

ประสิทธิภาพและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิดที่มีต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio* *parahaemolyticus*

Efficiency of Three Extracted Herbs on Inhibition of *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*

กฤษณี วงศ์วุฒิวัฒน์^{1*} ศักดา วงศ์วุฒิวัฒน์¹ อนุสรณ์ ช่วยทอง¹
มายมูเนาะ มิดคาดี¹ และชัยวัฒน์ เพ็ชรรัตนมณี²
Krisanee Wongwuttiwat^{1*} Sakda Wongwuttiwat¹
Anusorn Chuaytong¹ Maimunoh Midcadee¹
and Chaiwat Petrattmune²

ได้รับบทความ: 3 ต.ค. 2564

ได้รับบทความแก้ไข: 2 ก.พ. 2565

ยอมรับตีพิมพ์: 14 มี.ค. 2565

บทคัดย่อ

Vibrio harveyi และ *Vibrio parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพอย่างมากต่ออุตสาหกรรมกุ้งในประเทศไทย อีกทั้งการแก้ปัญหาโดยใช้ยาปฏิชีวนะยังส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผลผลิตทำให้เกิดสารตกค้าง การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum inhibitory concentration; MIC) ของสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* รวมทั้งเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ด้วยวิธี Agar well diffusion โดยแบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลองๆละ 3 ซ้ำ ประกอบด้วยสารสกัดใบหูกวาง ใบฝรั่งและฟ้าทะลายโจร ที่ระดับความเข้มข้น 50, 25, 6.25 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์โดยมีน้ำกลั่นและออกซีเตตราไซคลินเป็นชุดควบคุม ผลการศึกษาพบว่าค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* มีค่าเท่ากัน คือ 6.25 เปอร์เซ็นต์และการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญ

¹วิทยาลัยประมงดินสอานนท์ สถาบันการอาชีวศึกษาเกษตรภาคใต้ นครศรีธรรมราช 80250

²Tinsulanonda Fisheries College, Regional Southern Institute of Vocational Education in Agriculture, Nakorn Si Thammarat, 80250

³บริษัทไทยยูเนียน แอชเชอร์ จำกัด พังงา 82140

⁴Thai Union Hatchery Co.,Ltd., Pang-Nga, 82140

*ผู้รับผิดชอบประสานงาน (Corresponding author) e-mail: krisanee_98@yahoo.com

ของเชื้อทั้งสองชนิด พบว่าสารสกัดใบหูกวาง (0.55 ± 13.25 มม.) และสารสกัดใบฝรั่ง ($\pm 13.501.58$ มม.) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* ดีกว่าสารสกัดฟ้าทะลายโจร ($\pm 7.100.26$ มม.) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่ระดับความเข้มข้น เพอร์เซ็นต์ 50 ในขณะที่สารสกัดใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้น เพอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพดีที่สุด 25 (12.55 ± 2.68 มม.) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ดังนั้นสารสกัดใบหูกวางและใบฝรั่งจึงน่าจะนำไปใช้ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อลดสารตกค้างในผลผลิตได้รวมทั้งสามารถลดต้นทุนการผลิตได้อีกด้วย

คำสำคัญ: สารสกัดสมุนไพร *Vibrio harveyi* *Vibrio parahaemolyticus* ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ABSTRACT

Vibrio harveyi and *Vibrio parahaemolyticus* have been the most common group of pathogenic bacteria affecting shrimp farming industry in Thailand. The use of antibiotics, as a solution, could result in antibiotic residues in aquaculture products. This study aimed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and compare inhibition efficiency of three extracted herbs on *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus* using agar well diffusion method. There were five treatments with three replications including Tropical Almond, Guava and the Creat leaf extracts at concentration of 50, 25, 12.5 and 6.25 % as well as the negative and positive control which were distilled water and oxytetracyclin respectively. The results shown that all treatments gave the same MIC values at 6.25 %. Besides, the results in efficiency comparison found that Tropical Almond (0.55 ± 13.25 mm) and Guava extracts ($\pm 13.501.58$ mm) showed the significant higher inhibition efficiency on *V. harveyi* than The Creat extract at 50 % concentration ($P < 0.05$). Moreover, Tropical Almond showed the significant highest inhibition efficiency (12.55 ± 2.68 mm) on *V. parahaemolyticus* at 25 % concentration ($P < 0.05$). The results indicated that both extracted herbs; Tropical Almond and Guava could be antibiotic substitutes for *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus* inhibition because of decrease in both production cost and residues.

Keywords: Extracted Herbs; *Vibrio harveyi*; *Vibrio parahaemolyticus*; Bacterial Inhibition Efficiency

บทนำ

กุ้งทะเลถือว่าเป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและเป็นสินค้าที่มีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก จากการที่ประเทศไทยมีสภาพภูมิประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีความได้เปรียบในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตพื้นที่ภาคใต้และภาคตะวันออก ทำให้การเพาะเลี้ยงกุ้งขยายตัวอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว กุ้งไทยเป็นสินค้าที่มีศักยภาพการแข่งขันในตลาดโลกสูงมากในช่วง 5 ปีที่ผ่านมาการส่งออกของกุ้งไทยเติบโตเฉลี่ยราว 12 เปอร์เซ็นต์ต่อปี สูงกว่าอัตราการเติบโตเฉลี่ยของโลกที่ 4 เปอร์เซ็นต์ต่อปี ประเทศไทยสามารถผลิตกุ้งได้ราว 500,000 ตันต่อปี ผลผลิตส่วนใหญ่ประมาณ 400,000 ตันใช้เพื่อการส่งออก ซึ่งสามารถสร้างรายได้เข้าประเทศได้ปีละกว่า 90,000 ล้านบาทต่อปี ส่งผล

ให้ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตและส่งออกกุ้งรวมถึงผลิตภัณฑ์แปรรูปที่สำคัญ ซึ่งเป็นที่ยอมรับและเป็นที่ต้องการของตลาดโลก[1]

อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของประเทศไทย ก็ประสบกับปัญหาในด้านต่างๆ ที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตเช่นเดียวกัน เนื่องจากการเลี้ยงกุ้งทะเลส่วนใหญ่จะเป็นการเลี้ยงแบบพัฒนา ซึ่งเกษตรกรจะปล่อยกุ้งลงเลี้ยงในอัตราความหนาแน่นสูง[2] ทำให้มีของเสียสะสมในบ่อมากส่งผลให้สัตว์น้ำเกิดโรคได้ง่าย ไม่ว่าจะเป็นสาเหตุมาจากคุณภาพน้ำ การจัดการ พ่อแม่พันธุ์และอาหาร โรคต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยง หรือมีการแพร่ระบาดอย่างรุนแรงในแต่ละช่วงของฤดูกาล ได้แก่ โรคจุดขาวหรือโรคตัวแดงดวงขาว (White Spot Disease) โรคไวรัสหัวเหลือง (Yellow Head Virus) โรคทอราซินโดรม (Taura syndrome) โรคกุ้งตายด่วน (Early Mortality Syndrome) เป็นต้น ซึ่งล้วนแต่เป็นโรคที่สร้างความเดือดร้อนให้แก่เกษตรกรเป็นอย่างมาก [3] โรคกุ้งที่สำคัญและทำให้ผลผลิตตกต่ำ มักเกิดจากเชื้อแบคทีเรียอันเนื่องมาจากมีของเสียบริเวณพื้นบ่อ รวมทั้งการจัดการสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การเกิดโรคส่วนใหญ่ มักเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* sp.) โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคตายด่วน (EMS) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และโรคเรืองแสงซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Vibrio harveyi* ส่งผลให้กุ้งมีอาการอ่อนแอและตายในที่สุดเนื่องจากตับและตับอ่อนถูกทำลาย โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio harveyi* ได้แก่ น้ำที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำ สารอินทรีย์สูง เศษตะกอนอินทรีย์ การหมักหมมของอุปกรณ์และเศษอาหารที่ตกค้างในบ่อ[4] ทำให้มีความจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการแก้ปัญหากันอย่างกว้างขวาง ยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้กันในประเทศไทย ได้แก่ Fluoroquinolone, Tetracyclin และ Sulfonamide[5] โดยยาปฏิชีวนะเหล่านี้ทำให้เกิดสารที่ตกค้างในตัวกุ้งอีกทั้งยังก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค จึงได้นักวิจัยหลายท่านพยายามคิดค้นศึกษาวิจัยในเรื่องการนำสมุนไพรมาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ยาสมุนไพรหมายถึงยาที่ได้มาจากพืช สัตว์ แร่ธาตุจากธรรมชาติที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพโครงสร้างภายใน สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคต่างๆ รวมทั้งสามารถบำรุงร่างกายได้[6] และสมุนไพรตามพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ. 2525 หมายถึงพืชที่ใช้ทำเป็นเครื่องยา สมุนไพรกำเนิดมาจากธรรมชาติและมีความหมายต่อชีวิตมนุษย์ โดยเฉพาะในทางสุขภาพการส่งเสริมสุขภาพและการรักษาโรค[7] จากการศึกษาค้นคว้าผลงานวิจัย พบว่ามีการนำสมุนไพรมาใช้ในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ไม่ว่าจะเป็นการเสริมในอาหาร ใช้ในบ่อเลี้ยงหรือใช้ในการเพิ่มภูมิคุ้มกันหรือรักษาโรคสัตว์น้ำ[8] ซึ่งส่งผลให้มีการนำยาสมุนไพรมาทดลองใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรที่สามารถพบหาได้ทั่วไป ได้แก่ หูกวาง ฝรั่งและฟ้าทะลายโจร ในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งผลการศึกษาน่าจะเป็นประโยชน์กับเกษตรกรในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อแก้ปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะ รวมทั้งเป็นการลดต้นทุนได้ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1.การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1.1 การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentrations; MIC) ของสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ประกอบด้วย 4 ชุดการทดลองฯ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 น้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 สารสกัดใบหูกวางด้วยเมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ระดับความเข้มข้น 50, 25, 12.5 และ 6.25 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 3 สารสกัดใบฝรั่งด้วยเมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ระดับความเข้มข้น 50, 25, 12.5 และ 6.25 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 4 สารสกัดใบฟ้าทะลายโจรด้วยเมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ระดับความเข้มข้น 50, 25, 12.5 และ 6.25 เปอร์เซ็นต์

1.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากสมุนไพร 3 ชนิดที่มีผลต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ด้วยวิธี Agar well diffusion ประกอบด้วย 5 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 สารสกัดใบหูกวางด้วยเมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ระดับความเข้มข้น 50, 25, 12.5 และ 6.25 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 2 สารสกัดใบฝรั่งด้วยเมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ระดับความเข้มข้น 50, 25, 12.5 และ 6.25 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 3 สารสกัดใบฟ้าทะลายโจรด้วยเมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ระดับความเข้มข้น 50, 25, 12.5 และ 6.25 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 4 น้ำกลั่น (ชุดควบคุมแบบลบ: Negative Control)

ชุดการทดลองที่ 5 ยาออกซิเตตราซัยคลิน ที่ระดับความเข้มข้น 0.0005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ชุดควบคุมแบบบวก: Positive Control)

2. การเตรียมสถานที่ วัสดุและอุปกรณ์

2.1 ขอใช้สถานที่ ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา วิทยาลัยประมงดินสุลานนท์ ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ 3 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และบริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) สาขา จังหวัดสงขลา

2.2 เตรียมวัสดุและอุปกรณ์

2.2.1 ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อวัสดุอุปกรณ์ โดยอุปกรณ์ที่เป็นเครื่องแก้วฆ่าเชื้อด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

2.2.2 เครื่องมืออุปกรณ์ที่เป็นพลาสติก ทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาอบเพื่อไล่ความชื้นด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

2.3 เตรียมสารสกัดจากสมุนไพร

2.3.1 นำใบหูกวาง ฝรั่งและฟ้าทะลายโจรมาล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่นและแช่ด้วยเมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้อัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 ต่อ 7 บมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

2.3.2 กรองสารละลายสมุนไพรด้วยผ้ากรองตาถี่ 1 ครั้งและกรองด้วยเครื่องกรองแบคทีเรียโดยใช้กระดาษกรองแบคทีเรียเบอร์ 4

2.3.3 นำไประเหยเพื่อแยกเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิของหม้อต้มน้ำ 40-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง นำสารสกัดสมุนไพรที่ได้ใส่ขวดแล้วหุ้มด้วย Aluminum Foil เพื่อป้องกันไม่ให้โดนแสง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3.4 เตรียมสารสกัดหูกวาง ผึ่งและฟาดละลายโจร โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ระดับความเข้มข้น 50, 25, 12.5 และ 6.25 เปอร์เซ็นต์

3. การเตรียมเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus*

เตรียมเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้รับการยืนยันจากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) ที่เติม NaCl 1.5 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดมาเลี้ยงต่อในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) ที่เติม NaCl 1.5 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาปั่นเพื่อแยกเซลล์ให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นใช้ Micropipette ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อภายในหลอดออกให้เหลือเพียงเชื้อแบคทีเรียที่ตกตะกอนอยู่บริเวณก้นหลอด เติมน้ำทะเลละลาย NaCl 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอด นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้ได้ค่า Optical Density (OD) เท่ากับ 0.1 (10⁶ cfu ต่อมิลลิลิตร) ก่อนนำไปทดสอบในการทดลองขั้นตอนต่อไป ซึ่งเชื้อแบคทีเรียปริมาณความเข้มข้น 10⁶ cfu ต่อมิลลิลิตร เป็นปริมาณความเข้มข้นที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้ง[9]

4. การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum inhibitory concentration; MIC) ของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

เติมน้ำสกัดสมุนไพรทุกระดับความเข้มข้นๆ ละ 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) 5 มิลลิลิตร นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้จากข้อที่ 3 เติมน้ำลงในหลอดทดลองที่มีสารสกัดสมุนไพรผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารแบบตั้งเวลา (Orbital shaker) ที่ความเร็วรอบ 160 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตความขุ่นใสของหลอดทดลอง โดยนำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่มีการเติมน้ำสกัดสมุนไพร) หลอดที่ใสหรือมีความขุ่นน้อยกว่าชุดควบคุม คือหลอดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารต่ำที่สุดและถือว่าที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้[10]

5. การทดสอบประสิทธิภาพ และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ด้วยวิธี Agar Well Diffusion

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีปริมาณความเข้มข้น 10⁶ cfu ต่อมิลลิลิตร มาเจือจางด้วยวิธี Ten Fold Dilution ให้ได้ปริมาณความเข้มข้นเชื้อ 10³ cfu ต่อมิลลิลิตร จากนั้นใช้ Micropipette ดูดสารละลายเชื้อจำนวน 0.1 ไมโครลิตร ลงใน Plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) ทำการ Spread Plate ให้ทั่ว ใช้ Cork borer เบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตรเจาะลงบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ตำแหน่ง โดยกำหนดระยะห่างเท่ากัน เติมน้ำสกัดของสมุนไพรทุกระดับความเข้มข้นลงในหลุมๆ ละ 0.1 ไมโครลิตร ตั้งไว้ 15 นาที แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการดูบริเวณวงใส (Clear Zone) ที่เกิดขึ้น โดยวัดด้วย Vernier Caliper รายงานเป็นหน่วยมิลลิเมตร ใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

บริเวณวงใส = เส้นผ่านศูนย์กลางที่เกิดขึ้นทั้งหมด - เส้นผ่านศูนย์กลางแท่งเจาะ (Cork borer)

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ F-test (ONE WAY ANOVA) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test

ผลการวิจัย

1. การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum inhibitory concentration; MIC) ของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า ค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรใบหูกวาง ฝรั่ง และฟ้าทะลายโจร ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* มีค่าเท่ากันทั้งหมด คือ 6.25 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum inhibitory concentration; MIC) ของสารสกัดสมุนไพร (แต่ละชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย)

ชุดการทดลอง	Minimum inhibitory concentration (MIC) (%)	
	<i>V. harveyi</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
สารสกัดใบหูกวาง	6.25	6.25
สารสกัดใบฝรั่ง	6.25	6.25
สารสกัดใบฟ้าทะลายโจร	6.25	6.25

2. การทดสอบประสิทธิภาพ และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ด้วยวิธี Agar Well Diffusion

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพร 3 ชนิดที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยการเปรียบเทียบเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณส่วนใส (Clear Zone) ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่า

ที่ระดับความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่ 2 (ฝรั่ง) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* (13.50 ± 1.58 มิลลิเมตร) และ *Vibrio parahaemolyticus* (11.75 ± 1.12 มิลลิเมตร) มากกว่าทุกชุดการทดลอง รองลงมาคือชุดการทดลองที่ 1 (หูกวาง) มีค่าเท่ากับ 13.25 ± 0.55 มิลลิเมตร และ 10.81 ± 0.43 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 3 (ฟ้าทะลายโจร) มีประสิทธิภาพน้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 7.10 ± 0.26 และ 1.56 ± 0.51 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ที่ระดับความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่ 1 (หูกวาง) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* (9.63 ± 1.85 มิลลิเมตร) และ *Vibrio parahaemolyticus* (12.55 ± 2.68 มิลลิเมตร) รองลงมา คือชุดการทดลองที่ 2 (ฝรั่ง) มีค่าเท่ากับ 7.95 ± 1.31 มิลลิเมตร และ 7.58 ± 1.23 มิลลิเมตร ตามลำดับ และ ชุดการทดลองที่ 3 (ฟ้าทะลายโจร) มีประสิทธิภาพน้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 4.00 ± 1.70 และ 0.90 ± 0.32 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ที่ระดับความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่ 1 (หูกวาง) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* (6.90 ± 0.73 มิลลิเมตร) และ *Vibrio parahaemolyticus* (5.96 ± 1.13 มิลลิเมตร) รองลงมา คือชุดการทดลองที่ 2 (ฝรั่ง) 4.03 ± 2.15 มิลลิเมตร และ 4.85 ± 0.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ

บทความวิจัย (Research Article)

วารสารวิชาการสถาบันการอาชีวศึกษาเกษตร

ปีที่ 6 • ฉบับที่ 1 • มกราคม – มิถุนายน 2565

และ ชุดการทดลองที่ 3 (ฟ้าทะลายโจร) มีประสิทธิภาพน้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 3.08 ± 1.97 และ 0.40 ± 0.17 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ที่ระดับความเข้มข้น 6.25 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่ 1 (หูกวาง) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* มากกว่าทุกชุดการทดลอง โดยมีค่าเท่ากับ 3.26 ± 0.52 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ 2 (ฝรั่ง) และชุดการทดลองที่ 3 (ฟ้าทะลายโจร) โดยมีค่าเท่ากับ 2.48 ± 1.09 มิลลิเมตร และ 0.19 ± 0.22 มิลลิเมตรตามลำดับ ในขณะที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ก็เป็นไปในทำนองเดียวกัน โดยมีค่าเท่ากับ 5.93 ± 1.89 4.36 ± 1.12 และ 0.03 ± 0.05 มิลลิเมตร ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าชุดการทดลองที่ 1 (หูกวาง) และชุดการทดลองที่ 2 (ฝรั่ง) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* มากกว่าชุดการทดลองที่ 3 (ฟ้าทะลายโจร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทุกระดับความเข้มข้น อย่างไรก็ตามที่ระดับความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ พบว่าชุดการทดลองที่ 1 (หูกวาง) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* มากกว่าชุดการทดลองที่ 2 (ฝรั่ง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 2)

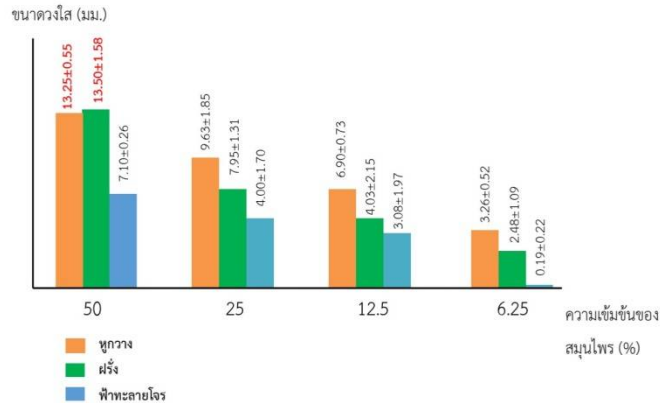
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพร 3 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

ชุดการทดลอง	ระดับความเข้มข้น (%)							
	50		25		12.5		6.25	
	ขนาดบริเวณส่วนใส (มม.) <i>V.harveyi</i>	<i>V.parahae-</i> <i>molyticus</i>	ขนาดบริเวณส่วนใส (มม.) <i>V.harveyi</i>	<i>V.parahae-</i> <i>molyticus</i>	ขนาดบริเวณส่วนใส (มม.) <i>V.harveyi</i>	<i>V.parahae-</i> <i>molyticus</i>	ขนาดบริเวณส่วนใส (มม.) <i>V.harveyi</i>	<i>V.parahae-</i> <i>molyticus</i>
สารสกัด ใบหูกวาง	0.55 ± 13.25^b	0.43 ± 10.81^b	$\pm 9.631.85^b$	12.55 ± 2.68^c	6.90 ± 0.73^b	5.96 ± 1.13^b	3.26 ± 0.52^b	5.93 ± 1.89^b
สารสกัด ใบฝรั่ง	$\pm 13.501.58^b$	$11.751.12^b$	7.95 ± 1.31^b	7.58 ± 1.23^b	$4.032.15^{\pm ab}$	0.50 ± 4.85^b	2.48 ± 1.09^b	4.36 ± 1.12^b
สารสกัด ฟ้าทะลายโจร	$\pm 7.100.26^a$	1.56 ± 0.51^a	4.00 ± 1.70^a	0.90 ± 0.32^a	3.08 ± 1.97^a	0.40 ± 0.17^a	0.19 ± 0.22^a	0.03 ± 0.05^a

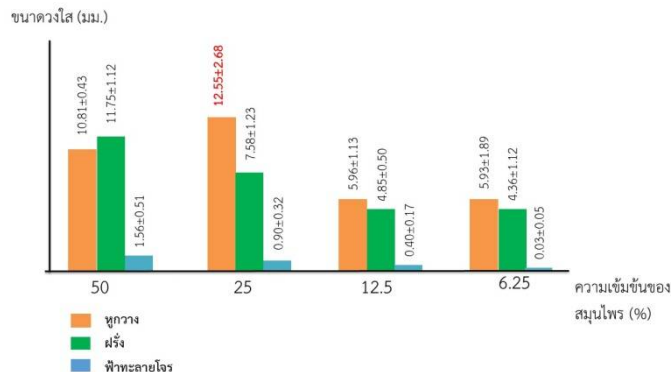
หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณส่วนใส (Clear Zone) ชุดควบคุมแบบลบ (Negative Control) และชุดควบคุมแบบบวก (Positive Control)

ชุดการทดลอง	ขนาดบริเวณส่วนใส (มม.)	
	<i>V. harveyi</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
น้ำกลั่น	0.00	0.00
ยาออกซิเตตราซัยคลิน	22.32	18.83



ภาพที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดสมุนไพรที่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้ง สามารถหาได้ง่ายในพื้นที่ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ ไบโพรกซิม ไบโพรซิม และฟิฟาลายโพร โดยการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด และนำไปใช้เป็นระดับความเข้มข้นตั้งต้นเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ในการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ด้วยวิธี Agar Well Diffusion โดยผลการศึกษาพบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้งสามชนิดมีค่า MIC เท่ากันคือ 6.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำประสิทธิภาพของสมุนไพรทั้งสามชนิดไม่แตกต่างกันและสอดคล้องกับผลการศึกษาของเพ็ญศรีและคณะ[11] ที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบฝรั่งด้วยวิธีการต้มที่มีต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio* ในกุ้งกุลาดำ โดยนำส่วนที่สกัดได้ไปทดสอบการยับยั้งการเติบโตของเชื้อสกุล *Vibrio* ที่แยกได้จากกุ้งป่วย 7 ชนิด พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของใบฝรั่งสดและใบฝรั่งตากแห้งที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* และเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* มีค่าเท่ากับ 0.156 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0.313 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลการศึกษา

ของอัญชลีและจิราพร [12] ที่ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งก้ามกราม 3 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยผลการศึกษพบว่าค่า MIC ของสารสกัดใบหูกวางที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio harveyi* เท่ากับ 2 ส่วนในพันส่วน และ 1 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ

ในส่วนของการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสมุนไพร 3 ชนิดในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่า ชุดการทดลองที่ 1 (สารสกัดใบหูกวาง) และชุดการทดลองที่ 2 (สารสกัดใบฝรั่ง) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ดีกว่าชุดการทดลองที่ 3 (สารสกัดใบฟ้าทะลายโจร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) อย่างไรก็ตามที่ระดับความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างสารสกัดหูกวาง (12.55 ± 2.68 มิลลิเมตร) และสารสกัดฝรั่ง (13.50 ± 1.58 มิลลิเมตร) ซึ่งน่าจะเป็นเพราะว่าสาร Tannin ในหูกวางและฝรั่ง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารกลุ่ม Lactone ในฟ้าทะลายโจร ประสิทธิภาพของสารสกัดใบฝรั่งยังยืนยันได้จากผลการศึกษาของสภาพและคณะ[13] ที่พบว่าปริมาณของแบคทีเรียเรืองแสงในน้ำเลือดกุ้งลดลงอย่างรวดเร็วและประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรียเรืองแสงของกุ้งกุลาดำที่ได้รับสารสกัดจากใบฝรั่งดีกว่าในชุดควบคุมที่ได้รับยาออกซิเตตราซัยคลิน

ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (6.25 %) สารสกัดสมุนไพรหูกวาง ฟ้าทะลายโจรและฝรั่ง สามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น สารสกัดฝรั่งและหูกวางมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์และดีกว่าสารสกัดฟ้าทะลายโจรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่สารสกัดหูกวางมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ โดยที่มีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดฝรั่งและสารสกัดฟ้าทะลายโจรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังนั้น การนำสารสกัดสมุนไพรจากหูกวางและฝรั่ง ไปใช้เพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม น่าจะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกของเกษตรกรที่สามารถลดต้นทุนการผลิตและลดปัญหาเรื่องสารตกค้างในผลผลิตของกุ้งขาวแวนนาไมได้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- [1] กรมประมง. (2564). การค้าสินค้าประมงของไทย. เข้าถึงได้จาก <https://www.fisheries.go.th/strategytradestat/images/pdf/monthly/2562/june62.pdf>
- [2] แก้วตา ลิ่มเฮง และคณะ. (2559). ผลของสารสกัดกระเทียมต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio harveyi*. วารสารแก่นเกษตร, 44(ฉบับพิเศษ 1), 650-655.
- [3] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา. (2564). โรค EMS ในกุ้ง. เข้าถึงได้จาก <http://www.nicaonline.com/web/index.php/2016-08-30-02-19-31/2016-08-30-14-14-19/838-ems>.
- [4] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา. 2564. วับริโอ (*Vibrio* spp.) แบคทีเรียก่อโรคในการเลี้ยงกุ้ง. เข้าถึงได้จาก https://www4.fisheries.go.th/local/index.php/main/view_blog/1411/107692
- [5] Graslund, S., et al. (2003). A field survey of chemicals and biological products used in shrimp farming. *Marine Pollution Bulletin*, 46(1), 81-90.

- [6] คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี. (2564). สมุนไพร. เข้าถึงได้จาก <https://med.mahidol.ac.th/poisoncenter/th/pois-cov/Herbal>
- [7] องค์การเภสัชกรรม. (2559). สรรพคุณทางยา. เข้าถึงได้จาก www.gpo.or.th/herbal.
- [8] Reverter, M., et al. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433, 50-61.
- [9] ชัยวุฒิ สุตทองคง และคณะ. (2550). ปริมาณและปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในกุ้งขาวแวนนาไม *Penaeus vannamei* ที่เลี้ยงในบ่อดิน. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 (น. 280 - 292). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- [10] ประสาทพร บริสุทธิ์เพชร และคณะ. (2551). การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในท้องปฏิบัติการ. ใน การประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มข. ครั้งที่ 9 (น. 91 - 101). ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- [11] เพ็ญศรี บุญตามช่วย และคณะ. (2548). ประสิทธิภาพของสารสกัดใบฝรั่งด้วยวิธีต้มต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำ. (เอกสารวิชาการฉบับที่ 47/2548, สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์)
- [12] อัญชลี อัมรงค์คงสถิต. (2552). ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งก้ามกราม. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ, มหาวิทยาลัยแม่โจ้).
- [13] สถาพร ดิเรกบุษราคัม และคณะ. (2541). เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบฝรั่งและอ็อกซีเตตราซัยคลิน ในการกำจัดแบคทีเรียเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36 (น. 112). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.