Research Article
Journal of Vocational Education in Agriculture Vol. 9 ● No. 2 • July – December 2025

ผลของสารสกัดจากใบชะครามในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Photobacterium damselae*

Effect of *Suaeda maritima* (L.) Dumort leave extract against *Photobacterium damselae*

อลิสา เทียมสกุล[1*] รวิวรรณ วัฒนดิลก[1] วันชัย วงสุดาวรรณ[1] และ อาวุธ หมั่นหาผล[1]
Alisa Thiamsakul[1*], Rawiwan Watanadilok[1], Wanchai Wongsudawan[1], and Arvut Munhapon[1]

Received: 13 August 2024
Revised: 25 March 2025
Accepted: 8 August 2025

บทคัดย่อ

ชะคราม (*Suaeda maritima* (L.) Dumort.) เป็นพืชล้มลุกที่พบทั่วไปในบริเวณชายฝั่งทะเลและป่าชายเลน ซึ่งสารสกัดจากชะครามมีศักยภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Photobacterium damselae* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำและอาจก่อให้เกิดการติดเชื้อฉวยโอกาสในมนุษย์ของสารสกัดจากใบชะครามที่เก็บจากป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี ในการศึกษานี้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดหยาบจากใบชะครามสีแดงและสีเขียวด้วยวิธี disc diffusion ประเมินค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum Bactericidal Concentration; MBC) จากนั้นใช้เทคนิค bioautography และ Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) ทำการทดสอบและแยกชนิดสารที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์บางส่วน ผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อดิสก์ สารสกัดหยาบจากใบชะครามสีแดงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. damselae* ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากใบชะครามสีเขียว โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 12±0.0 และ 0.7±0.0 มิลลิเมตร

[1]สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี ประเทศไทย 20131
[1]The Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi, Thailand 20131
*ผู้นิพนธ์ประสานงาน (Corresponding author) e-mail: alisa.th@buu.ac.th

ตามลำดับ และใบชะครามสีแดงมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการแยกสารสกัดจากใบชะครามสีแดงด้วยเทคนิค bioautography และ PTLC จะได้สารออกมา 3 กลุ่มได้แก่ fr.1, fr.2 และ fr.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อพบว่า fr.2 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. damselae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 11±0.0 มิลลิเมตร และมีค่า MIC และ MBC ของสารสกัด fr.2 เท่ากับ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการทำให้สารสกัดบริสุทธิ์ขึ้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *P. damselae* ได้สูงถึง 10 เท่า แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารสกัดจากใบชะครามในการพัฒนาต่อยอดเป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียในอนาคต

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ สารสกัดจากใบชะคราม Bioautography *Photobacterium damselae* *Suaeda maritima*

ABSTRACT

Suaeda maritima (L.) Dumort, commonly known as seablite, is a halophytic plant widely found in coastal areas and mangrove forests. Previous studies have indicated that extracts from Suaeda possess antimicrobial properties. Hence, this study aimed to investigate the inhibitory effects of crude extracts from seablite leaves, collected from mangrove forests in Chonburi Province, against *Photobacterium damselae*. This bacterium is a pathogen affecting aquatic animals and can also cause opportunistic infections in humans.In this study, we evaluated the antimicrobial activity of both red and green seablite leaf crude extracts using the disc diffusion method.The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were also determined. To enhance the purity of the extracts, bioautography and Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) techniques were applied to identify and partially purify the antimicrobial compounds. The study found that the crude extract from red Suaeda leaves at 20mg/disc significantly inhibited *P. damselae* with an average inhibition zone of 12±0.0 mm, while the green extract showed only 0.7±0.0 mm. The MIC and MBC values for red Suaeda leaves were 12.5 mg/ml. After partial purification using PTLC and bioautography, three fractions were obtained: fr.1, fr.2, and fr.3. Among these, fr.2 showed the highest efficacy in inhibiting *P. damselae* at 1 mg/disc, with an inhibition zone diameter of 11±0.0 mm and both MIC and MBC values of 1.25 mg/ml. These results indicate that the partial purification of the crude extract significantly enhanced its effectiveness in inhibiting *P. damselae* by up to tenfold, suggesting seablite leaf extracts have promising potential as antibacterial agents.

Keywords: Antimicrobial Activity; Seablite Leaf Extract; Bioautography; *Photobacterium damselae*; *Suaeda maritime*

บทนำ

Photobacterium damselae เดิมมีชื่อว่า *Vibrio damsel* [1] เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อยู่ในวงศ์ Vibrionaceae เชื้อนี้เป็นสาเหตุสำคัญของโรคในสัตว์น้ำ ส่งผลให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการประมงและเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างกว้างขวาง ในปัจจุบัน *P. damselae* ถูกจัดให้เป็นโรคอุบัติใหม่ เนื่องจากมีการระบาดเพิ่มขึ้นและแพร่กระจายไปยังหลายภูมิภาคทั่วโลก รวมถึงทวีปแอฟริกา เอเชีย ยุโรป ออสเตรเลีย และโอเชียเนีย [2-5] เชื้อนี้เป็นสาเหตุของโรค Pasteurellosis ซึ่งทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดทั้งในปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม [6] นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดโรค hemorrhagic septicemia โดยมีลักษณะเป็นแผลอักเสบและมีจุดเลือดออกตามลำตัวหรืออวัยวะภายใน เช่น ตับ ม้าม และไต ซึ่งนำไปสู่การตายของสัตว์น้ำในที่สุด [7, 8] เชื้อ *P. damselae* ยังพบได้ในสัตว์น้ำหลากหลายชนิด เช่น กลุ่มครัสเตเชียน (crustaceans) มอลลัส (molluscs) และซิเทเชียน (cetaceans) [1] โดยเฉพาะอย่างยิ่งสปีชีส์ย่อย (subspecies) ของเชื้อนี้ได้แก่ *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* [9] และ *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* [6] มักเกี่ยวข้องกับการตายของสัตว์น้ำจำนวนมาก ในประเทศไทยมีรายงานการพบ *P. damselae* subsp. *Damselae* ในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) [10] ที่น่าสนใจคือ *P. damselae* ยังสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบฉวยโอกาส (opportunistic infection) ในมนุษย์ได้ โดยเฉพาะการติดเชื้อที่ผิวหนังและเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังอย่างรุนแรงเรียกว่า Necrotizing Fasciitis หรือโรคแบคทีเรียกินเนื้อ ซึ่งทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อและอาจลุกลามไปยังส่วนอื่นๆของร่างกาย มีรายงานอุบัติการณ์การติดเชื้อ *P. damselae* ในเด็กอายุ 5 ขวบ พบว่ามีผลทำให้เกิดอาการช็อก (septic shock) และเสียชีวิตภายใน 5 ชั่วโมงหลังจากเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล [11] การติดเชื้อในมนุษย์มักเกิดจากการสัมผัสน้ำทะเลหรือน้ำกร่อยที่ปนเปื้อนเชื้อผ่านบาดแผล [12-14] ปัจจุบันการจัดการการติดเชื้อ *P. damselae* ในสัตว์น้ำยังคงอาศัยการใช้สารเคมีสังเคราะห์และยาปฏิชีวนะเป็นหลัก อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีเหล่านี้อย่างกว้างขวางนำไปสู่ปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย และอาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคจากการตกค้างของสารเคมีในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ ดังนั้นจึงมีความสนใจในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติเพื่อใช้เป็นทางเลือกแทนสารเคมีสังเคราะห์ ซึ่งนอกจากจะช่วยลดความเสี่ยงจากการดื้อยาแล้วยังปลอดภัยต่อผู้บริโภคและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

ชะคราม (*Suaeda maritima* (L.) Dumort.) เป็นพืชในวงศ์ Chenopodiaceae ที่พบทั่วไปในพื้นที่ป่าชายเลนและบริเวณน้ำกร่อยของประเทศไทย พืชชนิดนี้มีลักษณะอวบน้ำ ทนทานต่อความเค็มสูง ใบอ่อนมีสีเขียว และเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมม่วงหรือแดงอมม่วงเมื่อแก่ ในช่วงฤดูแล้งใบมักเปลี่ยนเป็นสีแดงอมม่วงหรือสีส้ม ชะครามนอกจากจะถูกนำมาใช้เป็นอาหารเนื่องจากมีสารอาหารที่มีประโยชน์แล้วยังมีสรรพคุณทางยาที่ใช้ในการแพทย์พื้นบ้าน (traditional medicine) เช่น รากใช้เป็นยาบำรุงกระดูก แก้พิษฝีภายใน ดับพิษในกระดูก และรักษาโรคผิวหนัง ส่วนลำต้นและใบใช้รักษารากผมและแก้ผมร่วง [15] จากรายงานการศึกษาพบว่าสารสกัดจากชะครามมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมถึงเชื้อก่อโรคที่ดื้อยาในมนุษย์เช่น *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*และ*Pseudomonas* spp. [16,17] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดจากใบชะครามเมื่อผสมในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) สามารถช่วยเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ได้

ด้วยเหตุนี้งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *P. damselae* ของสารสกัดจากใบชะครามที่เก็บจากป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี โดยใช้วิธี disc diffusion เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ รวมทั้งหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum Bactericidal Concentration; MBC) จากนั้นทำการ

ทดสอบและแยกชนิดของสารที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิค bioautography และ Thin Layer Chromatography (TLC) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนาสารต้านเชื้อจากธรรมชาติที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะช่วยลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และส่งเสริมความยั่งยืนทางเศรษฐกิจให้กับเกษตรกรและอุตสาหกรรมการประมงในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1.การเก็บตัวอย่าง

เก็บรวบรวมใบชะครามจากบริเวณพื้นที่ศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี ต้นชะครามที่ใช้ในการศึกษาได้รับการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์สายพันธุ์ *Suaeda maritima* (L.) Dumort. โดย ดร.จิรัฐิ สัตถาพร อาจารย์ประจำสาขาพฤกศาสตร์ ภาควีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ กำหนดพื้นที่การเก็บตัวอย่างใบชะครามออกเป็น 2 จุด คือ บริเวณที่น้ำท่วมถึงและบริเวณที่น้ำท่วมไม่ถึง โดยทำการเก็บใบชะครามแยกชนิดใบสีเขียวและใบสีแดง

2.การเตรียมสถานที่วัสดุและอุปกรณ์

2.1 สถานที่ในการทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

2.2 เตรียมวัสดุและอุปกรณ์

วัสดุที่เป็นเครื่องแก้ว ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่วนวัสดุอุปกรณ์ที่เป็นพลาสติก รวมถึงอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำและแรงดันสูงโดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา15 นาที

3.การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบชะคราม

3.1 นำใบชะครามมาล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณภูมิห้อง จากนั้นนำใบชะครามไปอบด้วยเครื่องอบแห้งเป่าลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วบดใบชะครามแห้งให้ละเอียด ชั่งผงชะครามแห้ง 10 กรัม ละลายในสารละลายเอทานอล 200 มิลลิลิตร นำตัวอย่างมาทำการสั่นสะเทือนด้วยคลื่นความถี่สูง (homogenization) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Lianget al. [18] โดยใช้ความถี่ 20 กิโลเฮิรตซ์ เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองสารละลายผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1

3.2 นำสารที่ได้ไปทำการระเหยเพื่อแยกเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบของใบชะคราม ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม) เก็บรักษาสารสกัดหยาบที่ได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

4.1 เชื้อแบคทีเรีย *Photobacterium damselae* คัดแยกมาจากน้ำที่ใช้เลี้ยงในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มในสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล และทำการยืนยันสายพันธุ์โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ระบุว่าเป็นเชื้อสายพันธุ์ *Photobacterium damselae* (ค่า Identities 100 เปอร์เซ็นต์)

4.2 นำเชื้อบริสุทธิ์มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) ที่เติม NaCl 1 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

5.การทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบใบชะครามต่อการยับยั้งเชื้อ *Photobacterium damselae* ด้วยวิธี Disc diffusion

5.1 การทดสอบ Disc diffusion ทำการเพาะเชื้อ *P. damselae* บนอาหาร TSA ที่เติม NaCl 1 เปอร์เซ็นต์ (จากข้อ 4.2) นำโคโลนีของเชื้อประมาณ 4-5 โคโลนีมาทำการแขวนลอยในสารละลายเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (normal saline) ให้มีค่าความขุ่นเทียบเท่า McFarland standard เบอร์ 0.5 หรือมีปริมาณของเชื้ออยู่ในช่วง 1-2 x 10^8 cfu ต่อมิลลิลิตร

5.2 ใช้ไม้พันก้านสำลีปลอดเชื้อจุ่มเชื้อแล้วนำมาเกลี่ยให้เต็มพื้นที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (MHA) ที่เติม NaCl 1 เปอร์เซ็นต์ โดยเกลี่ยแบบ 3 ระนาบ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง วางแผ่น paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.3 เตรียมสารสกัดหยาบจากใบชะครามความเข้มข้น 2 กรัมต่อมิลลิลิตรด้วยการใช้สารละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลาย หยดสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนแผ่น paper disc จะได้ความเข้มข้นสารสกัด 20 มิลลิกรัมต่อแผ่นดิสก์ ใช้ยา Norfloxacin ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อแผ่นดิสก์เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (Positive Control) และ DMSO เป็นชุดควบคุมเชิงลบ (Negative Control) นำจานอาหารเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 -18 ชั่วโมง แล้วทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ถูกยับยั้ง (inhibition zone)

6.ทดสอบความไวของเชื้อ *Photobacterium damselae* ต่อยาต้านจุลชีพ

6.1 เตรียมเชื้อเพื่อทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี Disc diffusion (ใช้วิธีการเช่นเดียวกันกับข้อที่ 5) ใช้แผ่นดิสก์ยาต้านจุลชีพจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ ampicillin (AMP), amoxicillin (AMX), amikacin (AK), cefotaxime (CTX), ciprofloxacin (CIP), norfloxacin (NFX) tetracycline (TC) และ chloramphenicol (CP)

6.2 วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ถูกยับยั้ง (inhibition zone) และแปรผลความไวของเชื้อต่อยาชนิดต่างๆตามค่า breakpoint ของยาที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อกลุ่ม *Vibrio* spp. โดยใช้เกณฑ์ตามมาตรฐานของ CLSI M45 (The Clinical and Laboratory Standard Institute) [19] ในกรณีของยา Norfloxacin ใช้เกณฑ์ตามมาตรฐาน CLSI M100 [20] ซึ่งเป็นกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriacease (ตารางที่ 1) การแปลผล S (susceptibility) หมายถึง การที่เชื้อมีความไวต่อยาหรือถูกยับยั้งการเจริญเติบโตโดยยาปฏิชีวนะ I (Intermediate) หมายถึง เชื้อถูกยับยั้งด้วยยาในขนาดธรรมดาหรือใช้ยานั้นเฉพาะที่เท่านั้น และ R (Resistance) หมายถึง เชื้อดื้อต่อยาหรือมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

ตารางที่ 1 เกณฑ์การทดสอบความไวของเชื้อ *Photobacterium damselae* ต่อยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด [19, 20]

ยาต้านจุลชีพ	ความเข้มข้นยาต่อแผ่นดิสก์ (มิลลิกรัม)	เกณฑ์แปรผลการยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
		S	I	R
Ampicillin	0.01	≥ 17	14-16	≤ 13
Amoxicillin-clavulanate	0.01	≥ 18	14-17	≤13
Amikacin	0.03	≥ 17	15-16	≤14
Cefotaxime	0.03	≥ 26	23-25	≤22
Ciprofloxacin	0.005	≥ 21	16-20	≤15
Norfloxacin	0.01	≥ 17	13-16	≤12
Tetracycline	0.03	≥ 15	12-14	≤11
Chloramphenicol	0.03	≥ 18	13-17	12

*S= susceptibility, I= Intermediate และ R =Resistance

7.การแยกสารประกอบของสารสกัดหยาบจากใบชะครามและทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Photobacterium damselae* ด้วยวิธี Direct TLC-bioautography

7.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากใบชะครามที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟฟีแบบผิวบาง (Thin Layer Chromatography; TLC) โดยใช้แผ่น TLC Silica gel 60 F254 เป็นเฟสคงที่ นำตัวอย่างสารละลายของสารสกัดหยาบที่ได้หยดลงบนแผ่น TLC รอให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้ง จากนั้นนำไปทำการ development ใน TLC Tank ที่มีสารละลาย Chloroform ($CHCl_3$) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) แล้วนำแผ่น TLC ไปตรวจสอบแถบสีภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร สังเกตการณ์ดูดกลืนและการสะท้อนแสงของสารสกัด

7.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบในการยับยั้งเชื้อ *P. damselae* ด้วยวิธี Direct TLC-bioautography โดยนำแผ่น TLC แช่ลงในเชื้อที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 10^6 cfu ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่มีความชื้น สังเกตการเจริญของเชื้อโดยการพ่นสารละลาย tetrazolium salt ลงบนแผ่น TLC บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง บริเวณที่เชื้อเจริญเติบโตจะมองเห็นเป็นสีม่วง ส่วนบริเวณที่สารประกอบสามารถยับยั้งเชื้อจะมองเห็นเป็นสีขาวใสหรือสีเหลือง [22]

8.การแยกสารประกอบของสารสกัดจากใบชะครามให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิค Preparative Thin layer chromatography

เตรียมแผ่น TLC ใช้ในการแยกสารด้วยเทคนิค PTLC ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร ด้วยการผสมผงซิลิกาเจล G (25 กรัม) กับน้ำกลั่นปริมาตร 70 มิลลิลิตร และเทลงบนแผ่นกระจกโดยปรับระดับความหนาเท่ากับ 0.5 มิลลิเมตร นำแผ่นกระจกอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง นำสารสกัดหยาบใบชะคราม ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียมาละลายด้วยสารละลาย Chloroform ($CHCl_3$) หยดสารละลายของสารสกัดหยาบลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้ ทำการ development ใน TLC Tank ที่มีสารละลาย Chloroform ($CHCl_3$) เป็นเฟสเคลื่อนที่ ทำการตรวจสอบและกำหนดจุดของสารประกอบที่ปรากฏบนแถบสีแผ่น TLC ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร สังเกตการดูดกลืนและการสะท้อนแสงของสารสกัด ทำการขูดแยกสารประกอบในตำแหน่งต่างๆบนแผ่น TLC เก็บรวบรวมไว้ในสารละลาย Chloroform จากนั้นนำแต่ละ fraction

ไปกรองผ่านกระดาษกรอง ทำการระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศเก็บรักษาสารสกัดที่แยกได้แต่ละ fraction ในขวดสีชา ชั่งน้ำหนักสารประกอบและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส [22]

9.การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibitory concentration; MIC) ของสารสกัดจากใบชะครามในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Photobacterium damselae* ด้วยวิธี broth dilution assay (microdilution)

9.1 เจือจางสารละลายเข้มข้น (Stock solution) ของสารสกัดแบบต่อเนื่องทีละ 2 เท่า (2-fold serial dilution) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton broth (MHB)) ที่เติม NaCl 1 เปอร์เซ็นต์ทั้งหมด 10 ระดับความเข้มข้น ในถาดไมโครเพลตชนิด 96 หลุม (microtiter plate 96-well) โดยสารทดสอบมี 4 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 สารสกัดหยาบทำการทดสอบความเข้มข้นในช่วง 0.0970 - 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชุดที่ 2 สารสกัดที่ได้จากการแยกส่วนให้บริสุทธิ์ (จากข้อ8) ทดสอบความเข้มข้นในช่วง 0.0097 - 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชุดที่ 3 ยา Norfloxacin ทดสอบความเข้มข้นในช่วง 0.000001 –0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมเชิงบวก

ชุดที่ 4 สารละลาย DMSO ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ (ไม่มียาหรือสารสกัด) เป็นชุดควบคุมเชิงลบ 9 และทดสอบสภาวะที่ไร้เชื้อของอาหารด้วยการใส่เพียงอาหารเหลวลงในหลุมเท่านั้น

ผสมสารแต่ละความเข้มข้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่เติม NaCl 1 เปอร์เซ็นต์ให้มีปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตรต่อหลุม

9.2 เตรียมเชื้อ *P. damselae* ให้มีปริมาณของเชื้อประมาณ 10^6 cfuต่อมิลลิลิตร แล้วปิเปตเชื้อลงในหลุมปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม จะได้ความเข้มข้นของสุดท้ายเชื้อประมาณ 10^5 cfuต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำถาดไมโครเพลตบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) แปลผลค่า MIC โดยสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *P. damselae* (อาหารเลี้ยงเชื้อใส)

10.การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย) minimum bactericidal concentration; MBC)

ปิเปตตัวอย่างหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ (จากข้อ 9.2) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร Mueller Hinton agar ที่ผสม NaCl 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วิธี drop plate บ่มที่อุณภูมิ 25 เซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) แปลผลค่า MBC โดยสังเกตการเจริญของแบคทีเรียทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถทำลายเชื้อได้ (ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง)

11.การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย การทดสอบความไวของเชื้อ ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ บันทึกผลโดยใช้ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ส่วนการทดสอบค่า MIC และ MBC ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ แล้วแปลผลการทดสอบ 2 ใน 3 ของการทดลอง

ผลการวิจัย

1.ผลการสกัดสารสกัดหยาบจากใบชะคราม

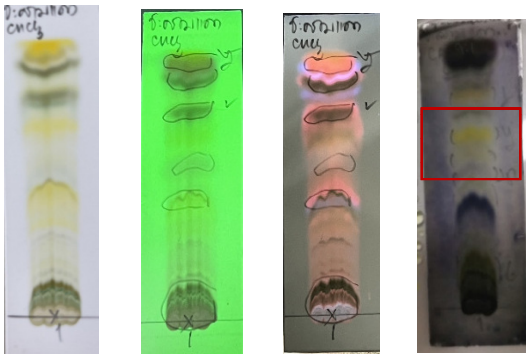
จากการทดลองโดยนำใบชะครามแห้งสีเขียวและสีแดงทั้ง 2 พื้นที่ คือ ใบชะครามสีแดงจุดที่น้ำท่วมถึง ใบชะครามสีเขียวจุดที่น้ำท่วมถึง ใบชะครามสีแดงจุดที่น้ำท่วมไม่ถึง และใบชะครามสีเขียวจุดที่น้ำท่วมไม่ถึง มาสกัดสารสกัดหยาบ จะได้ปริมาณสารสกัดหยาบของใบชะคราม 2.95, 1.27, 1.69 และ 1.61 กรัม ตามลำดับ

2.การเปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดจากใบชะครามสีเขียวและสีแดงต่อการยับยั้งเชื้อ *Photobacterium damselae*

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. damselae* ของสารสกัดหยาบจากใบชะครามสีเขียวและสีแดงความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อแผ่นดิสก์ โดยเปรียบเทียบจาก 2 พื้นที่ คือ บริเวณชะครามที่น้ำท่วมถึงและบริเวณที่น้ำท่วมไม่ถึง พบว่าสารสกัดหยาบจากใบชะครามทั้งสีเขียวและสีแดงบริเวณน้ำท่วมถึงเท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ ซึ่งสารสกัดหยาบจากใบชะครามสีแดงมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. damselae* ดีกว่าสารสกัดจากใบชะครามสีเขียว ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) เท่ากับ 12±0.0 และ 0.7±0.0 มิลลิเมตรตามลำดับ ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกสารสกัดจากใบชะครามสีแดงบริเวณที่น้ำท่วมถึงในการศึกษาชนิดของสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.การทดสอบการยับยั้งเชื้อของสารสกัดหยาบจากใบชะครามสีแดงด้วยวิธี Direct TLC-bioautography

จากผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบชะครามสีแดงต่อเชื้อ *P. damselae* ด้วยเทคนิค Direct TLC-bioautography พบว่าการใช้ $CHCl_3$ เป็นเฟสเคลื่อนที่สามารถแยกสารได้หลายกลุ่ม ทั้งที่มีขั้วต่ำ ขั้วปานกลาง และขั้วสูง (ภาพที่ 1ก, 1ข และ 1ค) หลังจากทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ พบกลุ่มของสารประกอบที่มีขั้วปานกลางที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (ภาพที่ 1ง) จากนั้นจึงทำการแยกสารประกอบของสารสกัดจากใบชะครามสีแดงให้บริสุทธิ์บางส่วน เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อในการทดลองต่อไป



(ก) (ข) (ค) (ง)

ภาพที่ 1 รูปแบบการแยกสารสกัดด้วย TLC (ก) และส่องด้วย UV 254 นาโนเมตร (ข) 356นาโนเมตร (ค) และผลการยับยั้งเชื้อที่สเปรย์ด้วย tetrazolium salt (ง)

4.การแยกสารประกอบของสารสกัดจากใบชะครามสีแดงให้บริสุทธิ์บางส่วน

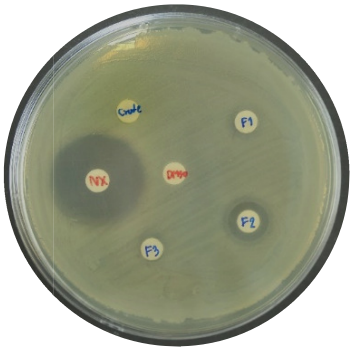
จากการนำสารสกัดใบชะครามสีแดงบริเวณน้ำท่วมถึงซึ่งแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. damselae* มาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิค Preparative Thin layer chromatography ได้สารประกอบ 3 fraction ได้แก่ fr.1, fr.2 และ fr.3 (ภาพที่ 2ก) และตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้แสง UV 254 และ 365 นาโนเมตร โดยน้ำหนักของสารประกอบ fr.1, fr.2 และ fr.3 คือ 49.8, 17.8 และ 21.4 มิลลิกรัมตามลำดับ พบว่าสารใน fr.2 จะมีองค์ประกอบของสาร 2 ชนิด (ภาพที่ 2ข) เป็นสารที่ดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร (ภาพที่ 2ค) และสะท้อนแสงที่ 365 นาโนเมตร (ภาพที่ 2ง)

(ก) (ข) (ค) (ง)

ภาพที่ 2 รูปแบบการแยกสารสกัดชะครามใบสีแดงด้วย PTLC (ก) ส่องผลของ fr.1, fr.2 และ fr.3 ด้วยตาเปล่า (ข) ส่องภายใต้แสง UV 254 นาโนเมตร (ค) และ 365 นาโนเมตร (ง)

5.การศึกษาฤทธิ์ของสารประกอบที่แยกจากสารสกัดจากใบชะครามสีแดงที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนต่อการยับยั้งเชื้อ *Photobacterium damselae*

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. damselae* ของสารสกัดที่แยกให้บริสุทธิ์ 3 กลุ่ม ได้แก่ fr.1, fr.2, fr.3 และcrude (สารสกัดหยาบ) ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1 มิลลิกรัมต่อแผ่นดิสก์ ด้วยเทคนิค disc diffusion พบว่ามีเพียงเฉพาะสารสกัดในกลุ่ม fr.2 เท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ (ภาพที่ 3) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเท่ากับ 11±0.0 มิลลิเมตร ในขณะที่ยา Norfloxacin ความเข้มข้น 0.001มิลลิกรัมต่อแผ่นดิสก์ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ถูกยับยั้งเท่ากับ 25±0.0 มิลลิเมตร



ภาพที่ 3 ฤทธิ์ของสารประกอบที่แยกจากสารสกัดจากใบชะครามสีแดงในการยับยั้งเชื้อ *Photobacterium damselae*

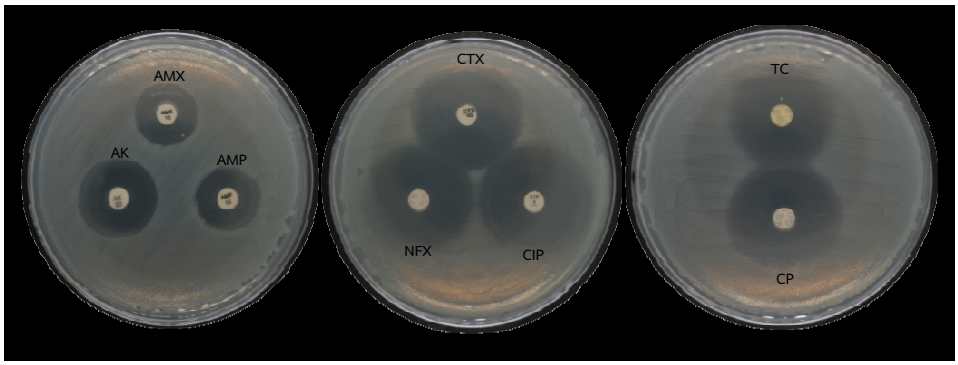
6.การทดสอบความไวของเชื้อ *Photobacterium damselae* ต่อยาต้านจุลชีพ

การทดสอบความไวของเชื้อ *P. damselae* ต่อยาต้านจุลชีพ 8 ชนิด โดยใช้วิธี disc diffusion (ภาพที่ 4) และแปรผลตามเกณฑ์มาตรฐานของ CLSI พบว่าเชื้อ *P. damselae* มีความไวต่อยาทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ (ตารางที่ 2) ได้แก่ ampicillin (AMP), amikacin (AK), amoxicillin (AMX), cefotaxime (CTX), ciprofloxacin (CIP), norfloxacin (NFX) tetracycline (TC) และ chloramphenicol (CP)

ตารางที่ 2 ความไวของเชื้อ *Photobacterium damselae* ต่อยาต้านจุลชีพ

ชนิดของยาต้านจุลชีพ	Antimicrobial Class	ความเข้มข้นของยาต่อแผ่นดิสก์ (มิลลิกรัม)	ขนาด inhibition zone (มิลลิเมตร)	การแปลผล
Ampicillin (AMP)	Penicillins	0.01	18.83 ± 0.3	S
Amoxicillin (AMX)	Penicillins	0.01	20.00 ± 0.0	S
Amikacin (AK)	Aminoglycosides	0.03	24.00 ± 0.0	S
Cefotaxime (CTX)	Cephems	0.03	34.00 ± 0.0	S
Ciprofloxacin (CIP)	Fluoroquinolones	0.005	35.00 ± 0.0	S
Norfloxacin (NFX)	Fluoroquinolones	0.01	33.00 ± 0.0	S
Tetracycline (TC)	Tetracyclines	0.03	31.67 ± 0.0	S
Chloramphenicol (CP)	Phenicols	0.03	35.00 ± 0.0	S

*S= susceptibility, I= Intermediate และ R =Resistance



ภาพที่ 4 บริเวณถูกยับยั้ง (inhibition zone) ของเชื้อ *Photobacterium damselae* ต่อยาต้านจุลชีพ

7.การทดสอบค่า MIC (minimum inhibitory concentration) และ MBC (minimum bactericidal concentration)

เมื่อทดสอบเชื้อ *P. damselae* กับสารสกัดหยาบในช่วงความเข้มข้น 0.097– 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดหยาบมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 12.500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดบริสุทธิ์บางส่วน (fr.2) ในช่วงความเข้มข้น 0.009– 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 1.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์บางส่วนมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *P. damselae* ในส่วนของชุดควบคุมเชิงบวก Norfloxacin ในช่วงความเข้มข้น 0.000001 –0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.000039 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงถึงประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพมาตรฐาน สำหรับชุดควบคุมเชิงลบที่ใช้สารละลาย DMSO ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อแสดงว่าสภาวะการทดลองไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การนำพืชสมุนไพร เช่น ขิง (*Zingiber officinale*) กระเทียม (*Allium sativum*) โสม (*Withania somnifera*) และชะคราม (*Suaeda maritima* (L.) Dumort.) มาใช้ผสมกับอาหารสัตว์น้ำพบว่าสามารถลดอัตราการตายจากการติดเชื้อแบคทีเรียได้ [23-25] โดยเฉพาะสารสกัดจากใบชะครามซึ่งมีรายงานว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, และ *Enterococcus faecalis* รวมถึงแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas maltophila*, และ *Vibrio parahaemolyticus* [18, 26]

ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Photobacterium damselae* โดยใช้เทคนิค Disc diffusion โดยเปรียบเทียบสารสกัดจากใบชะครามสีเขียวและสีแดงซึ่งเป็นพืชในกลุ่ม halophytes (พืชที่เจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูง) จากสองบริเวณ ได้แก่ บริเวณที่น้ำท่วมถึงและบริเวณที่น้ำท่วมไม่ถึง ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากใบชะครามที่เก็บจากบริเวณที่น้ำท่วมถึงเท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. damselae* ได้ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Alhdad et al. [27] ที่รายงานว่าต้นชะครามในบริเวณที่

น้ำขังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าบริเวณที่แห้งแล้ง เนื่องจากพืชกลุ่ม halophytes มีความสามารถในการผลิตสารประกอบทุติยภูมิ (secondary metabolites) โดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิกซึ่งช่วยให้พืชสามารถปรับตัวและเจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมที่รุนแรง สารประกอบเหล่านี้ยังมีศักยภาพทางเภสัชกรรมสูง เนื่องจากมีความหลากหลายทางโครงสร้างและมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่โดดเด่น นอกจากนี้ผลการศึกษายังพบว่าสารสกัดจากใบชะครามสีแดงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. damselae* ได้ดีกว่าสารสกัดจากใบชะครามสีเขียว เมื่อนำสารสกัดหยาบจากใบชะครามสีแดงมาทำการแยกให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิค Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) ได้สารออกมา 3 กลุ่ม ได้แก่ fr.1, fr.2 และ fr.3 พบว่า fr.2 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 11 มิลลิเมตร ในขณะที่ fr.1, fr.3 และสารสกัดหยาบไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Beulah et al. [28] ได้ทำการสกัดใบชะครามด้วยเอทานอลและแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography และ preparative Thin Layer Chromatography พบว่าสารบริสุทธิ์ที่ได้เป็นสาร saponin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบ โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.1±1.4 มิลลิเมตร และ 4.1±1.2 มิลลิเมตรตามลำดับ

จากการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum Bactericidal Concentration; MBC) พบว่า fr.2 มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 1.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดหยาบมีค่า MIC และMBC สูงถึง 12.500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าการทำให้สารสกัดบริสุทธิ์ขึ้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพ ในการยับยั้งเชื้อได้ถึง 10 เท่า อย่างไรก็ตาม fr.2 ที่แยกได้ยังมีองค์ประกอบของสาร 2 ชนิดที่ไม่บริสุทธิ์เพียงพอ ซึ่งหากสามารถแยกสารประกอบเหล่านี้ให้บริสุทธิ์ได้มากขึ้น อาจส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อเพิ่มสูงขึ้นอีก นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบความไวของเชื้อ *P. damselae* ต่อยาต้านจุลชีพ 6 กลุ่มได้แก่ Penicillins (ampicillin และ amoxicillin), aminoglycosides (amikacin), Cephems (cefotaxime), Fluoroquinolones (ciprofloxacin และ norfloxacin), tetracyclines (tetracycline) และ phenicols (chloramphenicol) ซึ่งผลการทดสอบนี้สามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อ *P. damselae*

ผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากใบชะครามสีแดงมีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. damselae* ได้ดีกว่าสารสกัดจากใบชะครามสีเขียว และการทำให้สารสกัดบริสุทธิ์ขึ้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ ดังนั้นการพัฒนาสารสกัดจากใบชะครามซึ่งเป็นวัชพืชท้องถิ่นของประเทศไทยให้เป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียทางเลือก อาจช่วยลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ลดต้นทุนการผลิตและลดปัญหาการตกค้างของสารเคมีในผลผลิตสัตว์น้ำ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรและอุตสาหกรรมการประมงในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณฝ่ายวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์สารเคมีและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์เพื่อใช้ในการวิจัยในครั้งนี้

References

[1] Rivas, A. J., et al. (2013). *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*, a Bacterium Pathogenic for Marine Animals and Humans. *Frontiers in Microbiology*, 4, 283.

[2] Gonzalez, R. E., et al. (2018). Use of Seaweed *Ulva lactuca* for Water Bioremediation and as Feed Additive for White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *PeerJ*, 6, e4459.

[3] Ketterer, P., & Eaves, L. (1992). Deaths in Captive Eels (*Anguilla reinhardtii*) Due to *Photobacterium* (*Vibrio*) *damsela*. *Australian Veterinary Journal*, 69(8), 203–204.

[4] Terceti, M. S., et al. (2016). *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*, an Emerging Fish Pathogen in the Black Sea: Evidence of a Multiclonal Origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3736–3745.

[5] Xie, J., et al. (2021). First Report of *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* Infection in the Mud Crab *Scylla paramamosain* Cultured in China. *Aquaculture*, 530, 735880.

[6] Romalde, J. L. (2002). *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*: An Integrated View of a Bacterial Fish Pathogen. *International Microbiology*, 5, 3–9.

[7] Love, M., et al. (1981).*Vibrio damsela*, A Marine Bacterium, Causes Skin Ulcers on the Damselfish Chromis Punctipinnis. *Science,* 214(4525), 1139-1140.

[8] Sharma, S., et al. (2016). First Report of Isolation and Characterization of *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* from Cage-Farmed Cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Fish Diseases*, 40(4), 541–546.

[9] Shao, P., et al. (2019). First Isolation of *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* from Half-Smooth Tongue Sole Suffering from Skin-Ulceration Disease. *Aquaculture*, 511, 734208.

[10] Kanchanopas-Barnette, P., et al. (2009). The First Isolation of *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* from Asian Seabass *Lates calcarifer*. *Fish Pathology*, 44(1), 47–50.

[11] Alhemairi, M., et al. (2015). Child Death Due to Infection with *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*, a New Case. *Journal of Medical Sciences*, 23(3), 176–178.

[12] Aigbivbalu, L., & Maraqa, N. (2009). *Photobacterium damselae* Wound Infection in a 14-Year-Old Surfer. *Southern Medical Journal*, 102(4), 425–426.

[13] Akram, A., et al. (2015). *Photobacterium damselae* and *Vibrio harveyi* Hand Infection from Marine Exposure. *Medical Journal of Australia*, 203(5), 224–225.

[14] Osorio, C. R., et al. (2018). *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*, a Generalist Pathogen with Unique Virulence Factors and High Genetic Diversity. *Journal of Bacteriology*, 200(15), e00002-18.

[15] Samunpridotcom.(2024). *Seablite*. Available from https://www.samunpri.com/ชะคราม . Accessed date: 15 May .2024 (in Thai)

[16] Bilal, M. A. D., & Hossain, M. A. (2019). Antibacterial Activity of Different Crude Extracts of *Suaeda maritima* Used Traditionally for the Treatment of Hepatitis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101383.

[17] Nayak, B., et al. (2018). Phytochemical, Antioxidant and Antimicrobial Screening of *Suaeda maritima* L. (Dumort) Against Human Pathogens and Multiple Drug Resistant Bacteria. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(1), 26–35.

[18] Liang, Q., et al. (2017). Optimized Microwave-Assistant Extraction Combined Ultrasonic Pretreatment of Flavonoids from *Periploca forrestii* Schltr. and Evaluation of Its Anti-Allergic Activity. *Electrophoresis*, 38(8), 1113–1121.

[19] CLSI. (2015). *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

[20] CLSI. (2023). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 33rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

[21] Das, K., et al. (2010). Techniques for Evaluation of Medicinal Plant Products as Antimicrobial Agent: Current Methods and Future Trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2), 104–111.

[22] Panigrahi, G., et al. (2014). Preparative Thin-Layer Chromatographic Separation Followed by Identification of Antifungal Compound in *Cassia laevigata* by RP-HPLC and GC-MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(2), 308–315.

[23] Harikrishnan, R., et al. (2012). Immunomodulatory Effect of *Withania somnifera* Supplementation Diet in the Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) Against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(1), 94–100.

[24] Shahraki, N., et al. (2021). Dietary Administration of Aqueous *Zingiber officinale* Extract on Growth Performance, Antioxidant Activity and Resistance of Shrimp *Litopenaeus vannamei* Against *Photobacterium damselae*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 20(1), 32–44.

[25] Talpur, A. D., & Ikhwanuddin, M. (2012). Dietary Effects of Garlic (*Allium sativum*) on Haemato-Immunological Parameters, Survival, Growth, and Disease Resistance Against *Vibrio harveyi* Infection in Asian Sea Bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture*, 364, 6–12.

[26] Pawana, A., et al. (2017). Effect of Using *Suaeda maritima* Leave Extract as a Feed Additive on the Resistance to *Vibrio parahaemolyticus* and the Growth of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) During Nursing. *King Mongkut's Agricultural Journal*, *35*(3), 36–41. (in Thai)

[27] Alhdad, G. M., et al. (2013). The Effect of Combined Salinity and Waterlogging on the Halophyte *Suaeda maritima*: The Role of Antioxidants. *Environmental and Experimental Botany*, 87, 120–125.

[28] Beulah, G., et al. (2021). Purification and Characterization of Bioactive Compounds Extracted from *Suaeda maritima* Leaf and Its Impact on Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in *Catla catla* Fingerlings. *Applied Microbiology and Biotechnology Express*,

11(1), 135.