

การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดใบบัวบกและความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp.

Synthesis of Silver Nanoparticles from *Centella asiatica* Leaves Extract and Their Antibacterial Activity Against *Vibrio* spp.

วรารัตน์ ไกรนรา¹ สุณิษา คงทอง¹ และ อุมภาพร ขิมมากทอง^{2*}

Waralee Krainara¹, Sunisa Khongthong¹ and Umaporn Khimmakthong^{2*}

¹สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ประเทศไทย

²สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ประเทศไทย

¹Department of Veterinary Biomedical Sciences, Faculty Veterinary Medicine, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Thailand

²Department of Veterinary Pathobiology, Faculty Veterinary Medicine, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Thailand

*E-mail: tal_biot@hotmail.com Tel. (+66)805458353

(Received 09/09/2024, Revised 25/05/2025, Accepted 07/06/2025)

บทคัดย่อ

การระบาดของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่ก่อให้เกิดโรคน้ำกัดเท้า ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งอย่างต่อเนื่อง การพัฒนาแนวทางใหม่ในการควบคุมเชื้อจึงมีความสำคัญ โดยเฉพาะการประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนซิลเวอร์ซึ่งเป็นที่ยอมรับในด้านการต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพสูง การศึกษานี้ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์จากสารสกัดใบบัวบก โดยเตรียมสารสกัดด้วยน้ำ และผสมกับสารละลาย AgNO_3 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องและศึกษาการเปลี่ยนแปลงด้วย UV-Visible spectroscopy การวิเคราะห์ลักษณะอนุภาคด้วย Transmission Electron Microscopy (TEM) และประเมินความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Broth microdilution เพื่อตรวจสอบค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC) ต่อเชื้อ *Vibrio* spp. 4 สายพันธุ์ จากการศึกษพบว่าปฏิกิริยาของการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนเริ่มต้นหลังจากเติมสารสกัดใบบัวบกลงไป และสูงสุดเมื่อผ่านการบ่มเป็นเวลา 240 นาที โดยสารที่สังเคราะห์ขึ้นมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 431 ถึง 433 นาโนเมตร ลักษณะอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้เป็นทรงกลม ขนาด 4–100 นาโนเมตร และผลการศึกษาประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* spp. 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus* และ *V. fluvialis* โดยวิธี Broth microdilution พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยค่า MIC เท่ากับ 15.63 ± 0.00 , 31.25 ± 0.00 , 15.63 ± 0.00 และ 15.63 ± 0.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus* และ *V. fluvialis* ตามลำดับ ขณะที่ค่า MBC ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการฆ่าเชื้อ มีค่าเท่ากับ 31.25 ± 0.00 , 62.50 ± 0.00 , 31.25 ± 0.00 และ 15.63 ± 0.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีประสิทธิภาพสูงสุดในการฆ่าเชื้อ *V. fluvialis* และมีประสิทธิภาพน้อยที่สุดต่อ *V. vulnificus* ผลลัพธ์ที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อ *Vibrio* spp. ในกุ้ง มีบทบาทสำคัญในการลดการใช้จ่ายชีวเวช เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และส่งเสริมให้อุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งมีความยั่งยืนในระยะยาว

คำสำคัญ: อนุภาคซิลเวอร์นาโน บัวบก ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย วิบริโอ การเลี้ยงกุ้ง

Abstract

The outbreak of *Vibrio* spp. bacteria that cause diseases in shrimp has continuously impacted the shrimp farming industry. Therefore, developing new strategies for pathogen control is crucial, especially the application of silver nanoparticles, which are well-known for their potent antimicrobial activity. In this study, silver nanoparticles were synthesized using a water extract of *Centella asiatica* leaves, which was mixed with 10 μ M of AgNO_3 solution. The mixture was then incubated at room temperature, and changes were monitored using UV-Visible spectroscopy. The particle characteristics were analyzed using Transmission Electron Microscopy (TEM), and the antibacterial activity was evaluated using the Broth microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of the silver nanoparticles against four strains of *Vibrio* spp. The study found that the silver nanoparticle synthesis reaction began after the addition of the *C. asiatica* extract and reached its peak after 240 minutes of incubation. The synthesized silver nanoparticles were spherical in shape, with sizes ranging from 4 to 100 nanometers. The study on the effectiveness of the silver nanoparticles against four strains of *Vibrio* spp., including *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, and *V. fluvialis*, using the Broth microdilution method. The silver nanoparticles were found to effectively inhibit the growth of bacterial pathogens. The MIC values were 15.63 ± 0.00 , 31.25 ± 0.00 , 15.63 ± 0.00 , and 15.63 ± 0.00 ng/ml for *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, and *V. fluvialis*, respectively. The MBC values, indicating bactericidal activity, were 31.25 ± 0.00 , 62.50 ± 0.00 , 31.25 ± 0.00 , and 15.63 ± 0.00 ng/ml, respectively. These results demonstrate that the nanoparticles exhibited the highest bactericidal efficiency against *V. fluvialis* and the lowest against *V. vulnificus*. The findings from this study can be applied to the control and prevention of *Vibrio* spp. infections in shrimp, playing a key role in reducing antibiotic usage, promoting environmental sustainability, and enhancing the long-term sustainability of the shrimp farming industry.

Keywords: Silver nanoparticle, *Centella asiatica*, Antibacterial activity, *Vibrio*, Shrimp farming

1. บทนำ

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนจากพืชสมุนไพรเป็นหัวข้อที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในวงการวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยสามารถลดการใช้สารเคมีอันตรายในการสังเคราะห์ รวมถึงยังมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น ด้านการแพทย์ เทคโนโลยีชีวภาพ และอุตสาหกรรม เป็นต้น (Singh et al., 2016) การนำพืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนยังเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจ เนื่องจากพืชสมุนไพรมีสารออกฤทธิ์ตามธรรมชาติที่สามารถใช้ในการควบคุมและลดอนุภาคของโลหะ ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนที่มีคุณสมบัติพิเศษ (Kuppusamy et al., 2016) หนึ่งในพืชสมุนไพรที่ได้รับความนิยมในการวิจัยคือ บัวบก (*C. asiatica*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้มาอย่างยาวนานในทางการแพทย์แผนโบราณ เนื่องจากมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และช่วยฟื้นฟูเนื้อเยื่อ (James & Dubery, 2009) สารออกฤทธิ์สำคัญในบัวบกที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs) ได้แก่ asiaticoside, madecassoside, quercetin และ kaempferol ซึ่งเป็นกลุ่มของฟลาโวนอยด์และไตรเทอร์พีนอยด์ที่มีคุณสมบัติเป็น reductant และ stabilizer โดยสามารถรีดิวซ์ไอออนของเงิน (Ag^+) ไปเป็นอนุภาคโลหะเงิน (Ag^0) และในขณะเดียวกันก็ช่วยคงสภาพอนุภาคให้อยู่ในขนาดเล็กและมีความเสถียรสูง กลไกพื้นฐานของการสังเคราะห์ AgNPs ด้วยสารชีวภาพ เริ่มจากการที่สารออกฤทธิ์ในพืชทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) เปลี่ยน Ag^+ เป็น Ag^0 ซึ่งเมื่อมีการรวมตัวของ Ag^0 ก็จะเกิด nucleation และการเจริญเติบโตของอนุภาคโลหะในขณะเดียวกันสารประกอบเหล่านี้ยังทำหน้าที่เป็นสารเคลือบผิว (capping agent) ที่ช่วยป้องกันการรวมตัวของอนุภาคเข้าด้วยกัน ส่งผลให้สามารถควบคุมขนาด และเพิ่มความเสถียรของอนุภาคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Singhal et al., 2011)

Vibrio spp. เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคสำคัญในกุ้ง ซึ่งสามารถทำลายระบบการเจริญเติบโตของกุ้งและส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมกุ้งทั่วโลก ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมาก ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการมากมายเพื่อควบคุมเชื้อ *Vibrio* spp. ในกุ้ง เช่น การใช้สมุนไพร สารสกัดจากพืชสมุนไพร รวมถึงโพรไบโอติก แต่ยังมีข้อจำกัดในด้านประสิทธิภาพและต้องใช้เวลาปริมาณสูงจึงจะเห็นผล (Defoirdt et al., 2011) ดังนั้นการค้นคว้าหาสารที่มีประสิทธิภาพสูงและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการวิจัยสัตว์น้ำ อนุภาคซิลเวอร์นาโนเป็นที่รู้จักกันดีว่าเป็นวัสดุที่มีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่โดดเด่น เช่น มีพื้นที่ผิวขนาดใหญ่ ส่งผลให้มีความสามารถในการทำปฏิกิริยาสูง โดยเฉพาะในการยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ ซึ่งมีการนำไปใช้ในการต้านแบคทีเรียในหลายสาขา เช่น การผลิตวัสดุทางการแพทย์ เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์สำหรับการเกษตร (Prabhu & Poulose, 2012) ความสามารถของอนุภาคซิลเวอร์นาโนในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียส่งผลให้เกิดความสนใจในการนำมาใช้ในการควบคุมโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียในสัตว์น้ำโดยเฉพาะกุ้ง

งานวิจัยนี้มีความใหม่และแตกต่างจากงานวิจัยก่อนหน้านี้โดยมุ่งเน้นการใช้สารสกัดจากใบบัวบก ซึ่งแม้จะมีรายงานการใช้ในด้านสมุนไพรและการสังเคราะห์ AgNPs อยู่บ้าง แต่ยังมีข้อมูลจำกัดเกี่ยวกับการนำมาใช้ในการสังเคราะห์ AgNPs เพื่อดำเนินเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำโดยเฉพาะกุ้ง งานวิจัยนี้ออกแบบการทดลองให้ครอบคลุมการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ถึง 4 สายพันธุ์ที่สำคัญ ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus* และ *V. fluvialis* ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานที่ศึกษาครอบคลุมสายพันธุ์เหล่านี้ร่วมกัน อีกทั้งยังเน้นกระบวนการสังเคราะห์แบบเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมโดยไม่ใช้สารเคมีเพิ่มเติมในการควบคุมขนาดหรือความเสถียรของอนุภาค แต่ใช้เฉพาะสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในบัวบก ซึ่งสะท้อนแนวทางการพัฒนา AgNPs ตามหลักการ Green synthesis อย่างแท้จริง

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมสารสกัดใบบัวบก

เก็บตัวอย่างบัวบกในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช จากนั้นนำบัวบกมาแยกเอาเฉพาะส่วนใบ ล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำใบบัวบกแห้งมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดอาหารแห้ง นำผงใบบัวบกที่บดแห้งและบดแล้วมาสกัดด้วยน้ำ โดยชั่งผงใบบัวบก 20 กรัม ต้มในน้ำที่ปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองสารละลายใบบัวบกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และระเหยน้ำออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ภายใต้อัตราความดันที่ประมาณ 100 มิลลิบาร์ และอุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส เก็บรักษาสารสกัดใบบัวบกที่ได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

2.2 การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน

ทำการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยละลายสารสกัดใบบัวบกด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายสารสกัดใบบัวบก 10 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย AgNO_3 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ (ทำ 3 ซ้ำ) จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดใบบัวบกในสารละลาย AgNO_3 เป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วางขวดรูปชมพู่บนเครื่องกวนสารที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยตั้งอัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาที และปรับค่า pH ของสารละลายให้มีค่าเท่ากับ 8 ด้วยสารละลาย NaOH 0.1 โมลาร์ ก่อนการสังเคราะห์เพื่อเร่งปฏิกิริยารีดักชัน จากนั้นเก็บตัวอย่างสารละลายไปศึกษา ณ เวลา 5, 15, 30, 60, 120, 180 และ 240 นาที ตามลำดับ สังเกตสีของสารละลายที่เปลี่ยนแปลงซึ่งแสดงถึงการเกิดของอนุภาคซิลเวอร์นาโน ซิลเวอร์ไอออนจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นอนุภาคซิลเวอร์นาโน

2.3 ศึกษาลักษณะของอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยวิธี Ultraviolet-Visible Spectroscopy และ Transmission Electron Microscopy

การตรวจสอบเพื่อยืนยันการเกิดขึ้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Ultraviolet-Visible Spectrophotometer (Shimadzu, UV-2600) ที่ความยาวคลื่น 350-700 นาโนเมตร โดยทำการวัดในลักษณะทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicates) และศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน หรือ TEM (JEOL, JEM-2100) เพื่อตรวจสอบขนาดและ

รูปร่างของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่เกิดขึ้น ทำโดยการหยดสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน 3 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นตะกั่ว ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วตรวจสอบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วย TEM

2.4 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อ *Vibrio* spp. จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus* และ *V. fluvialis* เลี้ยงบนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) ที่มี 1.5% (w/v) NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว เพื่อเลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ที่มี 1.5% (w/v) NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องบ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเข้มข้นด้วย TBS ที่มี 1.5% (w/v) NaCl ให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland เพื่อให้ได้เชื้อที่มีความเข้มข้น 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ก่อนนำไปทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

2.5 ทดสอบประสิทธิภาพของซิลเวอร์นาโนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

หาความเข้มข้นต่ำสุดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยเตรียมแบคทีเรียทดสอบดังข้อ 2.4 หลังจากปรับความเข้มข้นแล้ว ใส่เชื้อ *Vibrio* spp. จากหลอดเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปในเพลท จากนั้นจึงนำไปทดสอบกับสารซิลเวอร์นาโนที่เจือจางโดยวิธี 2-fold serial dilution ใน 96-microtiter plate จนได้ความเข้มข้นเท่ากับ 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 และ 3.91 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำเพลทที่ใส่เชื้อเรียบร้อยแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเพลทมาอ่านค่า MIC โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นสีชมพู แสดงว่าเชื้อสามารถเจริญได้ แต่ถ้ายังคงเป็นสีน้ำเงินแสดงว่ามีการยับยั้งเชื้อได้ ซึ่งเกิดจากการทำงานของสารละลาย Resazurin ที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ หาค่า MBC โดยนำหลอดทดลองที่ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบไปเพาะเชื้อโดยเทคนิค Streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่มี 1.5% (w/v) NaCl จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงและบันทึกผลการทดลอง โดยที่ความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้จะไม่พบการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่มี 1.5% (w/v) NaCl ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของซิลเวอร์นาโนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่าค่าที่ได้จากแต่ละการทดลองมีค่าเท่ากันทุกซ้ำ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) ทำให้การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความเข้มข้น MIC และ MBC ระหว่างแบคทีเรียแต่ละชนิด ไม่สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแบบพารามेटริก เช่น ANOVA หรือ T-test ได้อย่างถูกต้อง เนื่องจากไม่มีความแปรปรวนภายในกลุ่ม จึงได้ดำเนินการเปรียบเทียบเชิงพรรณนาแทน โดยอ้างอิงค่า MIC และ MBC ที่ได้จากแต่ละกลุ่มของแบคทีเรีย

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 ผลการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน

ผลการทดลองพบว่า ปฏิกิริยาของการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนเริ่มต้นหลังจากเติมสารสกัดใบบัวบกลงไป ผลการทดลองพบว่าเมื่อนำสารสกัดใบบัวบกผสมกับสารละลาย AgNO_3 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบการสังเคราะห์ที่เวลาต่าง ๆ พบว่า สีของสารละลายเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งมีสีเข้มที่สุดที่ระยะเวลาการบ่ม 240 นาที ดังแสดงใน Figure 1 แสดงให้เห็นถึงการเกิดขึ้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโน และเมื่อคำนวณจากความเข้มข้นของสารละลาย AgNO_3 เริ่มต้นที่ใช้ ที่ประสิทธิภาพการรีดิวซ์ 100% ความเข้มข้นของ AgNPs จะเท่ากับ 971 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

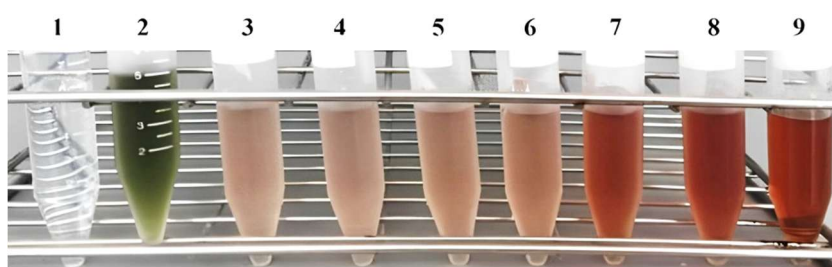


Figure 1 Color change characteristics of reduced solutions to form silver nanoparticles at different times. 1: silver nitrate solution, 2: *C. asiatica* extract, 3–9: silver nanoparticles at 5, 15, 30, 60, 120, 180, and 240 min, respectively.

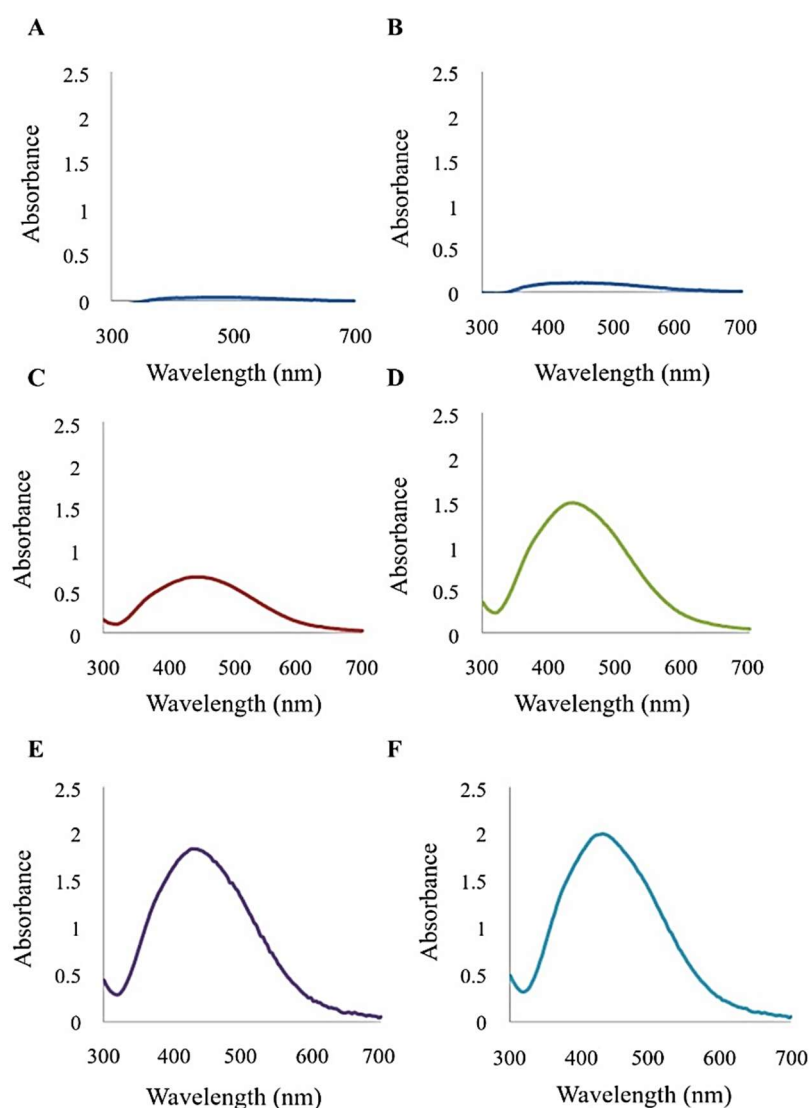


Figure 2 UV-Visible absorption spectra of synthesized silver nanoparticles from *C. asiatica* extract at different times. A: 15 min, B: 30 min, C: 60 min, D: 120 min, E: 180 min, and F: 240 min, respectively, in the wavelength range of 300–700 nm.

3.2 การศึกษาอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยวิธี UV-Visible spectrophotometer

จากการศึกษาพบว่า สารที่สังเคราะห์ขึ้นมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 431 ถึง 433 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Eze et al. (2019) ซึ่งทำการทดลองสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดใบบัวบก โดยค่าการดูดกลืนแสงเริ่มเพิ่มสูงขึ้นที่เวลา 60 นาที และสูงสุดที่เวลา 240 นาที โดยที่เวลา 180 นาที และ 240 นาทีไม่มีการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสง แสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนได้เกิดขึ้นและสิ้นสุดลง ดังแสดงใน Figure 2 จากผลการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าสารละลายซิลเวอร์นาโนมีสีเข้มที่สุดที่ระยะเวลาการบ่ม 240 นาที ประกอบกับผลการทดลองนี้ที่พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคซิลเวอร์นาโนสูงที่สุดที่เวลา 240 นาที และไม่มีการเพิ่มขึ้นอีกหลังจากนี้ อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์โดยใช้ระยะเวลาบ่ม 240 นาที จึงถูกนำไปใช้เพื่อศึกษาลักษณะของอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วย TEM และประสิทธิภาพของซิลเวอร์นาโนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่อไป

3.3 การศึกษาลักษณะของอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วย TEM

การศึกษาลักษณะทางกายภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโน ได้แก่ ขนาด รูปร่าง และลักษณะการกระจายตัวโดย TEM พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้มีรูปร่างกลม มีขนาดตั้งแต่ 4–100 นาโนเมตร โดยขนาดเล็กที่สุดที่พบคือ 4.14 นาโนเมตร และขนาดใหญ่ที่สุดคือ 100.09 นาโนเมตร ดังแสดงใน Figure 3 รูปร่างของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Kandasamy et al. (2013) ซึ่งทำการทดลองสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยใช้สารสกัดจากพืชชายฝั่ง *Prosopis chilensis* พบว่าสามารถสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่มีรูปร่างกลม และมีขนาดตั้งแต่ 5–25 นาโนเมตร

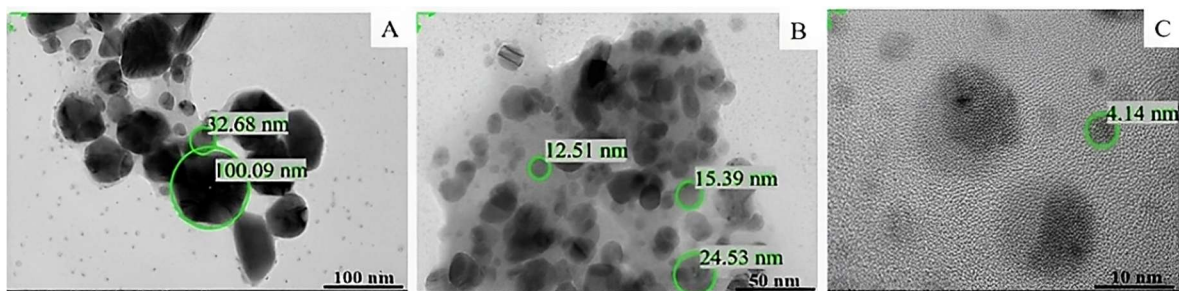


Figure 3 TEM analysis shows the shape and size of silver nanoparticles synthesized from *C. asiatica* extract. A: magnification 100,000x, B: magnification 200,000x, and C: magnification 1,000,000x

3.4 ประสิทธิภาพของซิลเวอร์นาโนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบหาค่า MIC และ MBC โดยวิธี Broth microdilution ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดใบบัวบกต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio* spp. 4 ชนิด ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus* และ *V. fluvialis* ผลการทดลองพบว่า อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดใบบัวบกมีค่า MIC เท่ากับ 15.63 ± 0.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อ *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* และ *V. fluvialis* ในขณะที่ *V. vulnificus* มีค่า MIC เท่ากับ 31.25 ± 0.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่า *V. vulnificus* มีความทนทานต่ออนุภาคซิลเวอร์นาโนมากที่สุด

สำหรับค่า MBC พบว่า *V. fluvialis* มีค่า MBC เท่ากับ MIC คือ 15.63 ± 0.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร บ่งชี้ว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ทันที ส่วน *V. parahaemolyticus* และ *V. mimicus* มีค่า MBC เท่ากับ 31.25 ± 0.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ *V. vulnificus* มีค่า MBC สูงสุดที่ 62.50 ± 0.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงใน Table 1 จากการเปรียบเทียบเชิงพรรณนาพบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดใบบัวบกมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อ *V. fluvialis* และน้อยที่สุดต่อ *V. vulnificus* ตามลำดับ

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดใบบัวบกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Vibrio* spp. ได้ดี ค่า MIC ที่ได้จากการทดลองอยู่ในระดับที่ต่ำ แสดงถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในความเข้มข้นที่ต่ำ (Pal et al., 2007) เมื่อเทียบกับการทดลองของ Huq (2020) ที่พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีค่า MIC และ MBC สำหรับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่สูงกว่า คือเท่ากับ 3.12 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การทดลองของ Zarei et al. (2014) ศึกษาประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนเชิงพาณิชย์ในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่ามีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 3.12 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และการทดลองของ Sanchooli et al. (2018) ที่พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดใบหญ้าแส้มีค่า MIC และ MBC สำหรับเชื้อ *V. cholerae* ที่ค่อนข้างสูงอย่างมาก คือเท่ากับ 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การศึกษาผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนของสารสกัดต่อเชื้อ *V. vulnificus* และ *V. mimicus* ยังไม่มีการรายงานมาก่อน และจากค่า MBC บ่งชี้ว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนไม่เพียงแต่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้เท่านั้น แต่ยังสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้เมื่อใช้ในความเข้มข้นที่สูงขึ้น สำหรับเชื้อ *V. vulnificus* ที่มีค่า MIC และ MBC สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Vibrio* spp. อื่น ๆ แสดงให้เห็นว่าเชื้อนี้อาจมีความทนทานต่ออนุภาคซิลเวอร์นาโนมากกว่า อย่างไรก็ตาม การที่ค่า MIC และ MBC ยังคงอยู่ในระดับที่ต่ำแสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีของอนุภาคซิลเวอร์นาโนในการจัดการกับเชื้อชนิดนี้

Table 1 MIC and MBC values of silver nanoparticles synthesized from *C. asiatica* extract against *Vibrio* spp.

Bacteria	MIC (ng/ml)	MBC (ng/ml)
<i>V. parahaemolyticus</i>	15.63 ± 0.00	31.25 ± 0.00
<i>V. vulnificus</i>	31.25 ± 0.00	62.50 ± 0.00
<i>V. mimicus</i>	15.63 ± 0.00	31.25 ± 0.00
<i>V. fluvialis</i>	15.63 ± 0.00	15.63 ± 0.00

กลไกการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ AgNPs ได้แก่ (1) การยึดเกาะกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้เกิดความเสียหายและเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ (2) การแทรกซึมเข้าสู่เซลล์และจับกับดีเอ็นเอหรือโปรตีนภายในเซลล์ ทำให้รบกวนการทำงานของเซลล์ รวมถึงการหยุดชะงักของกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ (3) การสร้างอนุมูลอิสระ (Reactive Oxygen Species, ROS) ที่ทำลายส่วนประกอบของเซลล์แบคทีเรีย และ (4) การปล่อยไอออน Ag^+ ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้ออย่างรุนแรง (Dakal et al., 2016; Marambio-Jones & Hoek, 2010) ฤทธิ์รวมของกลไกเหล่านี้ส่งผลให้ AgNPs มีความสามารถในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการทดลองนี้สนับสนุนการใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดใบบัวบกในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio* spp. ในกุ้ง เนื่องจากการมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนยังเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Iravani, 2011)

4. สรุป

การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนส่งผลให้สารละลายเปลี่ยนสีจากเหลืองอ่อนเป็นน้ำตาลเข้ม โดยจะมีความเข้มข้นสูงสุดเมื่อบ่มเป็นเวลา 240 นาที ค่าสูงสุดของการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 431–433 นาโนเมตร อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ได้มีลักษณะเป็นทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 4–100 นาโนเมตร อนุภาคซิลเวอร์นาโนนี้มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus* และ *V. fluvialis* ได้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำ โดยเฉพาะต่อ *V. fluvialis* ซึ่งมีค่า MIC และ MBC ต่ำที่สุด แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพสูงในการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่ทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ในสัตว์น้ำ โดยเฉพาะกุ้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ การใช้อนุภาค

ซิลเวอร์นาโนเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการควบคุมเชื้อโรคแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ ที่นอกจากจะช่วยลดการใช้สารเคมีแล้ว ยังลดความเสี่ยงต่อการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ การนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนมาใช้ในอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้ง ยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันโรค ลดการสูญเสีย และช่วยให้การผลิตมีความยั่งยืนมากขึ้น

ข้อจำกัดของงานวิจัยนี้คือ การทดลองยังคงจำกัดอยู่ในช่วงระยะเวลานั้นและในสภาวะควบคุมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งอาจไม่สะท้อนถึงประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดใบบัวบกในสภาวะจริงได้อย่างครบถ้วน แนวทางการวิจัยในอนาคตควรขยายระยะเวลาการศึกษาเพื่อประเมินความคงตัว (Stability) ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนในระยะยาว ภายใต้สภาวะการเก็บรักษาที่แตกต่างกัน เช่น ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4 องศาเซลเซียส ตลอดจนดำเนินการทดลองในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) ภายใต้สภาวะฟาร์มเลี้ยงกุ้ง เพื่อยืนยันผลการยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp. ในระบบการเพาะเลี้ยงจริง ซึ่งจะช่วยให้ผลการวิจัยมีความครอบคลุมและสามารถประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุนวิจัยงบประมาณเงินรายได้ประจำปี 2563 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย และสถานที่ในการทำวิจัยคือ ห้องปฏิบัติการแบคทีเรียและกณวิทยาทางสัตวแพทย์ และห้องปฏิบัติการชีวเคมีทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช ทุกท่าน

6. เอกสารอ้างอิง

- Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., & Yadav, V. (2016). Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1831. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P., & Bossier, P. (2011). Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 251-258. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.004>
- Eze, F. N., Tola, A. J., Nwabor, O. F., & Jayeoye, T. J. (2019). *Centella asiatica* phenolic extract-mediated bio-fabrication of silver nanoparticles: characterization, reduction of industrially relevant dyes in water and antimicrobial activities against foodborne pathogens. *RSC Advances*, 9, 37957-37970. <https://doi.org/10.1039/C9RA08618H>
- Huq, M. A. (2020). Biogenic silver nanoparticles synthesized by *Lysinibacillus xylanilyticus* MAHUQ-40 to control antibiotic-resistant human pathogens *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella typhimurium*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 16(8), 597502. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.597502>
- Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638-2650. <https://doi.org/10.1039/C1GC15386B>
- James, J. T., & Dubery, I. A. (2009). Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. *Molecules*, 14(10), 3922-3941. <https://doi.org/10.3390/molecules14103922>
- Kandasamy, K., Alikunhi, N. M., Manickaswami, G., Nabikhan, A., & Ayyavu, G. (2013). Synthesis of silver nanoparticles by coastal plant *Prosopis chilensis* (L.) and their efficacy in controlling vibriosis in shrimp *Penaeus monodon*. *Applied Nanoscience*, 3, 65-73. <https://doi.org/10.1007/s13204-012-0064-1>
- Kuppusamy, P., Yusoff, M. M., Maniam, G. P., & Govindan, N. (2016). Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications - an updated report. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(4), 473-484. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.11.013>

- Marambio-Jones, C., & Hoek, E. M. V. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 1531–1551. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>
- Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? a study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1712-1720. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>
- Prabhu, S., & Poullose, E. K. (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2, 1-10. <https://doi.org/10.1186/2228-5326-2-32>
- Sanchooli, N., Saeidi, S., Barani, H. K., & Sanchooli, E. (2018). *In vitro* antibacterial effects of silver nanoparticles synthesized using *Verbena officinalis* leaf extract on *Yersinia ruckeri*, *Vibrio cholera* and *Listeria monocytogenes*. *Iranian Journal of Microbiology*, 10(6), 400-408. <https://ijm.tums.ac.ir/index.php/ijm/article/view/1289>
- Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D., & Yang, D. C. (2016). Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 34(7), 588-599. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.006>
- Singhal, G., Bhavesh, R., Kasariya, K., Sharma, A. R., & Singh, R. P. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum sanctum* (Tulsi) leaf extract and screening its antimicrobial activity. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 2981-2988. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-0193-y>
- Zarei, M., Jamnejad, A., & Khajehali, E. (2014). Antibacterial effect of silver nanoparticles against four foodborne pathogens. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(1), e8720. <https://doi.org/10.5812/jjm.8720>