%)	34.05 \pm 6.75	34.43 \pm 4.72	29.60 \pm 7.48	30.80 \pm 4.60
ADG (g/day)	0.29 \pm 0.05	0.31 \pm 0.02	0.25 \pm 0.06	0.26 \pm 0.04
FCR	1.38 \pm 0.10	1.29 \pm 0.08	1.32 \pm 0.10	1.35 \pm 0.12

จากการทดลองเลี้ยงป岚ินิดด้วยอาหารเคลือบสารสกัดหมายต้นลูกใต้ใบ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5 และ 10 g/kg feed เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ไม่มีความแตกต่างกัน ทางสถิติเมื่อเทียบกับคุณคุณ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 2)

ผลจากการศึกษาช้างต้นพบว่าตับและม้ามเป็นอวัยวะที่มีการแสดงออกของยีน Complement C3 มากที่สุด ตั้งนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์ผลของการได้รับสารสกัดลูกใต้ใบต่อการแสดงออกของยีน Complement C3 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโรคของป岚ินิด จึงเลือกที่จะศึกษาการแสดงออกของยีนที่ตับและม้ามโดยใช้เทคนิค Real Time RT-PCR พบว่าการแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับ ทุกชุดทดลองมีการแสดงออกของยีนที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.161$) แต่ในชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 5 g/kg feed มีระดับการแสดงออกของยีนมากที่สุด เท่ากับ 3.05 ± 2.01 ในขณะที่ชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 1 g/kg feed มีระดับการแสดงออกของยีน เท่ากับ 1.08 ± 0.52 และ 1.05 ± 0.67 ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 10 g/kg feed มีระดับการแสดงออกของยีนต่ำที่สุด คือ 0.71 ± 0.49 (ภาพที่ 2) และพบว่าผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อการแสดงออกของยีน Complement C3 ในม้ามซึ่งเป็นอวัยวะที่มีการแสดงออกของยีนรองจากตับก็ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน โดยทุกชุดการทดลองไม่มีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.245$) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 การแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับของป岚ินิด ที่ได้รับสารสกัดหมายต้นลูกใต้ใบในปริมาณที่แตกต่างกัน และกำหนดให้ตัวอย่างในกลุ่มควบคุมเป็น Calibrator (Mean \pm SE, n = 9)



ภาพที่ 3 การแสดงออกของยีน Complement C3 ในม้ามของป岚ินิด ที่ได้รับสารสกัดหมายต้นลูกใต้ใบในปริมาณที่แตกต่างกัน และกำหนดให้ตัวอย่างในกลุ่มควบคุมเป็น Calibrator (Mean \pm SE, n = 9)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าทั้งในการแสดงออกของยีน Complement C3 ในตับและม้ามของปลา尼ลกฉุ่มที่ได้รับสารสกัดหมายตันลูกได้ใน 5 g/kg feed มีแนวโน้มว่าจะสามารถ抵抗ต้านการแสดงออกของยีน Complement C3 ได้มากกว่าชุดควบคุม (0 g/kg feed) และชุดทดลองอื่น (1 และ 10 g/kg feed) ซึ่งแสดงถึงกับงานวิจัยของสันธิวัฒน์ พิทักษ์ผล และคณะ (2553) รายงานว่าผลของสารสกัดหญ้าได้ในที่ความเข้มข้น 5 g/kg feed ทำให้หุ้งก้ามกรามมีตัวราชการเจริญเติบโตและการลดตายจากการติดเชื้อ *A. hydrophila* ลงที่สุด ซึ่งทั้งจากรายงานของภาคราช พาสุก และ ปิยพ. เจนการ (2553) พบว่าสารสกัดหมายตันลูกได้ในที่เคลื่อนอาหารเม็ดความเข้มข้น 1 g/kg feed สามารถเพิ่มปริมาณ Total immunoglobulin ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดทดลองอื่น ดังนั้นสารสกัดหมายตันลูกได้ใบจึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการให้เป็นอาหารเสริมเพื่อกระตุ้นให้ปลาニลมีระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มสูงขึ้น

4. บทสรุป

การแสดงออกของยีน Complement C3 ในอวัยวะของปลาニลพบว่าตับเป็นอวัยวะที่มีการแสดงออกมากที่สุด รองลงมา คือ ม้าม และในกล้ามเนื้อ หัวใจ ไต รังไข่ และถุงน้ำดี มีการแสดงออกของยีน Complement C3 ที่ใกล้เคียงกัน ส่วนปลา尼ลที่ได้รับสารสกัดหมายตันลูกได้ในในปริมาณ 5 g/kg feed มีแนวโน้มว่าจะสามารถ抵抗ต้านการแสดงออกของยีน Complement C3 ได้มากที่สุด ข้อมูลที่ได้จากภาษาศึกษาครั้งนี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการการศึกษาและหาแนวทางในการป้องกันโรคในปลาニลได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ จังหวัดอุดรธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้วยป้ายประกาศในครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

- กรมประมง. (2554). ยุทธศาสตร์การพัฒนาปลา尼ล (2553-2557). Retrieved March 23, 2011, from <http://www.fisheries.go.th/freshwater/web3/images/download/yutasat.pdf>.
- ชนกันต์ จิตมนต์. (2556). ผลของผัดกับพืชสมุนไพรต่อกลุ่มกุ้งกันสัตว์น้ำ. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น. 18(2), 257-269.
- ภาสุก พาสุก และ ปิยพ. เจนการ. (2555). ผลของสารสกัดหมายตันลูกได้ใน (*Phyllanthus amarus*) ต่อการ抵抗ต้านระบบภูมิคุ้มกันและการเกิด Miconuclei ในปลา尼ล (*Oreochromis niloticus*). การศึกษาด้วยตนเอง วท.บ., มหาวิทยาลัยนเรศวร, ที่ymduiko.
- สันธิวัฒน์ พิทักษ์ผล, ประทีพ วงศินคงมั่น, รา耶ีย์ บันสีธิธี, นิตารัตน์ บุญรอด และ วีรบุญ พรรณเกียรติ. (2553). ผลของสารสกัดหมายตันลูกที่ได้ในต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแอนโรมแสต ไซโตรฟิลา และการเจริญเติบโตและอัตราการลดตายของหุ้งก้ามกราม. วารสารนเรศวราษฎร์. 3(1), 15-21.
- Amin, Z.A., Abdulla, M.A., Ali, H.M., Alshawsh, M.A. and Qadir, S.W. (2012). Assessment of in vitro antioxidant, antibacterial and immune activation potentials of aqueous and ethanol extracts of *Phyllanthus niruri*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92(9), 1874-1877.
- Claire, M., Holland, H., and Lambris J.D. (2002). The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*. 12, 399-420.
- Dhandapani, R., Lakshmi, D., Balakrishnan, V., Jayakumar, S. and Anandha, K. (2007). Preliminary phytochemical investigation and antibacterial activity of *Phyllanthus amarus* Schum & Thorn. *Anc Sci Life*. 27(1), 1-5.
- Ellingsen, T., Strand, C., Monsen, E., Bogwald, J. and Dalmo, R..A. (2005). The ontogeny of complement component C3 in the spotted wolffish (*Anarhichas minor Olafsen*). *Fish Shellfish Immunol.* 18(5), 351-358.
- Lange, S., Bambir, S., Dodds, A.W. and Magnadottir, B. (2004a). The ontogeny of complement component C3 in Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) -an immunohistochemical study. *Fish & Shellfish Immunology*. 16, 359-367.
- Lange, S., Bambir, S., Dodds, A.W. and Magnadottir, B. (2004b). An immunohistochemical study on complement component C3 in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*). *Developmental and Comparative Immunology*. 28, 593-601.
- Milan, G.F., Godoy, D.T., Leal, C.A.G., Yuhara, T.Y., Costa, G.M. and Figueiredo, H.C.P. (2009). Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*. 136(1-2), 180-183.

- Pfaffl, W. M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29(9), 2003-2007
- Phumyu, N., Boonnanuntanasarn, S., Jangprai, A., Yoshizaki, G. and Na-Nakorn, U. (2012). Puberty effects of 17 α -methyltestosterone on GH-IGF-related genes of the hypothalamic-pituitary-liver-gonadal axis and other biological parameters in male, female and sex reversed Nile tilapia. *General and Comparative Endocrinology*. 177(2), 298-292.
- Rajeshkumar, N.V., Joy, K.L., Kuttan, G., Ramsewak, R.S., Nair, M.G. and Kuttan, R. (2002). Antitumour and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract. *J Ethnopharmacol.* 81(1), 17-22.
- Yeh, S.F., Hong, C.Y., Huang, Y.L., Liu, T.Y., Choo, K.B. and Chou, C.K. (1993). Effect of an extract from *Phyllanthus amarus* on hepatitis B surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Res.* 20(3), 185-192.

