

ผลของการเสริมสารสกัดเสม็ดขาวเพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคไวรัส ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

Effects of Supplementation of *Melaleuca cajuputi* Extract to Control *Vibrio* Pathogen in *Litopenaeus vannamei* Aquaculture

สุนันตา ข้องสาย^{1*} ชัคกรียา ฉลาด¹ ปรีดา ภูมิ¹ และ เนตรนภา สุจริต¹
Sunanta Khongsai^{1*}, Chakhriya Chalad¹, Preeda Phumee¹,
and Netnapa Sutjarit¹

Received: 5 September 2023

Revised: 21 February 2024

Accepted: 8 July 2024

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมสารสกัดเสม็ดขาวในอาหารสำเร็จรูปเพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคไวรัสในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม โดยทำการสกัดใบเสม็ดขาวด้วยตัวทำละลายเอทานอล ระเหยตัวทำละลาย และทำแห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) นำผงสารสกัดที่ได้มาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ระดับความเข้มข้น 300 ppm พบว่าตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลกับน้ำในอัตราส่วน 8:2 สามารถละลายสารสกัดได้หมด มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 11.48 ± 0.00 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ 153.27 ± 0.20 มิลลิกรัมสมมูลของรูตินต่อมิลลิกรัมสารสกัด สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 90.21 ± 0.35 และ 99.52 ± 0.08 ตามลำดับ นำมาเลี้ยงกุ้งโดยการสเปรย์อาหารสำเร็จรูปในอัตราส่วน 50 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ผลการตรวจติดตามคุณภาพน้ำและเชื้อไวรัสในกุ้งขาวพบว่าน้ำในบ่อเลี้ยงชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ตรีัง ประเทศไทย 92150

¹Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang, Thailand 92150

*ผู้เขียนประสานงาน (Corresponding author) e-mail: sunanta.k@rmutsv.ac.th

สารสกัดเมล็ดชาวพบปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลีนีสีเขียวและโคลีนีสีเหลืองมากกว่าชุดควบคุม แต่พบปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลีนีสีเขียวและโคลีนีสีเหลืองในกุ้งชุดทดลองน้อยกว่าชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเมล็ดชาวส่งผลต่อการตอบสนองต่อความต้านทานเชื้อก่อโรควิบรีโอ สามารถนำมาพัฒนาเป็นสารเสริมอาหารเพื่อเสริมสุขภาพในกุ้งขาวและลดการติดเชื้อก่อโรคกลุ่มวิบรีโอได้

คำสำคัญ: สารเสริมอาหาร เมล็ดชาว เชื้อก่อโรคกลุ่มวิบรีโอ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ABSTRACT

The objective of this research was to investigate the effect of supplementation of *Melaleuca cajuputi* extract in ready-made feed to control *vibrio* spp. pathogen in *Litopenaeus vannamei* aquaculture. *M. cajuputi* leaves was extract with ethanol, then the solvent was removed by the rotary under vacuum evaporated and dried by freeze dry technique. The extract powder was prepared as a dietary supplement at a concentration of 300 ppm. Ethanol and water in a ratio of 8:2 was dissolved the extract well and significantly contain the highest amount of total phenolic content 11.48 ± 0.00 mg GAE/mg extract, total flavonoid content 153.27 ± 0.20 mg RE/mg extract and DPPH and ABTS free radicals inhibition with $90.21 \pm 0.35\%$ and $99.52 \pm 0.08\%$, respectively. The extract was sprayed on ready-made feed in a ratio of 50 milliliters to 1 kilogram of feed. The results of water quality monitoring and vibrio in white shrimp showed that the water in the experimental pond showed higher number of green and yellow bacterial colonies than that of control unit, but the amount of green and yellow bacterial colonies in the experimental shrimp was less than that of the control unit. It has been shown that *M. cajuputi* extract affects the response to resistance to *Vibrio* pathogens and can be developed as a dietary supplement to enhance health in *L. Vannamei* and reduce infection with *Vibrio* spp. pathogens.

Keywords: Feed Additive; *Melaleuca cajuputi*; Vibriosis; Aquaculture

บทนำ

เกษตรกรเลี้ยงกุ้งประสบปัญหาหลายด้านโดยเฉพาะการเกิดโรค ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงแบบพัฒนา ปล่อยุ้งลงเลี้ยงในอัตราหนาแน่นสูงทำให้มีของเสียสะสมในบ่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม ทำให้กุ้งในบ่อเลี้ยงเกิดความอ่อนแอและอยู่ในภาวะของการเครียดส่งผลต่อการเกิดโรคได้ง่ายและทำให้แบคทีเรียเข้าทำอันตรายได้ง่าย ซึ่งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคในกุ้งที่พบบ่อยได้แก่แบคทีเรียที่อยู่ในสกุลวิบรีโอ (*Vibrio* spp.) [1] การเกิดโรคในกุ้งขาวอาจไม่พบการติดเชื้อโรคและไม่พบการอักเสบในระยะเริ่มแรก เมื่อนำกุ้งป่วยมาแยกเชื้อจาก hepatopancreas จะพบเชื้อแบคทีเรียเป็นจำนวนมาก และเมื่อเกิดการตายจะพบการอักเสบอย่างเฉียบพลันของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนซึ่งส่งผลให้กุ้งตายได้ [2-4] มีงานวิจัยค้นคว้าหาแนวทางในการป้องกันการติดเชื้อโดยนำสมุนไพรหรือสารธรรมชาติมาใช้เพื่อป้องกันรักษาโรคในกุ้ง พบว่าการใช้สมุนไพรนอกจากสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคแล้วยังสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

และสามารถต่อต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย [5] สารเคมีที่พบในสมุนไพรจำนวนมากได้รับการพิสูจน์และยืนยันว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน การกำจัดอนุมูลอิสระ การลดความเครียด และการป้องกันการเกิดโรค เช่น สารฟลาโวนอยด์ในกลุ่ม alkaloids, flavonoids, phenolics, terpenoids, steroids และ essential oils [6]

พืชและสมุนไพรสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเนื่องจากมีสารสำคัญหรือสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ไกลซีร์ไรซิน (glycyrrhizin) ลิควิริติน (liquiritin) และกลาบริดิน (glabridin) รวมทั้งสารออกฤทธิ์อื่นๆ เช่น แอนทราควิโนน (anthraquinone) ซาโปนิน (saponin) อะซาไดแรคติน (azadirachtin) เป็นต้น การป้องกันและรักษาโรคทั้งทะเลในปัจจุบันมีการใช้สารสกัดจากสมุนไพรหรือพืชผักมากขึ้นเพื่อเป็นการลดและหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะ ไม่ให้เกิดปัญหาสารตกค้างในผลผลิตทั้งทะเล [7] กุ้งกุลาดำที่กินอาหารผสมสารสกัดกลุ่มโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน (*Durio zibethinus*) และสาร polyvinylpyrrolidone ที่สกัดได้จากพญาขอ (*Clinacanthus nutans*) มีความต้านทานเชื้อแบคทีเรียและไวรัสเพิ่มขึ้น กุ้งขาวที่ได้รับสารกลุ่ม phenolic alkanon ที่สกัดได้จากขิง (*Zingerone officinale*) สารซาโปนินที่สกัดจากยัคคา (*Yacca scidigera*) และสารสกัดจากว่านทองใบม่วง (*Gynura bicolor*) โดยการผสมอาหารให้กินมีความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียและไวรัสตัวแดงดวงขาวเพิ่มขึ้น [8-15] สารสกัดจากใบชาเขียวมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อในตับของกุ้งทดลองภายหลังการได้รับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* [4] สารสกัดจากผักกระสังสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งขาวแวนนาไม่ทำให้เพิ่มขึ้นมีผลตอบสนองที่สัมพันธ์ต่อความต้านทาน *V. parahaemolyticus* AHPND ในกุ้งขาวแวนนาไม่ทำให้มีอัตราการตายสูงขึ้น [7]

เสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi*) เป็นพืชในวงศ์ Myrtaceae มีชื่อสามัญ Cajuput tree, Milk wood และ Paper bark tree เป็นไม้ยืนต้นที่พบมากบริเวณป่าชายเลน ป่าพรุ มีองค์ประกอบทางฟลาโวนอยด์ที่น่าสนใจ ได้แก่ anthraquinones, terpenoids, flavonoids, saponins, tannins และ alkaloids [16] สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio harveyi* ได้ดี [17] มีรายงานว่สารฟลาโวนอยด์ที่พบในน้ำมันสกัดจากเสม็ดมีคุณสมบัติเป็น anti-inflammatory, anticancer, antioxidant, antimicrobial และยาฆ่าแมลง เมื่อนำมาศึกษาโดยใช้เทคนิค GCMS พบว่าองค์ประกอบทางเคมีที่พบประกอบด้วย caryophyllene (20.16%), α - terpinolene (17.0%), α - humulene (11.91%), β - elemene (7.62%) และ γ - terpinene (5.62%) ทั้งนี้องค์ประกอบทางเคมีอาจมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่ต่างกัน [18] ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาแนวทางในการใช้ประโยชน์จากสารสกัดเสม็ดขาวเพื่อป้องกันการติดเชื้อก่อโรคในกุ้ง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดดัดแปลงตามวิธีการของแก้วตา และคณะ [19]

เก็บใบเสม็ดขาวจากพื้นที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง นำมาทำความสะอาด ผึ่งลมให้แห้ง แล้วบดหยาบ นำไปสกัดด้วยการแช่หมักในตัวทำละลาย 95% เอทานอลในอัตราส่วนใบเสม็ดขาวบดหยาบ 1 กิโลกรัม ต่อตัวทำละลาย 95% เอทานอลปริมาณ 5 ลิตร เป็นเวลา 7 วัน กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนกากไปสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลซ้ำอีก 2 ครั้ง นำส่วนสารละลายไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Laborota 4000 efficient rotary evaporator; Heidolph instruments GmbH & Co. KG, Germany) แล้วทำให้แห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) และเก็บไว้ในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมผลิตภัณฑ์พร้อมใช้

นำผงสารสกัดเมล็ดข้าวจากข้อ 1 มาเตรียมผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ โดยนำมาละลายในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำให้มีความเข้มข้น 300 ppm ในอัตราส่วน 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10 ตามลำดับ สังเกตการละลาย และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ การออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้แต่ละสภาวะ

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกดัดแปลงตามวิธีการของ Messyasaz *et al.*, 2018 [20] ด้วยการทำปฏิกิริยากับ Folin – Ciocalteu Reagent (FCR) โดยนำผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 1.58 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Folin – Ciocalteu ลงไป 0.1 มิลลิลิตร เขย่าและเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตอิ่มตัว (Sat. Na₂CO₃) ลงไป 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV – Vis Spectrophotometer (Hitachi UV-1800 Spectrophotometer) โดยใช้น้ำเป็นแบลนด์เทียบค่าความเข้มข้นกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด (mg GAE/mg extract)

$$C(\text{mg GAE/mg extract}) = C_i(\text{mg ml}^{-1}) \times [V_1(\text{ml})/V_2(\text{ml})] \times [V_3(\text{ml})/m(\text{mg})] \quad (1)$$

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

V_1 หมายถึง ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (ml)

V_2 หมายถึง ปริมาตรของสารสกัดที่ใช้ในปฏิกิริยา (ml)

V_3 หมายถึง ปริมาตรของสารสกัดที่เตรียมเป็นสารตัวอย่าง (ml)

m หมายถึง มวลของสารสกัดที่นำมาเตรียมเป็นสารตัวอย่าง (mg)

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ดัดแปลงตามวิธีการของ Messyasaz *et al.*, 2018 [20] ด้วยวิธีอลูมิเนียมคลอไรด์ โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาเชิงซ้อนระหว่าง Al^{3+} กับหมู่คาร์บอนิลและหมู่ไฮดรอกซิลของฟลาโวนส์และฟลาโวนอลส์ โดยนำผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมนีแทนอล 0.8 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย 5% NaNO₂ ลงไป 0.06 มิลลิลิตร เขย่า และนำส่วนผสมเก็บไว้ที่มืด เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำ 10% AlCl_3 ลงไป 0.06 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำส่วนผสมเก็บไว้ที่มืด เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำ 1M NaOH ลงไป 0.4 มิลลิลิตร ตามด้วยเมทานอล 0.28 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำส่วนผสมเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสง 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV – Vis Spectrophotometer (Hitachi UV-1800 Spectrophotometer) โดยใช้เมทานอลเป็นแบลนด์ เทียบค่าความเข้มข้นกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัด ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมของรูตินต่อสารสกัดแห้ง (mg RE/mg extract)

$$C(\text{mg RE/g extract}) = C_i(\text{mg ml}^{-1}) \times [V_1(\text{ml})/V_2(\text{ml})] \times [V_3(\text{ml})/m(\text{g})] \quad (2)$$

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

V_1 หมายถึง ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (ml)

V_2 หมายถึง ปริมาตรของสารสกัดที่ใช้ในปฏิกิริยา (ml)

V_3 หมายถึง ปริมาตรของสารสกัดที่เตรียมเป็นสารตัวอย่าง (ml)

m หมายถึง มวลของสารสกัดที่นำมาเตรียมเป็นสารตัวอย่าง (g)

2.3 การทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของผลิตภัณฑ์ตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี และ BHT โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซีและ BHT ให้มีความเข้มข้น 300 ppm

2.3.1 DPPH Assay ดัดแปลงตามวิธีการของ Ling, et al. [21] โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน/ผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติม 0.1 mM DPPH ลงไป 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer (Hitachi UV-1800 Spectrophotometer) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง DPPH radical

$$\% inhibition = \frac{(A_{control} - A_{sample}) \times 100}{A_{control}} \quad (3)$$

เมื่อ $A_{control}$ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

A_{sample} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน/ผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ที่มี DPPH

2.3.2 ABTS Assay ดัดแปลงตามวิธีการของ Laosirisathian, et al. [22] โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน/ผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ลงไป 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV – Vis Spectrophotometer (Hitachi UV-1800 Spectrophotometer) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ABTS radical

$$\% inhibition = \frac{(A_{control} - A_{sample}) \times 100}{A_{control}} \quad (4)$$

เมื่อ $A_{control}$ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของ $ABTS^{\bullet+}$

A_{sample} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน/ผลิตภัณฑ์ตัวอย่างที่มี $ABTS^{\bullet+}$

3. การเสริมสารสกัดเมล็ดข้าวในการเลี้ยงกุ้งขาวดัดแปลงตามวิธีการของอริสา [3]

3.1 การเตรียมระบบทดลอง

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

3.2 การเตรียมอาหาร

อาหารที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูปชนิดเม็ดจมสำหรับลูกกุ้งวัยอ่อนเบอร์ 1 เมื่อลูกกุ้งมีขนาด 1.5 กรัม, 3 กรัม และตั้งแต่ 7 กรัม ขึ้นไปจึงปรับใช้อาหารเบอร์ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณอาหารในอัตรา 20–30 กรัมต่อวันจนครบ 90 วัน

อาหารชุดควบคุม: เตรียมอาหารชุดควบคุมโดยใช้น้ำมันปลาคลุกผสมกับอาหารสำเร็จรูปในอัตราส่วนอาหารกุ้ง 1 กิโลกรัมต่อน้ำมันปลา 20 มิลลิลิตร

อาหารชุดทดลอง: เตรียมอาหารชุดทดลองโดยนำสารสกัดเสม็ดขาวความเข้มข้น 300 ppm ที่ละลายในเอทานอล:น้ำในอัตราส่วน 8:2 สเปรย์บนอาหารสำเร็จรูป คลุกให้ทั่ว ผึ่งลมให้แห้งและเคลือบด้วยน้ำมันปลาในอัตราส่วนสารสกัด 50 มิลลิลิตรต่ออาหารกุ้ง 1 กิโลกรัมต่อน้ำมันปลา 20 มิลลิลิตร

3.3 การให้อาหาร

ชุดควบคุม: ให้อาหารชุดควบคุมทุกวัน วันละ 3 มื้อ ตลอดระยะเวลาการทดลอง

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

3.4 การตรวจวัดคุณภาพน้ำ

ทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำระหว่างการทดลองทุกสัปดาห์ตลอดการทดลอง โดยดัชนีที่จะใช้วิเคราะห์คุณภาพน้ำประกอบด้วย ความเค็มของน้ำ pH ปริมาณค่าความเป็นด่าง ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณแอมโมเนียม ความกระด้าง ปริมาณแคลเซียม ปริมาณแมกนีเซียม ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนที่ละลายในน้ำ และทำการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ของน้ำในบ่อเลี้ยงทั้ง 2 ชุดการทดลองด้วยเทคนิค Spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS) ดัดแปลงตามวิธีการของอรุณ [24]

3.5 สุ่มตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไมจากการทดลองบ่อละ 5 ตัว ทุกๆ 10 – 20 วัน โดยเก็บตัวอย่างตัวกุ้ง และทำการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. เช่นเดียวกับการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียในน้ำ

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

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

ผลการวิจัย

สารสกัดเสม็ดขาวให้ผลผลิตร้อยละ 6.67 นำผงสารสกัดเสม็ดขาวมาเตรียมผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ โดยนำมาละลายในตัวทำละลายเอทานอลและน้ำให้มีความเข้มข้น 300 ppm ในอัตราส่วน 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10 ตามลำดับ เพื่อทดสอบความสามารถในการละลายได้ของสารสกัดโดยสังเกตด้วยสายตา ตัวทำละลายที่ละลายได้ดีจะให้สารละลายที่มีความใส ไม่มีตะกอน [23] ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดเสม็ดขาวในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในอัตราส่วน 8:2 สามารถละลายได้หมด ได้สารละลายสีเหลืองใส ไม่มีตะกอน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์สูงที่สุดและสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ได้ดีที่สุด ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความสามารถในการละลาย ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ การออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์พร้อมใช้แต่ละสภาวะ

Sample	ratio EtOH: H ₂ O	Solvent soluble	TPC (mg GAE/mg extract)	TFC (mg RE/g extract)	% inhibition	
					DPPH	ABTS
S0	10: 0	++	7.76 ± 0.00 ^g	76.38 ± 0.35 ⁱ	84.37 ± 0.33 ^d	98.18 ± 0.08 ^e
S1	9 : 1	+++	10.07 ± 0.38 ^{c,d}	127.33 ± 0.35 ^c	87.08 ± 0.30 ^c	98.37 ± 0.08 ^d
S2	8 : 2	++++	11.48 ± 0.00 ^a	153.27 ± 0.20 ^a	90.21 ± 0.35 ^a	99.52 ± 0.08 ^a
S3	7 : 3	+++	11.02 ± 0.02 ^b	135.70 ± 0.20 ^b	87.96 ± 0.30 ^b	98.99 ± 0.14 ^b
S4	6 : 4	++	10.11 ± 0.01 ^c	123.20 ± 0.20 ^d	86.97 ± 0.33 ^c	98.75 ± 0.08 ^c
S5	5 : 5	+	9.91 ± 0.02 ^{c,d}	105.98 ± 0.20 ^f	84.56 ± 0.35 ^d	98.71 ± 0.00 ^c
S6	4 : 6	+	9.88 ± 0.01 ^d	110.46 ± 0.20 ^e	82.59 ± 0.35 ^e	98.61 ± 0.08 ^c
S7	3 : 7	+	9.65 ± 0.02 ^e	100.56 ± 0.20 ^g	80.16 ± 0.39 ^f	98.23 ± 0.08 ^{d,e}
S8	2 : 8	+	8.97 ± 0.01 ^f	90.53 ± 0.00 ^h	80.14 ± 0.22 ^f	97.84 ± 0.14 ^f
S9	1 : 9	+	7.51 ± 0.01 ^h	75.79 ± 0.20 ^j	77.94 ± 0.42 ^g	97.70 ± 0.00 ^{f,g}
S10	0 : 10	+	3.94 ± 0.02 ⁱ	44.42 ± 0.20 ^k	77.74 ± 0.34 ^g	97.65 ± 0.08 ^g

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวดังหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P \leq 0.05$)

- ++++ หมายถึงละลายได้ดีมาก
 +++ หมายถึงละลายได้ดี
 ++ หมายถึงละลายได้น้อย
 + หมายถึงละลายได้น้อยมาก

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ และการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.944, 0.761 และ 0.804 ตามลำดับ ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์มีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.872 และ 0.889 ตามลำดับ การออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH มีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.889 ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ การออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS

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

หมายเหตุ: สหสัมพันธ์มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

การละลายได้ในตัวทำละลายส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ และการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS จึงเลือกผลิตภัณฑ์ที่ละลายในตัวทำละลายผสมระหว่าง เอทานอลและน้ำในอัตราส่วน 8:2 เป็นสารเสริมอาหารในการเลี้ยงกุ้ง

ทำการเลี้ยงกุ้งขนาด PL12 เป็นเวลา 90 วัน โดยตรวจติดตามคุณภาพน้ำในระบบเลี้ยงและตรวจหาเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ทั้ง 2 ชุดการทดลองตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 90 วันพบว่าค่าดัชนีของคุณภาพน้ำทางเคมี ได้แก่ ค่าความเค็มของน้ำ ค่า pH ค่าความเป็นด่าง ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณแอมโมเนีย ค่าความกระด้าง ปริมาณแคลเซียม ปริมาณแมกนีเซียม และปริมาณอินทรีย์คาร์บอนที่ละลายในน้ำ ในระบบเลี้ยงทั้ง 2 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน ให้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 3 จากการเพาะเชื้อตัวอย่างน้ำเพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. พบว่าน้ำในระบบเลี้ยงชุดควบคุมพบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. กลุ่มโคโลนีสีเขียวและกลุ่มโคโลนีสีเหลือง 1.52 ± 0.82 และ 1.62 ± 0.14 ($\times 10^2$ CFU/ml) ส่วนน้ำในระบบเลี้ยงชุดทดลองพบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. กลุ่มโคโลนีสีเขียวและกลุ่มโคโลนีสีเหลือง 4.02 ± 0.17 และ 9.83 ± 0.25 ($\times 10^2$ CFU/ml) คุณภาพน้ำในระบบเลี้ยงตลอดการทดลองอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดตามแนวปฏิบัติในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสำหรับฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล [25-26]

การเพาะเชื้อตัวอย่างตักกุ้งเพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. พบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. กลุ่มโคโลนีสีเขียวและกลุ่มโคโลนีสีเหลืองในชุดควบคุม 8.28 ± 1.03 ($\times 10^2$ CFU/g) และ 95.30 ± 1.37 ($\times 10^2$ CFU/g) ตามลำดับ ส่วนชุดทดลองพบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. กลุ่มโคโลนีสีเขียวและกลุ่มโคโลนีสีเหลือง เท่ากับ 5.68 ± 1.14 และ 1.38 ± 1.14 ($\times 10^2$ CFU/g) ตามลำดับ

ตารางที่ 3 คุณภาพน้ำและการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในกุ้ง

	Parameter	Controlled Group	Experimental Group	Standard
H ₂ O	Salinity (ppt)	25.0 $\pm$ 1.7	24.0 $\pm$ 1.6	10 – 30 [25]
	pH	8.2 $\pm$ 0.2	8.2 $\pm$ 0.3	7.8 – 8.2 [25]
	Alkalinity (ppm)	88.6 $\pm$ 15.2	89.9 $\pm$ 15.2	80 – 160 [25]
	Nitrite (ppm)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	$\leq$ 0.2 [25]
	Ammonium (NH ₄ ⁺) (ppm)	0.4 $\pm$ 1.4	0.1 $\pm$ 0.3	$\leq$ 0.4 [25]
	Hardness (ppm)	4,124.0 $\pm$ 734.6	4,298.2 $\pm$ 713.4	$\geq$ 300[25]
	Calcium (ppm)	300.0 $\pm$ 102.5	304.1 $\pm$ 93.4	NA
	Magnesium (ppm)	812.0 $\pm$ 139.8	850.1 $\pm$ 148.6	NA
	DOC (ppm)	11.6 $\pm$ 6.3	10.8 $\pm$ 5.7	NA
	<i>Vibrio</i> spp. ($\times 10^2$ CFU/ml)			
Shrimp	- Green colonies	1.52 $\pm$ 0.82	4.02 $\pm$ 0.17	$\leq 10^3$ [26]
	- Yellow colonies	1.62 $\pm$ 0.14	9.83 $\pm$ 0.25	$\leq 10^3$ [26]
	<i>Vibrio</i> spp. ($\times 10^2$ CFU/ml)			
	- Green colonies	8.28 $\pm$ 1.03	5.68 $\pm$ 1.14	$\leq 10^3$ [26]
	- Yellow colonies	95.30 $\pm$ 13.70	1.38 $\pm$ 1.14	$\leq 10^3$ [26]

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ใบเสม็ดขาวมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งขาวได้ เนื่องจากจากองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดใบเสม็ดขาวที่สกัดด้วยเอทานอลพบสารสำคัญกลุ่ม anthraquinones, terpenoids, flavonoids, saponins, tannins และ alkaloids [16] สารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นสารทุติยภูมิที่พบในพืชและมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดมักแปรผันตรงกับประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย [27-28] ผลการศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในตับกุ้งพบว่ากุ้งขาวชุดทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดเสม็ดขาวมีปริมาณแบคทีเรียต่ำกว่ากุ้งขาวชุดควบคุมมีความสอดคล้องกับคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเสม็ดขาว [13] ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ที่พบในตับกุ้งขาวชุดควบคุมมากกว่าชุดทดลอง ในขณะที่ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ที่พบในน้ำของระบบเลี้ยงในชุดทดลองมากกว่าชุดควบคุม แสดงว่ากุ้งขาวชุดทดลองมีความต้านทานการติดเชื้อ *Vibrio* spp. ได้ เนื่องจากน้ำในระบบเลี้ยงพบปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. มากกว่า แต่มีโอกาสพบเชื้อในตับน้อยกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และปริมาณเชื้อที่พบมีค่าไม่เกิน 10^3 CFU/g กล่าวได้ว่ากุ้งขาวชุดทดลองมีโอกาสเกิดโรคจากการติดเชื้อ *Vibrio* spp. น้อยกว่าชุดควบคุม [29] เป็นผลจากการได้รับอาหารที่เสริมสารสกัดจากเสม็ดขาวซึ่งมีองค์ประกอบของสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย [28] และอาจมีกลไกการต้านแบคทีเรียแบบการต้านการสร้างไบโอฟิล์ม เนื่องจากในสภาวะที่มีเชื้อแบคทีเรียในน้ำ กุ้งขาวชุดทดลองที่ได้รับสารสกัดพบเชื้อที่ตบ่น้อยกว่ากุ้งขาวชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเสม็ดขาวที่สกัดด้วยทำละลายเอทานอลสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Vibrio* spp. โดยป้องกันการเกาะและสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียได้ด้วย [30] ดังนั้นการให้อาหารเสริมสารสกัดเสม็ดขาวตั้งแต่เริ่มเลี้ยงในกุ้งขนาด PL12 – PL15 จึงเป็นแนวทางหนึ่งการสร้างภูมิคุ้มกันให้กุ้งได้เติบโตแข็งแรงและต้านทานต่อโรคได้ แสดงถึงศักยภาพของเสม็ดขาวซึ่งเป็นพืชพื้นถิ่นสามารถนำมาพัฒนาเป็นทางเลือกเพื่อใช้เป็นสารต้านจุลชีพสำหรับผสมในอาหารกุ้งเพื่อป้องกันโรคติดเชื้อไวรัสในกุ้งขาวได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรมประจำปี พ.ศ. 2565

References

- [1] Wongwuttawat, K., et al. (2022). Efficiency of Three Extracted Herbs on Inhibition of *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Vocational Institute of Agriculture*, 6(1), 13-22. (in Thai)
- [2] Penprapai, N., et al. (2019). *Efficiency of Food with Composition of Coconut Oil with Extracted from Curcumin (Curcuma zedoaria) to Immune System of Pacific White Shrimp (Litopenaeus Vannamei)* (Research reports). Nakhon Si Thammarat: Rajamangala University of Technology Srivijaya. (in Thai)
- [3] Srimarksuk, A. (2012). *Growth, Survival, Non-Specific Immune Characteristics and Resistance to Vibrio harveyi of Pacific White Shrimp (Litopenaeus Vannamei)* Fed

- with Yeast Cell Debris, (Master thesis, Kasetsart University). (in Thai)
- [4] Chareansak, N. & Supprasert, P. (2015). *Effect of Green Tea Extract on Inhibition of Vibrio parahaemolyticus in Pacific White Shrimp (Litopenaeus vannamei)*, (Senior Project, Silpakorn University). (in Thai)
- [5] Rattanachaikunsopon, P. & Phumkhachorn, P. (2010). Use of Herbs as Prophylactic and Therapeutic Agents in fish. *Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University*, 12(4), 63-70. (in Thai)
- [6] Itsaro, A. (2010). *Development of Multiplex PCR Technique for Detection of Streptococcus in Economic Fish of Thailand*, (Master thesis, Prince of Songkla University). (in Thai)
- [7] Chaweepak, T., et al., (2021). Efficacy of *Peperomia pellucida* extract on the Immune System and Disease Resistance in Pacific White Shrimp (*Penaeus Vannamei*) (Research reports). Bangkok: Ministry of Agriculture and Cooperatives. (in Thai)
- [8] Sonthi, M. (2015). *Farm Management and Control Organic Matters in Shrimp Farm to Outbreak of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Shrimp* (Research reports). Chanthaburi: Burapha University. (in Thai)
- [9] Chitmanat, C. (2013). Effects of Herbal Products on Fish Immunity. *KKU Research Journal*, 18(2), 257-269. (in Thai)
- [10] Hai, V. N. (2015). The Use of Medicinal Plants Immunostimulants in Aquaculture: A Review. *Aquaculture*, 446, 88-96.
- [11] Pholdaeng, K. & Pongsamart, S. (2010). Studies on the Immunomodulatory Effect of Polysaccharide Gel Extracted from *Duriozibethinus* in *Penaeus monodon* Shrimp Against *Vibrio harveyi* and WSSV. *Fish Shellfish Immunol*, 28(4), 555-561.
- [12] Direkbusarakom, S., et al. (1996). *Screening of Thai Traditional Herbs Against Shrimp Pathogenic Bacteria* (Research reports). Bangkok: Ministry of Agriculture and Cooperatives. (in Thai)
- [13] Chang, Y. P., et al. (2012). Dietary Administration of Zingerone to Enhance Growth, Non-Specific Immune Response, and resistance to *Vibrio alginolyticus* in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*) Juveniles. *Fish and Shellfish Immunol*, 32, 284-290.
- [14] Yang, Q. H., et al. (2015). Effect of Different Levels of *Yucca schidigera* Extract on the Growth and Nonspecific Immunity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus Vannamei*) and on Culture Water Quality. *Aquaculture*, 439, 39-44.
- [15] Wu, C. C., et al. (2015). Dietary administration of *Gynura bicolor* (Roxb. Willd.) DC water extract enhance immune response and survival rate against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunol*, 42(1), 25-33.
- [16] Khongsai, S. (2017). *Phytochemical and Biological Activity of Melaleuca cajuputi and Syzygium gratum Extracts* (Research reports). Trang: Rajamangala University of Technology Srivijaya. (in Thai)

- [17] Khongsai, S., et al. (2019). *Effective of Melaleucacajuputi and Syzygiumgratum Extracts to Inhibit Bacterial Pathogens in Shrimp and Fish* (Research reports). Trang: Rajamangala University of Technology Srivijaya. (in Thai)
- [18] Sharif, Z. M., et al. (2019). Chemical Composition of *Melaleucacajuputi* Powell. *International Journal of Engineering and Advanced Technology*, 9(1), 3479-3483.
- [19] Limhang, K., et al. (2017). Effects of Supplemented Feed with Dragon Fruit Peel Extraction to Enhance Color in *Procambarus clarkia*. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 45(Suppl1), 825-830. (in Thai)
- [20] Messyas, B., et al. (2018). Valuable Natural Products from Marine and Freshwater Macroalgae Obtained from Supercritical Fluid Extracts. *Journal of Applied Phycology*, 30, 591-603.
- [21] Ling, A. L. M., et al. (2015). Effect of Different Drying Techniques on the Phytochemical Content and Antioxidant Activity of *Kappaphycus alvarezii*. *Journal of Applied Phycology*, 27, 1717-1723.
- [22] Laosirisathian, N., et al. (2020). The Chemical Composition, Antioxidant and Anti-Tyrosinase Activities, and Irritation Properties of *Sripanya Punica granatum* Peel Extract. *Cosmetics*, 7(7), 1-13.
- [23] National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS). (2003). *Test Method Protocol for Solubility Determination: In Vitro Cytotoxicity Validation Study*. Maryland: National Institutes of Health (NIH)
- [24] Chanchaichaovivat, A. & Kaewtham, J. (2012). Detection of enteropathogenic Bacteria in White Leg Shrimps from Markets in Dhonburi District. *Advanced Science Journal*, 12(1), 85-96. (in Thai)
- [25] National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards. (2015). *Guidance on the application of Thai agriculture standard TAS 7401(G)-2015*. Bangkok: National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards. (in Thai)
- [26] Agricultural Research Development Agency (Public Organization). (2013). *The next step for Thai shrimp after Early Mortality Syndrome: EMS*. Bangkok: Agricultural Research Development Agency (Public Organization). (in Thai)
- [27] lawsipo, P., et al. (2017). Antibacterial and Antioxidant Activities of *Cerberamanghas* and *C. odollamleaf* Extracts. *Burapha Science Journal*, 22(Suppl), 129-140. (in Thai)
- [28] Nupan, B., et al. (2016). Phytochemical and Antibacterial Studies of the Crude Leaves' Extract from *Limnophila rugosa* (Roth) Merr. *Songklanakarin Journal of Plant Science*, 3(Suppl.III), M02/26-33. (in Thai)
- [29] Sonthi, M. (2016). Use of Immunostimulants in Marine Shrimps. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 44(2), 373-382. (in Thai)
- [30] Wongprasert, K. (2019). *Investigation of the Anti-Bacterial Effect of the ethanol Extract from the Red Seaweed Gracilariaphishi Against Shrimp Pathogenic Bacteria V.*

Research Article

Journal of Vocational Education in Agriculture Vol. 9 ● No. 1 • January – June 2025

parahaemolyticus, *V. harveyi*, and Human Pathogenic Bacteria: The Underlining Mechanism And Bioactive Compound (Research reports). Bangkok: Mahidol University. (in Thai)