ผลของสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria*) ต่อสุขภาพตับและตับอ่อน การต้านอนุมูลอิสระ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคตับและตับอ่อนวายฉับพลันของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Effects of Crude Extract of Hazardana (*Phyllanthus urinaria*) on Hepatopancreatic Health Status, Antioxidant, Immune Response and Resistance to Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

อุทร เจริญเดช[1*] วรวุฒิ เกิดปราง[1] และ จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ[2]

Uton Charoendat[1*], Worawut Koedprang[1] and Jumroensri Thawonsuwan[2]

Received: 23 June 2020, Revised: 1 October 2020, Accepted: 4 November 2020

บทคัดย่อ

การใช้สารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria*) ในการผสมอาหารกุ้งด้วยความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นคราวละ 10 เท่า ในช่วง 1-10,000 ppm แล้วนำไปเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) นาน 56 วัน พบว่ากุ้งมีค่าระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase และ alanine aminotransferase ลดลงแปรผกผันกับระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้นครั้งละ 10 เท่า โดยที่ความเข้มข้น 1,000 และ 10,000 ppm ให้ผลดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เนื่องจากตับและตับอ่อนที่มีสุขภาพดีจะมีค่าระดับเอนไซม์ทั้งสองต่ำ ส่วนค่า hepatosomatic index ค่า total antioxidant capacity และค่า phenoloxidase activity พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในทุกความเข้มข้นของสารสกัดที่ผสมอาหารให้กุ้งกิน ถึงแม้จะมีแนวโน้มสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นก็ตาม ในการศึกษานี้พบว่าค่า phagocytic activity นั้นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อกุ้งกินอาหารผสมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1,000 และ 10,000 ppm และจากการศึกษาความต้านทานโรคตับและตับอ่อนวายฉับพลัน (AHPND) ที่เกิดจากการติดเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* VPP ในลูกกุ้ง พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริมสารสกัดที่ความเข้มข้น 10,000 ppm เป็นเวลา 28 วัน มีอัตราการรอดตายและอัตราการรอดตายสัมพัทธ์มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 88.00±8.37 และ 75.00+17.43 %

---

[1] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง 92150

[1] Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Sikao, Trang 92150, Thailand.

[2] ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90100

[2] Songkhla Aquatic Animal Health Research Center, Muang, Songkhla 90100, Thailand.

[*] ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): aonuton@hotmail.com

ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า สารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบนั้นสามารถส่งเสริมสุขภาพตับและตับอ่อนของกุ้งได้ และอาจเสริมการต้านอนุมูลอิสระ ภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรค AHPND ได้ แต่ต้องใช้สารสกัดหยาบในปริมาณสูง จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการแยกเฉพาะสารออกฤทธิ์ของพืชชนิดนี้ที่จะนำมาใช้ให้เกิดประสิทธิภาพมากขึ้น

คำสำคัญ: หญ้าใต้ใบ, กุ้งขาวแวนนาไม, ตับและตับอ่อน, โรคตับและตับอ่อนวายฉับพลัน

ABSTRACT

The use of feed containing crude extract from Hazarnada (*Phyllanthus urinaria*) at ten times concentration increased within a range of 1 to 10,000 ppm, for rearing Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), was investigated over a 56-day feeding trial. It was found that the decrease of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase levels in shrimp were in contrast to each ten-fold increase of the extract concentration, and the concentration levels of 1,000 and 10,000 ppm showed significant differences ($p<0.05$). In case of hepatosomatic index, total antioxidant capacity and phenoloxidase activity, no significant differences ($p>0.05$) were found in all concentrations of the extract fed to shrimp, although the tendency grew with increasing concentration. In this trial, the phagocytic activity had significantly elevated ($p<0.05$) when shrimp fed with diets containing 1,000 and 10,000 ppm of the extract. Regarding the study of resistance to acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) caused by *Vibrio parahaemolyticus* VPP infection in juvenile shrimp, the results exhibited that shrimp ingested 10,000 ppm extract-supplemented diet for 28 days had the highest survival rate and relative percentage survival ($p<0.05$). In conclusion, it is suggested that Hazardana crude extract can promote hepatopancreas health status of shrimp and may strengthen antioxidants, immunity and resistance to AHPND, but it must be applied with high concentration. Therefore, further studies on separation of specific active ingredients should be conducted to use this plant extract more effectively.

Key words: *Phyllanthus urinaria*, *Litopenaeus vannamei*, hepatopancreas, acute hepatopancreatic necrosis disease

บทนำ

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีการขยายตัวด้านการเลี้ยงเรื่อยมา เนื่องจากเป็นกุ้งที่ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์มาอย่างต่อเนื่อง ทำให้เจริญเติบโตเร็ว มีขนาดสม่ำเสมอ และสามารถเลี้ยงได้ในอัตราความหนาแน่นสูง แต่อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงกุ้งในปัจจุบันมักประสบกับปัญหาต่างๆ มากขึ้น โดยเฉพาะปัญหาด้านโรคระบาดที่เป็นโรคอุบัติใหม่ซึ่งยังไม่มีวิธีการป้องกันรักษาที่ชัดเจน โดยปัญหาเกี่ยวกับโรคกุ้งนี้ โรคตับและตับอ่อนวายฉับพลัน (acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND) ซึ่งมีชื่อเดิมคือกลุ่มอาการตายด่วน (early mortality syndrome; EMS) ที่สามารถทำให้กุ้งตายหลังจากปล่อยลงเลี้ยงในบ่อดินเป็นระยะเวลาประมาณ 35 วัน ก็ยังคงเป็นปัญหากับการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในปัจจุบัน

โดยกุ้งที่ติดเชื้อจะมีตับและตับอ่อนอักเสบอย่างฉับพลัน พิจารณาจากอาการตับและตับอ่อนขาวซีด ฝ่อลีบ เนื้อเยื่อมีการตายและการอักเสบ ไม่มีการสะสมของเม็ดไขมันที่เซลล์ตับ (FAO, 2013; Tran *et al*., 2013) ที่ผ่านมาได้มีรายงานการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่ากลุ่มอาการดังกล่าวเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มียีนสร้างสารพิษ คือ binary Pir-liketoxin pair ToxA และ ToxB ซึ่งสารพิษเหล่านี้อยู่ที่ pVA plasmid ขนาดประมาณ 69 kbp ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรค AHPND และสามารถตรวจวัดเชื้อก่อโรคได้โดยใช้วิธีการ AHPND detection version 4 (AP4) ซึ่งเป็นวิธี two-tube nested PCR ที่ใช้ตรวจยีนที่สร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดโรค AHPND ได้แก่ ToxA และ ToxB (Dangtip *et al*., 2015) เพื่อการแก้ปัญหาเบื้องต้นเกี่ยวกับโรคนี้ เกษตรกรจึงได้มีการจัดระบบฟาร์มเลี้ยงกุ้งให้ถูกสุขลักษณะ มีการกำจัดของเสียจำพวกสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงเพื่อตัดทอนการเจริญของเชื้อก่อโรค มีการใช้ลูกพันธุ์ที่แข็งแรง ปลอดโรค หรือเลือกใช้กุ้งชำ ซึ่งเป็นกุ้งที่อนุบาลเบื้องต้นก่อนประมาณ 1 เดือน ก่อนปล่อยลงสู่บ่อดิน และเลี้ยงกุ้งตามวิถีทางแห่งธรรมชาติโดยปราศจากการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น การใช้โปรไบโอติกส์และพรีไบโอติกส์ และการใช้พืชสมุนไพรในการเลี้ยงกุ้ง โดยพบว่าสมุนไพรหลายชนิดมีประสิทธิภาพดีและสามารถนำมาใช้ในการป้องกันโรค AHPND ได้ และชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ คือ หญ้าใต้ใบ หรือลูกใต้ใบชนิด *Phyllanthus urinaria* เนื่องจากสมุนไพรชนิดนี้มีสารพฤกษเคมีที่เป็นประโยชน์หลายชนิด ได้แก่ glycosides, saponins, flavonoids, alkaloids, lignans และ tannins เป็นต้น ทำให้มีฤทธิ์ทางยาที่เด่นชัด คือ เป็นสมุนไพรบำรุงตับ ต้านเชื้อไวรัส ต้านเชื้อแบคทีเรีย ลดการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเนื้องอก และต้านเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (Khongsen *et al*., 2013) ในการใช้สารสกัดจากหญ้าใต้ใบกับสัตว์น้ำได้มีรายงานของ Direkbusarakom *et al*. (1995) พบว่าสารสกัดหยาบจากพืชชนิดนี้ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัส YHV ที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) มีค่า LD_{50} เมื่อทดสอบกับลูกกุ้งระยะ PL-15 เท่ากับ 2,564±5.8 mg/ml และมีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือด (phagocytosis) ในกุ้งกุลาดำ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาพบว่าสมุนไพรชนิดนี้สามารถต้านเชื้อไวรัส WSSV ที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้ง และที่ความเข้มข้น 10 ppm สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในกุ้งได้ 100% (Direkbusarakom, 1998) ด้วยคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการบำรุงรักษาเซลล์ตับให้มีสภาพสมบูรณ์ ลดโอกาสการเกิดอาการตับอักเสบ และการป้องกันโรคต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับตับ หญ้าใต้ใบจึงเป็นพืชสมุนไพรที่น่าสนใจ เพื่อนำมาใช้กับการเลี้ยงกุ้งในลักษณะของการเสริมสุขภาพ บำรุงรักษาสภาพตับและตับอ่อน ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการป้องกันโรค AHPND ที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. parahaemolyticus* ทำให้ปัญหาในการเลี้ยงกุ้งของเกษตรผู้เลี้ยงลดลง ส่งผลต่อความยั่งยืนในอุตสาหกรรมกุ้งไทยในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบ

ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบ (*P. urinaria*) ด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจาก Poompachee and Chudapongse (2012) โดยนำหญ้าใต้ใบทั้งต้นมาล้างให้สะอาด ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ อบแห้งด้วยเครื่อง hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 °C บดให้ละเอียด แล้วแช่ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 99.9 % ในอัตราส่วน 1:10 w/v เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นกรองน้ำสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วนำไปประเหยแห้งด้วยเครื่อง

rotary evaporator จนได้สารสกัดกึ่งเหลวกึ่งแข็ง นำไปอบแห้งอีกครั้งที่อุณหภูมิ 50 °C เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ในตู้เย็น - 20 °C เพื่อรอการใช้งาน

ผลของการเสริมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบในอาหารต่อสุขภาพตับและตับอ่อน การต้านอนุมูลอิสระ และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

1. การออกแบบการทดลองและการจัดการระบบเลี้ยง

ทำการแบ่งชุดการทดลองตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) ออกเป็น 6 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ แบ่งตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่ใช้ในการผสมอาหาร โดยพิจารณาจากรายงานของ Direkbusarakom *et al.* (1998) และการทดสอบเบื้องต้นในกุ้งเกี่ยวกับการยอมรับอาหารผสมสารสกัด ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารไม่ผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบ (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบ 1 ppm (0.001 g ต่ออาหาร 1 kg)

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบ 10 ppm (0.01 g ต่ออาหาร 1 kg)

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบ 100 ppm (0.1 g ต่ออาหาร 1 kg)

ชุดการทดลองที่ 5 อาหารผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบ 1,000 ppm (1 g ต่ออาหาร 1 kg)

ชุดการทดลองที่ 6 อาหารผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบ 10,000 ppm (10 g ต่ออาหาร 1 kg)

กุ้งทดลองในแต่ละซ้ำถูกเลี้ยงในถังพลาสติกกลมสีดำขนาดความจุ 500 L (เส้นผ่านศูนย์กลาง 93 cm ความสูง 74 cm) ด้วยความหนาแน่น 50 ตัวต่อน้ำ 400 L และใช้กุ้งขนาดเริ่มต้นที่ 7-8 g เพื่อทดลองเลี้ยง 56 วัน ในระบบเลี้ยงที่มีชุดกรองน้ำ มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 50% สัปดาห์ละ 2 ครั้ง และมีการตรวจวัดคุณภาพน้ำทุกสัปดาห์เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้ง โดยวัดอุณหภูมิของน้ำด้วย thermometer และควบคุมให้อยู่ระหว่าง 25-32 °C วัดความเค็มของน้ำด้วย salinometer และควบคุมให้มีค่าเท่ากับ 15 ppt วัด pH ของน้ำด้วย pH meter และควบคุมให้อยู่ระหว่าง 7.5-8.5 และใช้วิธีการมาตรฐานในการวิเคราะห์น้ำ (APHA, 2012) เพื่อวัดคุณภาพน้ำอื่นๆ ได้แก่ วัดออกซิเจนที่ละลายน้ำและควบคุมให้มากกว่า 5 mg/L วัดความเป็นด่างและควบคุมให้อยู่ระหว่าง 100-120 mg/L as $CaCO_3$ วัดแอมโมเนียและควบคุมให้น้อยกว่า 1 mg/L และวัดไนไตรท์และควบคุมให้น้อยกว่า 0.1 mg/L ในส่วนของความชื้นสัมพัทธ์ การถ่ายเทอากาศภายในโรงเพาะฟัก ความเข้มแสง และอัตราส่วนของแสงสว่างกลางวันกับกลางคืนนั้นขึ้นอยู่กับช่วงเวลาตามธรรมชาติในรอบวัน

2. การเตรียมอาหารทดลองและการให้อาหาร

ทำการละลายสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วย ethanol 95% ปริมาตร 10 ml จากนั้นสเปรย์ลงบนอาหารกุ้งสำเร็จรูปขนาดกลาง (โปรตีน 35%) ปริมาณ 1 kg ที่ใส่ในถุงพลาสติก เขย่าถุงให้เม็ดอาหารเคลือบด้วยสารสกัดจนทั่ว แล้วอบแห้งเม็ดอาหารด้วยเครื่อง hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 2 ชั่วโมง และผึ่งลม 1 ชั่วโมง จากนั้นเคลือบเม็ดอาหารด้วยน้ำมันปลาและผึ่งให้แห้งอีก 1 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการละลายของสารออกมาจากเม็ดอาหารขณะที่อยู่ในน้ำและเพิ่มความอยากอาหารให้กับกุ้ง สำหรับอาหารในชุดความคุมนั้นมีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกันกับอาหารในชุดทดลองทุกขั้นตอน แต่ไม่มีสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบ เตรียมอาหารทดลองใหม่สัปดาห์ละครั้ง และเก็บรักษาสภาพในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 °C โดยการให้อาหารกุ้งนั้น เริ่มต้นอัตราการให้อาหารที่ 6% ของน้ำหนักตัวต่อวัน

ให้อาหาร 4 มื้อต่อวัน และมีการปรับปริมาณอาหารตามอัตราการกินของกุ้งในแต่ละวัน

3. การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์ตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างนั้นผู้วิจัยได้รับใบอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ เลขที่ใบอนุญาต U1-01574-2588 โดยเก็บตัวอย่างหลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 56 วัน อดอาหารกุ้ง 12 ชั่วโมงก่อนทำการสุ่มเก็บตัวอย่างกุ้ง 15 ตัวต่อชุดการทดลอง (ซ้ำละ 5 ตัว) เพื่อเก็บข้อมูลน้ำหนักตัว น้ำหนักตับและตับอ่อน และทำการเก็บเลือดกุ้งเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปัจจัยชี้วัดต่างๆ ได้แก่

3.1 การวิเคราะห์หาค่าดัชนีตับ (hepatosomatic index; HSI)

คำนวณจากสูตร HSI (%) = น้ำหนัก hepatopancreas × 100 / น้ำหนักตัวกุ้ง

3.2 การวิเคราะห์หาค่าระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT)

ดำเนินการโดยดูดเลือดกุ้ง 1 ml จาก ventral sinus cavity ด้วย sterile syringe (26-gauge) ขนาด 3 ml ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (5% sodium citrate) เคลือบอยู่ จากนั้นปั่นตกตะกอนเลือดด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 4,000 rpm เวลา 4 นาที อุณหภูมิ 4 °C เพื่อแยกส่วนของน้ำเลือด (plasma) มาวิเคราะห์หาค่าระดับเอนไซม์ AST และ ALT ซึ่งมีหน่วยเป็น unit/L (U/L)โดยใช้ชุดทดสอบ Aspartate transaminase assay kit (Abnova Corporation, Taiwan) และ Alanine transaminase assay kit (Abnova Corporation, Taiwan) ตามลำดับ

3.3 การวิเคราะห์หาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยราม (total antioxidant capacity; TAC)

ดำเนินการเก็บตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งเช่นเดียวกันกับวิธีการในข้อ 3.2 และนำมาวิเคราะห์หาค่า TAC (μM) ด้วยชุดทดสอบ OxiSelect™ total antioxidant capacity (TAC) assay kit (Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA)

3.4 การวิเคราะห์ค่า phenoloxidase activity (PO)

ดำเนินการโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Rengpipat *et al.* (2000) โดยดูดเลือดกุ้ง 300 μl จาก ventral sinus cavity ด้วย sterile syringe (26-gauge) ขนาด 1 ml ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (10% sodium citrate ใน K-199 medium) อยู่ 600 μl จากนั้นนำเลือดใส่หลอดขนาด 1.5 ml แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 4,000 rpm เวลา 3 นาที อุณหภูมิ 4 °C เพื่อแยกเอาเฉพาะส่วนของเม็ดเลือด (hemocytes) ที่ตกตะกอนก้นหลอดมาเติม CAC buffer 300 μl ละลายตะกอนของเม็ดเลือดที่ก้นหลอด แล้วนำไปใส่ในเครื่อง sonicator 10 นาที เพื่อทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตก และปั่นตกตะกอนเลือดที่ 16,000xg เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 °C เพื่อแยกเฉพาะส่วนใส (hemolysate) มาใช้ในการวัดปริมาณ protein ซึ่งดำเนินการตาม Lowry's method (Lowry *et al.*, 1951) และวัดค่า phenoloxidase activity โดยใส่ตัวอย่าง hemolysate 50 μl ผสมกับ trypsin 50 μl ใน 1 well ของ 96-well plate แบบ flat bottom (3 wells ต่อตัวอย่าง) ในส่วนของ blank ให้ใส่ CAC buffer แทนตัวอย่าง จากนั้นบ่ม 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม L-DOPA 50 μl บ่มต่ออีก 10 นาที แล้วทำการวัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ optical density (OD) 490 nm ทุก 2 นาที ในช่วงเวลา 20 นาที ด้วยเครื่อง microplate reader (Spectrostar Nano) จากนั้นนำค่า absorbance ที่ได้ไปคำนวณ phenoloxidase activity (unit/min/mg protein) โดย 1 unit ของ phenoloxidase เท่ากับการเพิ่มขึ้นของค่า absorbance ที่ 0.001/min/mg protein

3.5 การวิเคราะห์ค่า phagocytic activity (PA)

ดำเนินการโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Rengpipat *et al.* (2000) โดยผสม hemocytes (~10^6

cells/ml) 300 µl และยีสต์ (~10^7 cells/ml) 300 µl ในหลอดขนาด 1.5 ml จากนั้นหยอดและกระจายส่วนผสม 200 µl ลงบน slide ที่เตรียมไว้ (ทำ 2 ซ้ำ) บ่มใน moisture chamber ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมงครึ่ง แล้วค่อยๆ ล้าง medium ที่มี hemocytes ซึ่งไม่เกาะกระจกออก 1 รอบด้วย K-199 medium 100 µl ตรึง hemocytes ที่เกาะกระจกด้วย 0.125% L-glutaraldehyde 200 µl บ่ม 5 นาที แล้วค่อยๆ ล้าง hemocytes ที่ไม่เกาะกระจกอีกครั้งด้วย K-199 medium 100 µl ผึ่งลมให้แห้งและย้อมสี slide ด้วย Diff Quick staining set (High Science Limited Partnership) ปิดผนึกแผ่น slide ด้วย permount แล้วทำการนับจำนวน hemocytes ทั้งหมด 200 เซลล์ โดยนับแยกเซลล์ที่จับกินยีสต์ และนับจำนวนยีสต์ที่ถูกจับกินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000x และนำมาคำนวณค่า phagocytic activity ต่างๆ ดังนี้

Percent phagocytosis (% P) = (จำนวน hemocytes ที่จับกินยีสต์ / จำนวน hemocytes ที่นับ) × 100

Phagocytic index (PI) = (จำนวน hemocytes ที่จับกินยีสต์ / จำนวน hemocytes ที่นับ) × (จำนวนยีสต์ที่ถูกจับกิน / จำนวน hemocytes ที่นับ) × 100

Average number of the yeasts ingested per cell (AYPC) = จำนวนยีสต์ที่ถูกจับกิน / จำนวน hemocytes ที่จับกินยีสต์

ผลของสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบในอาหารต่อการต้านทานโรค AHPND ในกุ้งทดลอง

1. การเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลอง

เลี้ยงกุ้งโดยการแบ่งเป็น 6 ชุดการทดลอง ตามการทดลองข้างต้น โดยเลี้ยงกุ้งในถังพลาสติกกลมสีดำขนาด 500 ลิตร ชุดการทดลองละ 1 ถัง ด้วยความหนาแน่น 150 ตัวต่อน้ำ 400 ลิตร และใช้ลูกกุ้งเริ่มต้นระยะ PL15 ทดลองเลี้ยงนาน 28 วัน ให้กุ้งกินอาหารทดลองตามวิธีการเตรียมข้างต้นแต่ใช้อาหารกุ้งแบบเกล็ดเล็ก ให้อาหารกุ้ง 4 มื้อต่อวัน โดยมีอัตราการให้อาหารกุ้งเริ่มต้นที่ 10% ของน้ำหนักตัวต่อวัน และมีการปรับปริมาณอาหารตามอัตราการกินของกุ้งในแต่ละวันจนครบระยะเวลาทดลองเลี้ยง

2. การทดสอบความต้านทานโรค AHPND

2.1 การเตรียมเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* VPP

ดำเนินการเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* VPP ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรค AHPND ตามวิธีการของ Sritunyalucksana *et al.* (2005) แล้วนำเชื้อไปหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งที่เลี้ยง 1 เดือน (อายุลูกกุ้งประมาณ 45 วัน) ตายได้ 50% (median lethal concentration; LC_{50}) ตามวิธีการของ Reed and Muench (1938) จากนั้นนำข้อมูลความเข้มข้นที่ได้ไปใช้ในขั้นตอนของการทดสอบความต้านทานโรคต่อไป

2.2 การทดสอบความต้านทานโรค (Challenge test)

ทำการทดสอบความต้านทานโรคโดยวิธีการแช่ (immersion method) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Balcázar *et al.* (2007) โดยสุ่มลูกกุ้งน้ำหนักเฉลี่ย 1.26±0.37 g จากแต่ละชุดการทดลองมา 50 ตัว แบ่งใส่ตะกร้าที่มีฝาปิดและมีความจุน้ำประมาณ 2 ลิตร ตะกร้าละ 10 ตัว ชุดการทดลองละ 5 ตะกร้า (ซ้ำ) จากนั้นนำตะกร้าไปแช่ในถังเดียวกันโดยวางตำแหน่งของตะกร้าแบบสุ่มตลอด ซึ่งถังที่ใช้เป็นถังพลาสติกสีดำขนาดความจุน้ำ 800 ลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง 137 cm ความสูง 55 cm) มีน้ำทะเลความเค็ม 15 ppt ปริมาณ 400 ลิตร และมีเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในระดับความเข้มข้นที่ 96 hr-LC_{50} (2.39×10^4 CFU/ml) ทั้งนี้มีการติดตั้งระบบให้อากาศและระบบกรองน้ำในถังทดลองเพื่อให้คุณภาพน้ำอยู่ในสภาพดี มีการตรวจวัดคุณภาพน้ำและปรับให้เหมาะสมกับสภาพการเลี้ยงกุ้งตามปกติ กุ้งได้รับอาหารทดลองตามปกติจนครบระยะเวลาทดสอบ 96 ชั่วโมง ทำการบันทึกอัตราการตายของกุ้งในแต่ละกลุ่มเพื่อนำไปหาค่าอัตราการตายสะสมในแต่ละวัน และเก็บตัวอย่างกุ้งที่ตายมาตรวจ

ด้วยเทคนิคทางจุลชีววิทยาเพื่อเป็นการยืนยันว่าการตายของกุ้งเกิดจากการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้งนี้ มีการจัดชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่เชื้อ *V. parahaemolyticus* ควบคู่ไปด้วยเพื่อการยืนยันว่าระบบที่ใช้ในการทดสอบความต้านทานโรคไม่มีผลต่อการตายของลูกกุ้ง เมื่อสิ้นสุดการทดสอบ นำผลการตายสะสมของกุ้งมาคำนวณหาค่าอัตราการรอดตาย (survival rate; SR) และอัตราการรอดตายสัมพัทธ์ (relative percentage survival; RPS) โดยมีสูตรการคำนวณ ดังนี้

SR (%) = (จำนวนลูกกุ้งที่เหลือเมื่อสิ้นสุดการทดลอง × 100) / จำนวนลูกกุ้งเริ่มต้น

RPS (%) = [1 - (เปอร์เซ็นต์การตายของชุดการทดลอง/เปอร์เซ็นต์การตายของชุดควบคุม)] × 100

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 21 เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของทุกข้อมูลในแต่ละชุดการทดลองโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองโดยใช้ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

สุขภาพตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม

ตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมเป็นอวัยวะที่สำคัญ โดยเป็นแหล่งเก็บพลังงานและสารอาหารซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง และมีบทบาทในการลดสารพิษและขับสารพิษออกจากร่างกายโดยผ่านการทำงานของ F-cells (Vogt and Quinitio, 1994) ในการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่มีต่อสุขภาพตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมครั้งนี้ ได้พิจารณาสุขภาพตับและตับอ่อนของกุ้งจากค่า hepatosomatic index (HSI) และการวัดระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่า HSI ที่ตรวจวัดในกุ้งนั้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p>0.05) (ตารางที่ 1) ในส่วนของระดับเอนไซม์ AST และ ALT ในน้ำเลือดกุ้งนั้นสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดหน้าที่การทำงานของตับและตับอ่อนกุ้ง (hepatopancreas) ซึ่งเทียบได้กับตับในสัตว์ที่มีวิวัฒนาการสูงกว่า โดยการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ AST และ ALT นี้ ใช้ในการพิจารณาการเสื่อมของเซลล์ตับและตับอ่อน ซึ่งจะมีระดับสูงขึ้นเมื่อตับและตับอ่อนไม่สมบูรณ์ หรือมีความผิดปกติที่เกิดจากปัจจัยต่างๆ เช่น การติดเชื้อและการได้รับสารพิษ (Nemcsok and Boross, 1982; Pacheco and Santos, 2002) เช่น กุ้งที่กินอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อรา (aflatoxin) จะมีระดับของเอนไซม์ AST และ ALT ในน้ำเลือดสูงขึ้น เนื่องจากมีความผิดปกติของ hepatopancreas (Jamshidizadeh *et al*., 2019) ทั้งนี้ มีงานวิจัยต่างๆ ได้นำค่าระดับเอนไซม์ทั้งสองไปใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของสารเสริมในอาหารกุ้งที่มีผลต่อสุขภาพตับและตับอ่อน เช่น การใช้ astaxanthin (Niu *et al*., 2012) และการใช้ทรีโอนีน (Threonine) ผสมอาหารกุ้ง (Zhou *et al*., 2013) ซึ่งพบว่าค่าระดับเอนไซม์ AST และ ALT ที่ตรวจวัดได้นั้นลดลง สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่มีผลต่อสุขภาพตับและตับอ่อนของกุ้งในการศึกษานี้พบว่าเมื่อเพิ่มระดับความข้นของสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบในการผสมอาหารกุ้งครั้งละ 10 เท่า มีผลทำให้เอนไซม์ AST และ ALT มีการลดระดับลงไปในแนวทางตรงกันข้าม โดยชุดการทดลองที่กุ้งกินอาหารผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่ความเข้มข้น 10,000 ppm แสดงผลของค่าระดับเอนไซม์ AST และ ALT ที่มีแนวโน้มต่ำสุด และมีความ

แตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าระดับเอนไซม์ AST ของชุดการทดลองนี้กับชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่ผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ppm (ตารางที่ 1) ส่วนค่าระดับเอนไซม์ ALT พบว่าชุดการทดลองนี้มีความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดการทดลองที่กุ้งกินอาหารผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่ความเข้มข้น 1 ppm (ตารางที่ 1) การที่ผลการศึกษาเป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบมีคุณสมบัติในการบำรุงตับ ต้านสารพิษ รักษาสภาพเซลล์ตับ และป้องกันการเกิดตับอักเสบ (Wang *et al*., 1995) จึงอาจทำให้ค่าระดับเอนไซม์ AST และ ALT ซึ่งแสดงถึงสภาวะความผิดปกติของตับและตับอ่อนในกุ้งลดลง แปรผกผันกับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่ใช้ในการผสมอาหารเพิ่มขึ้นทุกๆ 10 เท่า การที่หญ้าใต้ใบแสดงผลออกมาในลักษณะดังกล่าวอาจเนื่องมาจากพืชชนิดนี้มีสารพฤกษเคมีหลายชนิด เช่น corilagin, flavonoids และ polysaccharides ซึ่งมีผลในการป้องกันโรคตับผ่านคุณสมบัติในการต้านการอักเสบโดยการลด TNF-α และการสร้าง IL-6 ผ่าน JNK และ NF-KB pathways ลดการเกิด oxidation ของกรดไขมันโดยการเพิ่มการทำงานของ CYP4a10 และกดการทำงานของ C/EBPβ และการต้านอนุมูลอิสระโดยลดการผลิต CYP2e1 (Shen *et al*., 2008) นอกจากนี้หญ้าใต้ใบยังช่วยลดอาการตับเป็นพิษเนื่องจากสาร CCl_4 ซึ่งเกิดจากการมี glutamate-pyruvatetransaminase และ glutathione peroxidase เพิ่มขึ้น โดยการควบคุม L-carnitine, taurocholic acid และกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน (Guo *et al*., 2017)

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกุ้งขาวแวนนาไม

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (total antioxidant capacity; TAC) เป็นตัวชี้วัดที่สามารถบ่งบอกถึงสภาวะการต้านอนุมูลอิสระในร่างกายของสัตว์น้ำได้ ถ้าค่านี้เพิ่มขึ้นแสดงว่ากลไกการต้านอนุมูลอิสระในร่างกายมีการทำงานเพิ่มขึ้น สำหรับการใช้ค่า TAC เพื่อตรวจวัดสภาวะการต้านอนุมูลอิสระในสัตว์กลุ่ม crustaceans นั้น ยังมีการวิจัยค่อนข้างจำกัด แต่อย่างไรก็ตาม ได้มีงานวิจัยต่างๆ ที่นำตัวชี้วัดนี้ไปใช้ในชื่อ total antioxidant status (TAS) สำหรับวัดระดับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในร่างกายของกุ้ง เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารเสริมในอาหารกุ้งที่เหนี่ยวนำให้เกิดผลในด้านของการต้านอนุมูลอิสระ เช่น Niu *et al*. (2012) ได้ศึกษา TAS ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่กินอาหารผสม astaxanthin และ canthaxanthin ที่เสริม cholesterol โดยพบว่ากุ้งมีค่า TAS สูงขึ้น Zhang *et al*. (2013) ได้ศึกษาพบว่ากุ้งขาวแวนนาไม (*L. vannamei*) ที่กินอาหารผสม astaxanthin ปริมาณ 125-150 mg ต่ออาหาร 1 kg เป็นเวลา 56 วัน มีค่า TAS สูงขึ้นมากกว่าชุดควบคุม และ Wang *et al*. (2017) ได้ทำการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารที่ผสมโรดิโอลา (*Rhodiola rosea*) ที่ความเข้มข้น 3,000 mg ต่ออาหาร 1 kg เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ากุ้งมีค่า TAS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในส่วนของการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่มีต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกุ้งครั้งนี้ ได้พิจารณาจากการตรวจวัดค่า TAC ในน้ำเลือดกุ้ง พบว่าชุดการทดลองที่กุ้งกินอาหารผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่ความเข้มข้น 10,000 ppm ได้แสดงค่า TAC ที่มีแนวโน้มสูงสุดแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นและชุดควบคุม (ตารางที่ 1) การที่หญ้าใต้ใบแสดงผลในการต้านอนุมูลอิสระนั้น อาจเนื่องมาจากพืชชนิดนี้มีสารพฤกษเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ที่สำคัญ ได้แก่ สารกลุ่ม flavonoids, tannins และ phenolic compounds (Santos *et al*. 1995)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

ในการทดสอบผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งซึ่งเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจงนั้นได้พิจารณาจากค่า phenoloxidase activity ซึ่งแสดงถึงการทำงานทางภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับสารน้ำ และค่า phagocytic activity ที่แสดงถึงการทำงานทางภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ ซึ่งที่ผ่านมา มีงานวิจัยต่างๆ นำปัจจัยชี้วัดทางภูมิคุ้มกันทั้งสองชนิดนี้ไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารเสริมในอาหารกุ้ง เช่น Lee *et al*. (2003) ได้ใช้ *Spirulina platensis* ผสมอาหารกุ้งเพื่อเพิ่ม phagocytic activity ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง Vanichkul *et al*. (2010) ได้ให้กุ้งกินอาหารผสมสารสกัดจากขมิ้นชัน 25 และ 50 mg ต่ออาหาร 1 kg พบว่ากุ้งมีค่า phenoloxidase activity สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Chang *et al*. (2012) ได้เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสมสาร zingerone ที่ 2.5 และ 5 mg ต่ออาหาร 1 kg เป็นเวลา 56 วัน พบว่ากุ้งมี phenoloxidase activity และ phagocytic activity สูงกว่าชุดชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Wu *et al*. (2015) ได้ให้กุ้งขาวแวนนาไมกินอาหารผสมสารสกัดจากว่านมหากาฬ (*Gynura bicolor*) ที่ 0.5, 1 และ 2 g ต่ออาหาร 1 kg เป็นเวลา 7 วัน พบว่ากุ้งมี phenoloxidase activity สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และได้มีการทดลองใช้สมุนไพรจีน minor bupleurum decoction 1% ผสมอาหารให้กุ้งขาวแวนนาไมกินเป็นเวลา 28 วัน พบว่ากุ้งมีค่า phenoloxidase activity และ phagocytic rate สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Wu *et al*., 2017) สำหรับการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเมื่อกุ้งกินอาหารผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่ความเข้มข้น 1,000 และ 10,000 ppm กุ้งมีค่า phagocytic activity เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นและชุดควบคุม โดยกุ้งที่กินอาหารผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่ 2 ระดับความเข้มข้นดังกล่าว มีค่า %P มากกว่ากุ้งที่กินอาหารผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับค่า PI พบว่ากุ้งที่กินอาหารผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่ความเข้มข้น 10,000 ppm มีค่านี้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนค่า AYPC พบว่ากุ้งที่กินอาหารผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่ความเข้มข้น 1,000 และ 10,000 ppm มีค่านี้มากกว่ากุ้งในชุดควบคมและกุ้งที่กินอาหารผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่ความเข้มข้น 1 และ 10 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่กินอาหารผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่ความเข้มข้น 100 ppm ส่วนค่า phenoloxidase activity นั้น พบว่ากุ้งที่กินอาหารผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่ความเข้มข้น 10,000 ppm ให้ผลที่สูงกว่าชุดการทดลองอื่นแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 2) การที่สารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบมีผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันนั้น อาจเนื่องมาจากประกอบไปด้วยสาร phyllanthin, hypophyllanthin, geraniin และ corilagin ซึ่งมีฤทธิ์การเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกาย (immunomodulatory activity) (Jantan *et al*., 2014) จึงอาจส่งผลให้ค่าของตัวชี้วัดการทำงานทางภูมิคุ้มกันระดับเซลล์และสารน้ำดังกล่าวข้างต้นเพิ่มสูงขึ้น

ความต้านทานโรคตับและตับอ่อนวายฉับพลัน (AHPND) ของกุ้งขาวแวนนาไม

จากการศึกษาความต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* VPP ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคตับและตับอ่อนวายฉับพลัน (AHPND) ในกุ้งขาวแวนนาไมนั้น พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริมด้วยสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่ความเข้มข้น 10,000 ppm เป็นเวลา 28 วัน มีอัตราการรอดตาย (SR) และ

อัตราการรอดตายสัมพัทธ์ (RPS) ที่มากกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่กุ้งกินอาหารผสมสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบที่ความเข้มข้น 1,000 ppm (ตารางที่ 3) ซึ่งผลในด้านความต้านทานโรคจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* VPP ที่ได้นี้ยังไม่มีประสิทธิภาพดีพอในการป้องกันโรค เพราะต้องใช้สารสกัดในความเข้มข้นสูงและไม่สามารถป้องกันโรคได้ 100% ถึงแม้จะมีการรายงานว่าพืชสกุลนี้มีสาร phyllanthin, phyltetralin, rutin, quercetin, trimethyl-3,4-dehydrochebulate และ methyl brevifolincarboxylate ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยสารเหล่านี้ทำให้โปรตีนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเสียสภาพ มีผลให้แบคทีเรียตายในที่สุด (Geethangili and Ding, 2018) และมีรายงานว่าที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ของสารสกัดจากพืชชนิดนี้ได้แสดงคุณสมบัติที่ดีในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคกุ้งในการทดลอง *in vitro* test (Direkbusarakom *et al*., 1998) ทั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรชนิดนี้กับสมุนไพรชนิดอื่นในด้านของการเสริมความต้านทานการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* VPP ในกุ้ง พบสารสกัดจากสมุนไพรชนิดอื่นให้ผลที่ดีกว่า เช่น สารสกัดจากขมิ้นชัน ซึ่งพบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่กินอาหารผสมสารนี้ด้วยความเข้มข้น 30 ppm นาน 7-14 วัน สามารถทำให้อัตรารอดตายหลังการแช่เชื้อ *V. parahaemolyticus* VPP สูงกว่าชุดควบคุม (Thawonsuwan and Kongkumnerd, 2018) แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากพืชชนิดนี้อาจมีประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันโรคติดเชื้อไวรัสในกุ้ง โดยพบว่าสารสกัดจากหญ้าใต้ใบปริมาณ 1 mg/ml มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัส Yellow Head Virus (YHV) ที่ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อที่ lymphoid organ ซึ่งอยู่บริเวณตับและตับอ่อนของกุ้งได้ (Direkbusarakom *et al*., 1995)

ตารางที่ 1 ผลของการเสริมอาหารกุ้งด้วยสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบ (*P. urinaria*) ต่อค่า total antioxidant capacity (TAC) ค่า hepatosomatic index (HSI) และค่าระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT) ในกุ้งขาวแวนนาไม (*L. vannamei*) หลังจากการทดลองเลี้ยง 56 วัน (Mean±SD; n=15)

Conc. of *P. urinaria* extract	TAC (µM)	HSI (%)	AST (U/L)	ALT (U/L)
0 ppm	370.48±57.98	4.27±0.34	17.30±3.93^{c}	16.35±4.08^{c}
1 ppm	376.55±45.64	4.30±0.59	15.31±5.03^{bc}	15.67±4.24^{bc}
10 ppm	377.42±46.44	4.38±0.64	14.02±5.33^{b}	14.99±3.39^{abc}
100 ppm	380.89±59.87	4.45±0.43	14.02±3.70^{b}	14.31±1.73^{abc}
1,000 ppm	380.74±44.59	4.48±0.47	10.11±1.84^{a}	13.20±2.92^{ab}
10,000 ppm	385.22±35.56	4.48±0.42	9.40±2.15^{a}	12.94±2.71^{a}

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 2 ผลของการเสริมอาหารกุ้งด้วยสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบ (*P. urinaria*) ต่อค่า phenoloxidase activity (PO) ค่า phagocytic activity (PA) ในกุ้งขาวแวนนาไม (*L. vannamei*) หลังจากการทดลองเลี้ยง 56 วัน (Mean±SD; n=15)

Conc. of *P. urinaria* extract	PO (unit/min/mg protein)	PA		
		% P	PI	AYPC
0 ppm	360.75±107.37	25.29±1.09[b]	8.42±1.32[d]	1.24±0.11[d]
1 ppm	396.75±117.87	26.10±0.53[b]	8.59±0.45[d]	1.26±0.06[cd]
10 ppm	408.90±138.14	26.11±1.23[b]	8.88±0.65[d]	1.30±0.07[bc]
100 ppm	409.05±103.66	26.51±0.27[b]	9.77±0.32[c]	1.35±0.05[ab]
1,000 ppm	451.83±177.21	35.50±0.58[a]	16.97±1.08[b]	1.37±0.07[a]
10,000 ppm	456.07±70.34	35.82±0.37[a]	18.00±0.62[a]	1.38±0.05[a]

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 3 ผลของการเสริมอาหารกุ้งด้วยสารสกัดหยาบจากหญ้าใต้ใบ (*P. urinaria*) ต่อความต้านทานโรคตับและตับอ่อนวายฉับพลัน (AHPND) ที่เกิดจากการติดเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* VPP ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม (*L. vannamei*) หลังจากการทดลองเลี้ยง 28 วัน โดยพิจารณาจากอัตราการรอดตาย (SR) และอัตราการรอดตายสัมพัทธ์ (RPS) (Mean±SD)

Conc. of *P. urinaria* extract	**SR (%)**	**RPS (%)**
0 ppm	52.00±8.37[c]	0.00±17.43[c]
1 ppm	52.00±8.37[c]	0.00±17.43[c]
10 ppm	62.00±8.37[c]	20.83±17.43[c]
100 ppm	76.00±5.48[b]	50.00±11.41[b]
1,000 ppm	82.00±8.37[ab]	62.50±17.43[ab]
10,000 ppm	88.00±8.37[a]	75.00±17.43[a]

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$)

สรุป

ผลที่ได้จากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าหญ้าใต้ใบ (*P. urinaria*) อาจเป็นพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการส่งเสริมสุขภาพให้กับกุ้งโดยเฉพาะการบำรุงตับและตับอ่อน และอาจมีส่วนช่วยในการเสริมภูมิคุ้มกันเสริมการต้านอนุมูลอิสระ และความต้านทานโรค AHPND ให้กับกุ้งได้ แต่ไม่มากนัก เนื่องจากการใช้สารชนิดนี้ในลักษณะของสารสกัดหยาบยังไม่สามารถส่งผลต่อประสิทธิภาพที่ดีเชิงประจักษ์ได้ เพราะต้องใช้สารที่ความเข้มข้นสูงจึงจะเห็นผลดีในด้านดังกล่าวที่ทำการศึกษา ทั้งนี้ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการแยกเฉพาะองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อปัจจัยต่างๆ ข้างต้นออกมาจากสารสกัดหยาบ เพื่อให้สามารถนำสารที่ต้องการมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดในปริมาณน้อย ซึ่งถือว่าเป็นความคุ้มค่ามากกว่าสำหรับการนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในทางปฏิบัติจริง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ที่ได้สนับสนุนงบประมาณแผ่นดิน พ.ศ. 2560 และงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2562 เพื่อใช้ในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำสงขลา ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อ *V. parahaemolyticus* VPP เพื่อมาใช้ในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

APHA. 2012. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 22nd ed. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF), Washington, D.C., USA.

Balcázar, L.J., Rojas-Luna, T. and Cunningham, D.P. 2007. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Invertebrate Pathology** 96(2): 147-150.

Chang, Y.P., Liu, C.H., Wu, C.C., Chiang, C.M., Lian, J.L. and Hsieh, S.L. 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 & Shellfish Immunology** 32(2): 284 -290.

Dangtip, S., Sirikharin, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Mavichake, R., Proespraiwonge, P. and Flegel, T.W. 2015. AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture Reports** 2(1): 158-162.

Direkbusarakom, S., Herunsalee, A., Boonyaratpalin, S., Danayadol, Y. and Aekpanithanpong, U. 1995. Effect of *Phyllanthus* spp. against yellow-head baculovirus infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, pp. 81-88. *In* Shariff, M, Arthur, J.R. and Subasinghe, R.P., eds. **Diseases in Asian Aquaculture II. Fish Health Section.** Asian Fisheries Society, Manila.

Direkbusarakom, S., Ezura, Y., Yoshimizu, M. and Herunsalee, A. 1998. Efficacy of Thai traditional herb extracts against fish and shrimp pathogenic bacteria. **Fish Pathology** 33(4): 437-441.

FAO. 2013. Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304), pp. 1-54. *In* **FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053.** Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, Hanoi, Vietnam.

Geethangili, M. and Ding, S.T. 2018. A review of the phytochemistry and pharmacology of *Phyllanthus urinaria* L. **Frontiers in Pharmacology** 9: 1109.

Guo, Q., Zhang, Q.Q., Chen, J.Q., Zhang, W., Qiu, H.C., Zhang, Z.J., Liu, B.M. and Xu, F.G.

2017. Liver metabolomics study reveals protective function of *Phyllanthus urinaria* against CC_{14}-induced liver injury. **Chinese Journal of Natural Medicines** 15(7): 525-533.

Jamshidizadeh, S., Biuki, N.A., Yousefzadi, M. and Aramideh, A. 2019. Response of Pacific white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on exposure to aflatoxin in feed. **Aquaculture Research** 50(7): 1973-1984.

Jantan, I., Ilangkovan, M., Yuandani, and Mohamad, H.F. 2014. Correlation between the major components of *Phyllanthus amarus* and *Phyllanthus urinaria* and their inhibitory effects on phagocytic activity of human neutrophils. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 14: 429.

Khongsen, M., Niyomdecha, A., Harnnarong, W. and Sukchan, P. 2013. A Review of a property and advantage: *Phyllanthus* spp. **Princess of Naradhiwas University Journal** 5(4): 153-163. (in Thai)

Lee, Y.K., Chew, P.F., Soh, B.S. and Tham, L.Y. 2003. Enhancing phagocytic activity of hemocytes and disease resistance in the prawn *Penaeus merguiensis* by feeding *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology** 15(4): 279-287.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randell, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry** 193(1): 265-275.

Nemcsok, J. and Boross, L. 1982. Comparative study on the sensitivity of different fish species to metal pollution. **Acta biologica Academiae Scientiarum Hungaricae** 33(1): 23-27.

Niu, J., Li, C.H., Liu, Y.J., Tian, L.X., Chen, X., Huang, Z. and Lin, H.Z. 2012. Dietary values of astaxanthin and canthaxanthin in *Penaeus monodon* in the presence and absence of cholesterol supplementation: effect on growth, nutrient digestibility and tissue carotenoid composition. **British Journal of Nutrition** 108(1): 80-89.

Pacheco, M. and Santos, M.A. 2002. Biotransformation, ecotoxic and histopatological effects of environmental contaminants in European eel, *Anguilla anguilla* (L). **Ecotoxicology and Environmental Safety** 53(3): 331-347.

Poompachee, K. and Chudapongse, N. 2012. Comparison of the antioxidant and cytotoxic activities of *Phyllanthus virgatus* and *Phyllanthus amarus* extracts. **Medical Principles and Practice** 21(1): 24-29.

Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **American Journal of Hygiene** 27(3): 493-497.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. and Menasaveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture** 191(4): 271-288.

Santos, A.R., Filho, V.C., Yunes, R.A. and Calixto, J.B. 1995. Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus *Phyllanthus*. **General Pharmacology** 26(7): 1499-1506.

Shen, B., Yu, J., Wang, S., Chu, E.S.H., Wong, V.W.S., Zhou, X., Lin, G., Sung, J.J.Y. and Chan, H.L.Y. 2008. *Phyllanthus urinaria* ameliorates the severity of nutritional steatohepatitis both in vitro and in vivo. **Hepatology** 47(1): 473-483.

Sritunyalucksana, K., Gangnonnigw, W., Archakunakorn, S., Fegan, D. and Flegel, T.W. 2005. Bacterial clearance rate and a new differential hemocyte staining method to assess immunostimulant activity in shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms** 63(1): 89-94.

Thawonsuwan, J. and Kongkumnerd, J. 2018. Efficiency of turmeric (*Curcuma longa* Linn.) extract on prevention of the EMS caused by *Vibrio parahaemolyticus* in white shrimp (*Penaeus vannamei* Boone, 1931), pp. 320-333. *In* **Proceeding of the Annual Conference on Fisheries 2018.** Department of Fisheries, Bangkok.

Tran, L., Nunan, L., Redman, R.M., Mohney, L.L., Pantoja, C.R., Fitzsimmons, K. and Lightner, D.V. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms** 105(1): 45-55.

Vanichkul, K., Areechon, N., Kongkathip, N., Srisapoome, P. and Chuchird, N. 2010. Immunological and bactericidal effects of turmeric (*Curcuma longa* Linn.) extract in Pacific white shrimps (*Litopenaeus vannamei* Boone). **Kasetsart Journal (Natural Science)** 44(5): 850-858.

Vogt, G. and Quinitio, E.T. 1994. Accumulation and excretion of metal granules in the prawn, *Penaeus monodon*, exposed to water-borne copper, lead, iron and calcium. **Aquatic Toxicology** 28(3-4): 223-241.

Wang, M, Cheng, H., Li, Y., Meng, L., Zhao, G. and Mai, K. 1995. Herbs of the genus *Phyllanthus* in the treatment of chronic hepatitis B: observations with three preparations from different geographic sites. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine** 126(4): 350-352.

Wang, Y., Liang, J.P., Duan, Y.F., Niu, J., Wang, J. and Huang, Z. 2017. Effects of dietary *Rhodiola rosea* on growth, body composition and antioxidant capacity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under normal conditions and combined stress of low-salinity and nitrite. **Aquaculture Nutrition** 23(3): 548-559.

Wu, C.C., Chang, Y.P., Wang, J.J., Liu, C.H., Wong, S.L., Jiang, C.M. and Hsieh, S.L. 2015. Dietary administration of *Gynura bicolor* (Roxb. Willd.) DC water extract enhances immune response and survival rate against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in white shrimp *Litopeneaus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology** 42(1): 25-33.

Wu, Y.S., Lee, M.C., Huang, C.T., Kung, T.C., Huang, C.Y. and Nan, F.H. 2017. Effects of traditional medical herbs “minor bupleurum decoction” on the non-specific immune responses of white shrimp (*Litopenaeus*

vannamei). **Fish and Shellfish Immunology** 64(1): 218-225.

Zhang, J., Liu, Y.J., Tian, L.X., Yang, H.J., Liang, G.Y., Yue, Y.R. and Xu, D.H. 2013. Effects of dietary astaxanthin on growth, antioxidant capacity and gene expression in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition** 19(6): 917-927.

Zhou, Q.C., Wang, Y.L., Wang, H.L. and Tan, B.P. 2013. Dietary threonine requirements of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture** 392-395: 142-147.