

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากตำรับยาเขียว ต่อการต้านเชื้อก่อโรคกุ้ง

Antioxidant and Antibacterial Activities of Crude Extracts from Ya-Keaw Formula Against Shrimp Pathogens

มลธิรา ศรีถาวร* อนุสรฯ พุยหุ่ณ อรวรรณ ชุณหชาติ และ สุทธิเดช ปรีชารัมย์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

Moltira Srithaworn*, Anussara Thuyhun, Orawan Chunhachart
and Sutthidech Preecharram

Department of Microbiology, Faculty of Liberal Arts and Science,
Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของตำรับยาเขียวต่อแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง โดยนำตำรับยาเขียว 2 ชนิดในท้องตลาดมาสกัดด้วยน้ำปราศจากไอออนและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20, 30, 40 และ 50 (v/v) จากการทดสอบโดยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดหยาบยาเขียวตำรับที่ 2 สกัดโดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ดีที่สุด โดยจะให้บริเวณยับยั้งขนาด 26.00 ± 3.60 , 26.67 ± 1.15 และ 24.17 ± 1.04 มิลลิเมตร ให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 6.25, 6.25 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถฆ่าเชื้อได้เท่ากับ 25, 12.5 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *A. hydrophila*, *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบยาเขียวตำรับที่ 2 โดยใช้วิธี DPPH radical scavenging assay พบว่าสารสกัดหยาบยาเขียวที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 100 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบยาเขียวที่มีพืชมเป็นส่วนใหญ่เป็นส่วนประกอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคกุ้งและมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้สูง

คำสำคัญ : ยาเขียว, สารต้านอนุมูลอิสระ, สารต้านแบคทีเรีย, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*

* ผู้ประสานงานหลัก (Corresponding Author)
e-mail: faasmtr@ku.ac.th

Abstract

The aim of this study was to determine the antioxidant and antibacterial activity of Ya-Keaw formula crude extracts against selected shrimp pathogen. For this study two of the most popular brands of Ya-Keaw extracted were analyzed. Extraction was performed with deionized water and ethanol diluted to 20%, 30%, 40% and 50 % (v/v). The crude extracts were evaluated for their antibacterial activities by the agar well diffusion technique. The highest antibacterial activity against *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* was observed in Ya-Keaw 2 extracted with 50% ethanol. The inhibition zones were 26.00 ± 3.60 , 26.67 ± 1.15 and 24.17 ± 1.04 mm, the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) values were 6.25, 6.25 and 6.25 mg/ml, and the Minimal Bactericidal Concentration (MBC) values were 25, 12.5 and 12.5 mg/ml for *A. hydrophila*, *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus*, respectively. Furthermore, antioxidant activity of Ya-Keaw 2 extracts was evaluated with DPPH scavenging activity. The highest antioxidant activity, 100% inhibition was observed at a concentration of 100 mg/ml of crude extract. In conclusion, ethanolic crude extracts of Ya-Keaw formula composed of Patchouli displayed antibacterial activity against all shrimp pathogenic bacteria tested and also demonstrated high antioxidant capacity.

Keywords : Ya-Keaw, Antioxidant agent, Antibacterial agent, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*

บทนำ

ประเทศไทยนับว่าเป็นหนึ่งในประเทศผู้นำทางด้านการประมงของโลก โดยผลผลิตสัตว์น้ำเฉลี่ยสูงถึงปีละ 3.7 ล้านตันและในช่วงปี พ.ศ. 2554–2557 ทั้งสัตว์น้ำจืดและน้ำเค็มถือเป็นสัตว์เศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทยโดยเฉพาะกุ้งสดแช่เย็นแช่แข็งและแปรรูปนับว่าเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญที่สุดในกลุ่มสินค้าประมงของไทย จากสถิติปริมาณผลผลิตสัตว์น้ำรวมของประเทศเริ่มมีอัตราการเปลี่ยนแปลงที่ลดลงตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549 พบว่ามีอัตราการเปลี่ยนแปลงระหว่างปี พ.ศ. 2549–2554 ลดลงเฉลี่ยร้อยละ 5.55 ต่อปี (Srijantuk, 2012) ทั้งนี้เป็นผลมาจากการจับสัตว์น้ำก่อนช่วงเวลาที่กำหนด การปนเปื้อนของสารปฏิชีวนะตกค้าง และอีกสาเหตุหลักมาจากการเกิดโรค เช่น โรคดวงขาวหรือโรคจุดขาว มีสาเหตุมาจากไวรัส *White Spot Syndrome Virus (WSSV)* โรคหัวเหลือง (*Yellow Head Virus, YHV*) และโรคเรืองแสงเกิดจากเชื้อ *Vibrio harveyi* เป็นต้น นำไปสู่การใชยาปฏิชีวนะและสารเคมีต่างๆ เพื่อกำจัดเชื้อ โดยยาปฏิชีวนะที่ใช้กัน

มากในฟาร์มกุ้งประเทศไทย ได้แก่ ฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolones) ออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างสารพันธุกรรมของแบคทีเรีย ซัลโฟนาไมด์ (sulfonamides) ออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย และออกซีเตตราซัยคลิน (oxytetracycline) ออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย (Holmström et al., 2003) ส่วนในฟาร์มปลาก็มักใช้ยาซัลฟาเมอราซีน (Sulfamerazine) และออกซีเตตราซัยคลิน (oxytetracycline) ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย (Punitha et al., 2008) หากมีการใช้ยาเหล่านี้อย่างไม่ถูกต้องอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงตามมา เช่น เกิดเชื้อสายพันธุ์ดีดื้อยา ปัญหามลพิษทางดินและน้ำ ที่สำคัญคือสารที่ตกค้างในสัตว์เหล่านี้ส่งผลต่อการส่งออกและความปลอดภัยของผู้บริโภค ปัจจุบันได้มีงานวิจัยมากมายเพื่อค้นคว้าหาแนวทางในการป้องกันการติดเชื้อ เช่น การผลิตวัคซีนต้านเชื้อจุลินทรีย์รวมทั้งไวรัสในกุ้งและปลา (Brudeseth et al., 2013; Kulkarni et al., 2013; Mohammed et al., 2013; Powell et al., 2011) ซึ่งมักจะมีราคาแพงและยากในการใช้สำหรับการเลี้ยงระดับฟาร์ม นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาหาสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ลดความเครียดและป้องกันรักษาโรคในปลาและกุ้ง โดยใช้สารสกัดจากสมุนไพร เพราะเป็นแนวทางที่มีความปลอดภัย ไม่ก่อมลพิษ ไม่มีสารตกค้างในสัตว์ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในแถบประเทศอินเดียซึ่งนิยมใช้สมุนไพร (Citarasu et al., 2006; Velmurugan et al., 2012) ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิดผลกระทบภายหลังจึงจำเป็นต้องใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือสารสกัดที่ได้มาจากธรรมชาติ เช่น ได้มีการศึกษาการป้องกันไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยนำอาหารกุ้งมาผสมสารสกัดสมุนไพรเช่น โกฐก้านพร้าว หญ้าแพรก มะตูม บอระเพ็ด ตำแย โสมอินเดีย และชิงสามารถช่วยลดการติดเชื้อไวรัส นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากสมุนไพรโกฐก้านพร้าว (*Rheum officinale*) มีฤทธิ์ในการลดความเครียดในกุ้งได้ (Citarasu, 2012) กลุ่มนักวิจัยไทยได้ค้นพบว่า การผสมสารสกัดจากหญ้าไต้ใบ (*Phyllanthus urinaria*) 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับไวรัสตัวแดงดวงขาวแล้วนำมาฉีดเข้ากุ้งพบว่ากุ้งมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 100 (Direkbusarakom et al., 1996) มีรายงานว่ากระเทียมสด เปลือกทับทิม ใบหูกวาง ชาเขียวญี่ปุ่นและใบชะพลู มีประสิทธิภาพออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสำคัญในกุ้งก้ามกรามซึ่งเกิดจากแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi* และ *V. parahaemolyticus* และพบว่าสารสกัดมีความเป็นพิษต่อลูกกุ้งก้ามกรามระดับต่ำ (Tummarongkongsatid & Rojtinakorn, 2007) นอกจากนี้ยังมีผู้พบว่าสารสกัดสมุนไพรเช่น ใบฝรั่ง (*Psidium guajava*) และใบกระเพรา (*Ocimum sanctum*) สามารถใช้ควบคุมโรคในปลาได้ โดยช่วยป้องกันการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในปลานิล (Rattanachaiakunsopon & Phumkhachorn, 2010)

ตำรับยาไทยเช่น ตำรับยาเขียว ซึ่งหาได้ง่ายทั่วไปตามท้องตลาดและเป็นตำรับยาไทยในตำราแพทย์แผนโบราณที่ใช้กันมายาวนาน องค์ประกอบหลักของตำรับยาเขียว ประกอบด้วย ใบพิมเสน ใบผักกระฉอม ใบหมากผู้ ใบหมากเมีย ใบสันพร้าวหอม รากผักหอม เปราะหอม จันทน์เทศ จันทน์แดง วานกิบเรต วานร่อนทอง เนระพูสี พิชนาศน์ มหาสดำ รากไคร้เครือ ดอกพิกุล เกสรบุณฑาค เกสรสารภี รากระย่อม ใบพรหมมิ จันทน์หอม และเกสรบัวหลวงเป็นต้น (National Drug Committee, 2006) มีสรรพคุณเป็นยาลดไข้ แก้อ่อนใน พิษอสุภกิเลส และพิษหัด โดยยังไม่มีหลักฐานหรือข้อมูลทางการแพทย์

และทางวิทยาศาสตร์ยืนยันในแง่ฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งในด้านการต้านไวรัส หรือการต้านแบคทีเรีย ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของตำรับยาเขียวต่อแบคทีเรียก่อโรคทั้งนี้เพื่อเป็นการลดปริมาณการใช้สารเคมี และยังเป็นการลดต้นทุนการผลิตและเสริมความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดหยาบจากตำรับยาเขียว

ตำรับยาเขียวที่ใช้ในการทดลองเป็นยาเขียวสองตำรับที่ได้รับความนิยมในท้องตลาด (ยาเขียวตำรับที่ 1 มีองค์ประกอบ ได้แก่ ใบพิมเสน จันทน์เทศ ใบสันพร้าวหอม พิชนาศน์ และสมุนไพรรื่นๆ ยาเขียวตำรับที่ 2 มีองค์ประกอบ ได้แก่ ใบพิมเสน จันทน์แดง รากระย่อม ใบพรมมิ จันทน์หอม และสมุนไพรรื่นๆ) นำมาสกัดโดยการแช่ในน้ำปราศจากไอออน (DI; Deionized water) และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20, 30, 40 และ 50 (v/v) (100 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้งยาเขียวต่อมิลลิตรของตัวทำละลาย) ที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman NO. 4) จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนออก นำส่วนใสมากรองผ่านหัวกรองปราศจากเชื้อขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร เก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำสารสกัดมาใช้

2. การทดสอบความไวของแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำต่อสารสกัดหยาบจากยาเขียวสองตำรับ โดยวิธี agar well diffusion

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมี 3 เชื้อ ดังนี้ *A. hydrophila* (TISTR 1321), *V. harveyi* (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) และ *V. parahaemolyticus* (TISTR 1596) เชื้อแบคทีเรียถูกเลี้ยงในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) ที่มี NaCl ร้อยละ 1.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียให้มีความขุ่นเท่ากับ ความขุ่นของสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 0.5 นำเชื้อไปป้ายลงบนอาหารแข็ง LB ที่มี NaCl ร้อยละ 1.5 ใช้ cock borer (No. 4) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเจาะลงบนอาหารแข็ง LB แล้วใส่สารสกัดหยาบยาเขียวลงในหลุมปริมาตร 150 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่มีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ (ดัดแปลงจาก: Panchan et al., 2010)

3. การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

การทดสอบหาค่า MIC สารสกัดหยาบยาเขียว โดยใช้วิธี micro dilution ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Nanasombat & Teckchuen (2009) ทำโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB ที่มี NaCl ร้อยละ 1.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปรับความขุ่นของเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับความขุ่นของสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 0.5 (1.5×10^8 cell/ml) จากนั้น นำเชื้อมา 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารสกัดหยาบยาเขียว 60 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 120 ไมโครลิตรด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในงานทดลอง 96 หลุม โดยความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดหยาบยาเขียวจะเท่ากับ 1.56 – 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร โดยมีชุดควบคุมเป็น อาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อจุลินทรีย์ที่ปราศจากสารสกัด และตัวทำละลายของสารสกัดหยาบ จากนั้นนำงานหลุมไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง Microplate reader (Molecular Devices, USA) ที่ OD₆₅₀ โดยวิเคราะห์หาค่า MIC จากค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่อ่านค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับตัวควบคุมที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับการหาค่า MBC ใช้หลอดเชื้อจุ่มลงในแต่ละหลุมของงานหลุมทดสอบแล้วนำเพาะเชื้อลงบนอาหารแข็ง LB ที่มี NaCl ร้อยละ 1.5 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรีย ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบยาเขียวที่ไม่มีแบคทีเรียเจริญจะเป็นค่า MBC ทำการทดลองทั้งหมดสามซ้ำ

4. การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

การศึกษาความสามารถในการกำจัดสารต้านอนุมูลอิสระโดยเตรียม DPPH ให้มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 550 ไมโครลิตร ผสมกับสารสกัดหยาบยาเขียวที่เจือจางความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 550 ไมโครลิตร โดยใช้ DPPH และเมทานอลเป็นตัวควบคุม เตรียมกรดวิตามินซี (ascorbic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) เพื่อเป็นสารที่ใช้เปรียบเทียบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₅₁₇ โดยใช้เมทานอลเป็น blank รายงานผลเป็นร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) คำนวณได้จากสูตรดังนี้ (ดัดแปลงจาก Nanasombat & Teckchuen, 2009, Garcia et al., 2012)

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}}{\text{OD}_{\text{control}}} \times 100$$

โดย OD_{control} คือ ค่า OD ของ DPPH และ OD_{sample} คือ ค่า OD ของ DPPH ผสมสารสกัดหยาบยาเขียว

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลผลการทดสอบสารสกัดหยาบยาเขียวต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรครังมาเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA และ Tukey's test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ผลการวิจัย

1. ผลการทดสอบความไวของแบคทีเรียก่อโรครังต่อสารสกัดหยาบจากยาเขียว โดยวิธี agar well diffusion

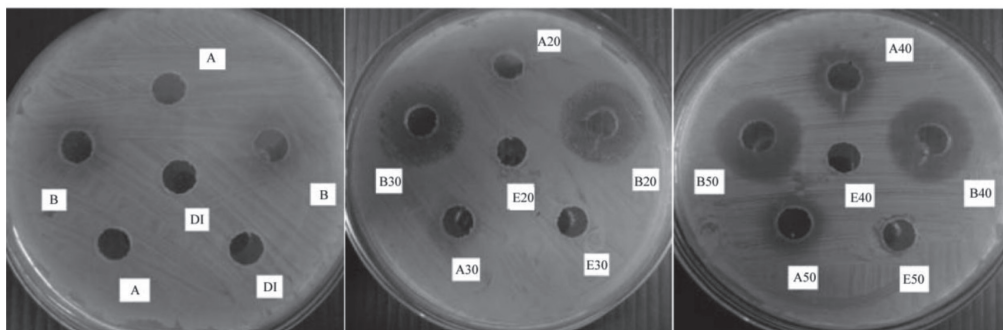
จากการสกัดหยาบตำรับยาเขียว 2 ตำรับ โดยนำยาเขียวมาสกัดโดยน้ำปราศจากไอออนและเอทานอลเจือจางร้อยละ 20, 30, 40 และ 50 สารสกัดหยาบจะมีลักษณะใส มีสีน้ำตาล ความเข้มข้นของสีขึ้นอยู่กับชนิดของยาเขียว โดยยาเขียวตำรับที่ 2 จะมีสีน้ำตาลเข้มกว่ายาเขียวตำรับที่ 1 จากการทดสอบโดยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดหยาบยาเขียวตำรับที่ 2 สกัดโดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นตัวทำละลาย สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila*, *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ได้ดีที่สุด โดยจะให้ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งขนาด 26.00 ± 3.60 , 26.67 ± 1.15 และ 24.17 ± 1.04 มิลลิเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยาเขียวตำรับที่ 2 ที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20, 30 และ 40 เป็นตัวทำละลายก็ให้ผลยับยั้งเชื้อทั้งสามเชื้อได้ดีเช่นกัน ส่วนยาเขียวตำรับที่ 1 ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งสามเชื้อเฉพาะที่สกัดโดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นตัวทำละลายแต่มีผลการยับยั้งเชื่อน้อยกว่ายาเขียวตำรับที่ 2 และไม่พบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อของยาเขียวทั้งสองตำรับที่สกัดด้วย DI ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 1 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ tetracycline (30 ไมโครกรัม) ซึ่งเป็นยาในกลุ่มเดียวกันกับ oxytetracycline ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ให้ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งขนาด 31.33 ± 1.15 , 30.00 ± 0.00 และ 30.00 ± 0.00 ตามลำดับ (ภาพที่ 2) จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบยาเขียวตำรับที่ 2 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ได้ดีกว่ายาเขียวตำรับที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และให้ผลใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะที่นำมาใช้ทดสอบ

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบยาเขียวต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง

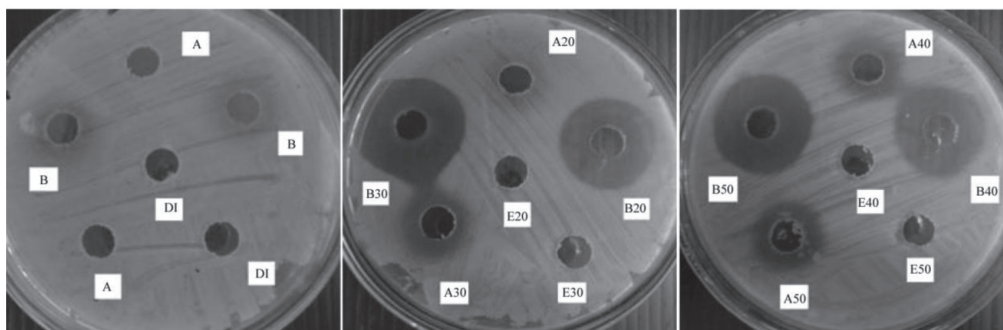
สารสกัดหยาบ	ตัวทำละลาย เอทานอลความ เข้มข้นร้อยละ	ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) $\pm$ SD		
		AH	VH	VP
ยาเขียวตำรับที่ 1	0 (DI)	8.00 $\pm$ 0.00 ^a	8.00 $\pm$ 0.00 ^a	8.00 $\pm$ 0.00 ^a
	20	8.00 $\pm$ 0.00 ^a	13.33 $\pm$ 5.50 ^b	8.00 $\pm$ 0.00 ^a
	30	8.00 $\pm$ 0.00 ^a	17.33 $\pm$ 2.51 ^b	8.00 $\pm$ 0.00 ^a
	40	15.67 $\pm$ 1.15 ^b	17.23 $\pm$ 2.25 ^b	8.00 $\pm$ 0.00 ^a
	50	17.17 $\pm$ 1.75 ^b	18.50 $\pm$ 1.32 ^b	15.00 $\pm$ 0.00 ^b
ยาเขียวตำรับที่ 2	0 (DI)	8.00 $\pm$ 0.00 ^a	8.00 $\pm$ 0.00 ^a	8.00 $\pm$ 0.00 ^a
	20	23.17 $\pm$ 1.04 ^c	24.00 $\pm$ 1.73 ^c	21.67 $\pm$ 3.05 ^{cd}
	30	24.33 $\pm$ 1.25 ^c	27.00 $\pm$ 1.73 ^c	21.33 $\pm$ 3.21 ^{cd}
	40	23.33 $\pm$ 1.52 ^c	24.33 $\pm$ 1.15 ^c	20.00 $\pm$ 0.00 ^c
	50	26.00 $\pm$ 3.60 ^c	26.67 $\pm$ 1.15 ^c	24.17 $\pm$ 1.04 ^d
ตัวทำละลาย (ชุดควบคุม)	0 (DI)	8.00 $\pm$ 0.00 ^a	8.00 $\pm$ 0.00 ^a	8.00 $\pm$ 0.00 ^a
	20	8.00 $\pm$ 0.00 ^a	8.00 $\pm$ 0.00 ^a	8.00 $\pm$ 0.00 ^a
	30	8.00 $\pm$ 0.00 ^a	8.00 $\pm$ 0.00 ^a	8.00 $\pm$ 0.00 ^a
	40	8.00 $\pm$ 0.00 ^a	8.00 $\pm$ 0.00 ^a	8.00 $\pm$ 0.00 ^a
	50	8.00 $\pm$ 0.00 ^a	8.00 $\pm$ 0.00 ^a	8.00 $\pm$ 0.00 ^a

หมายเหตุ อักษร a, b, c, d ที่แสดงในแนวดิ่งหมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยขนาดบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยสารสกัดหยาบยาเขียวและตัวทำละลาย (AH ; *A. hydrophila*, VH; *V. harveyi* , VP; *V. parahaemolyticus*)

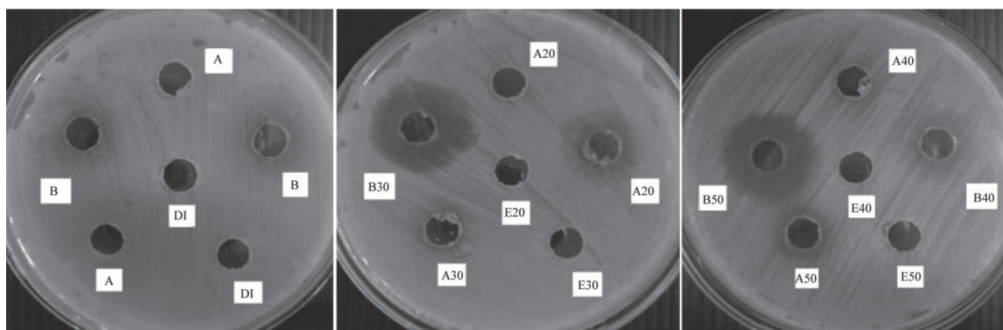
ก.) *A. hydrophila*



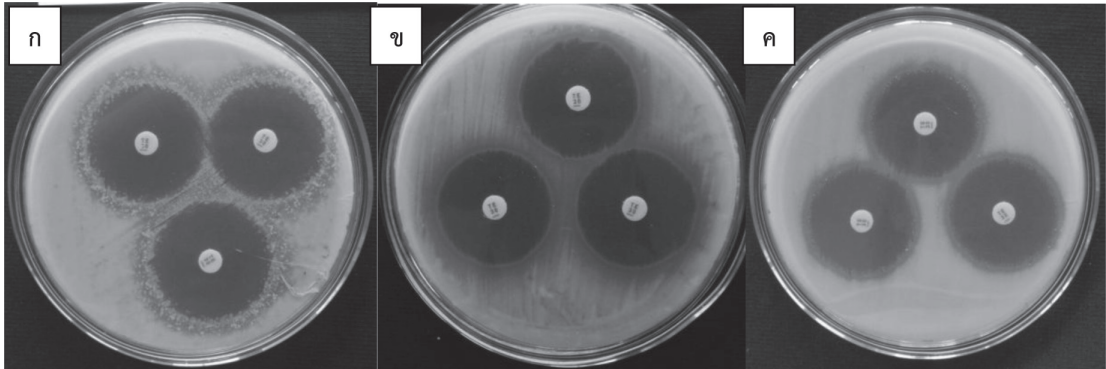
ข.) *V. harveyi*



ค.) *V. parahaemolyticus*



ภาพที่ 1 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ ก) *A. hydrophila* ข.) *V. harveyi* และ ค.) *V. parahaemolyticus* โดยสารสกัดหยาบยาเขียวที่สกัดโดยน้ำปราศจากไอออนและเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ ตำรับที่ 1(A) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 (A20), 30 (A30), 40 (A40) และ 50 (A50) ตำรับที่ 2 (B) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 (B20), 30 (B30), 40 (B40) และ 50 (B50) โดยมีตัวควบคุมตัวทำลายเอทานอล (E) ความเข้มข้นร้อยละ 20 (E20), 30 (E30), 40 (E40), 50 (E50) และตัวควบคุมน้ำปราศจากไอออน (DI)



ภาพที่ 2 การยับยั้งการเจริญของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ tetracycline (30 ไมโครกรัม)

ก) *A. hydrophila* ข.) *V. harveyi* และ ค.) *V. parahaemolyticus*

2. ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบยาเขียวตำรับที่ 2 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคกุ้งได้ (MIC) และผลการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคกุ้งได้ (MBC)

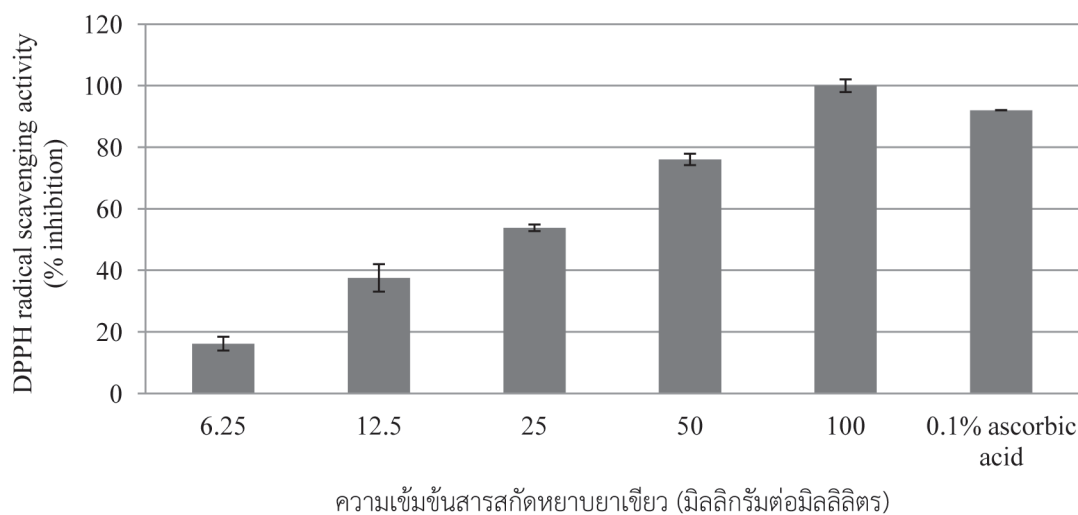
จากผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดยาเขียวตำรับที่ 2 มีฤทธิ์ดีกว่า จึงทำการศึกษาค้นหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดยาเขียวตำรับที่ 2 ที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 ต่อเชื้อ *A. hydrophila*, *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี micro dilution plate ผลการทดสอบพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ชนิดหรือค่า MIC เท่ากันคือ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC มีค่าเท่ากับ 25.00, 12.50 และ 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *A. hydrophila*, *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบยาเขียวตำรับที่ 2 ที่สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง

จุลินทรีย์	ความเข้มข้นสารสกัดหยาบยาเขียว (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	MIC	MBC
<i>Aeromonas hydrophila</i>	6.25	25.00
<i>Vibrio harveyi</i>	6.25	12.50
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	6.25	12.50

3. ผลการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging activity ของสารสกัดหยาบยาเขียวตำรับที่ 2

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยสารสกัดหยาบยาเขียวตำรับที่ 2 ที่สกัดโดยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดระหว่าง 6.25–100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดหยาบยาเขียวความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ถึงร้อยละ 100 เมื่อเทียบกับวิตามินซี (ascorbic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลบวกที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 92.05 รองลงมาคือสารสกัดหยาบยาเขียวตำรับที่ 2 ความเข้มข้น 50, 25, 12.5 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัด 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยังคงสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้มากกว่าร้อยละ 50 ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบยาเขียวตำรับที่ 2

สรุปผลและอภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบยาเขียวทั้งสองตำรับที่เป็นที่นิยมในท้องตลาดใช้เป็นยาลดไข้ แก้อ่อนใน พิษอัสคูลีไฮ และพิษหัด โดยยังไม่มีหลักฐานหรือข้อมูลทางการแพทย์และทางวิทยาศาสตร์ยืนยัน ในฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งการต้านไวรัสหรือต้านแบคทีเรีย เบื้องต้นพบว่ามิเกลตรกรบางกลุ่มได้นำยาเขียวมา ประยุกต์ใช้โดยการผสมอาหารในการเลี้ยงกุ้งและพบว่ามิเกลตรทำให้การติดเชื้อในกุ้งลดน้อยลงแต่ยังไม่มี รายงานหรือหลักฐานทางวิทยาศาสตร์รับรอง เพราะส่วนใหญ่มีการใช้ยาเขียวในคนไม่ได้ใช้ในสัตว์ (Lamuneplang, 2006) จากภูมิปัญญาชาวบ้านนี้ได้ผลสอดคล้องกับผลการวิจัยครั้งนี้ จากการทดลองโดย นำยาเขียวทั้งสองชนิดมาสกัดด้วยน้ำปราศจากไอออนและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20-50 เพราะหาก ต่อไปในอนาคตมีการนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงความเป็นพิษของตัวทำลายที่สูงเกินไปอาจจะส่งผลต่อกุ้งได้ จากผลการทดลองการใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นตัวทำลายที่ดีเพราะยาเขียวทั้งสองตำรับ ให้ค่าการยับยั้งเชื้อมากกว่าการใช้เอทานอลความเข้มข้นอื่นหรือการใช้น้ำเป็นตัวทำลาย แต่เมื่อเปรียบ เทียบสารสกัดหยาบยาเขียวทั้งสองตำรับที่สกัดโดยใช้ตัวทำลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 พบว่า ยาเขียวตำรับที่สองให้ผลการยับยั้งและฆ่าเชื้อได้ดีกว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila*, *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ได้ดีที่สุดโดยให้บริเวณการยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 26.00 ± 3.60 , 26.67 ± 1.15 และ 24.17 ± 1.04 มิลลิเมตร ตามลำดับ และมีค่า MIC เท่ากันคือ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MBC เท่ากับ 25, 12.5 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับยา ปฏิชีวนะ tetracycline ซึ่งให้ค่าบริเวณยับยั้งขนาดระหว่าง 30-31 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบ ยาเขียวมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะอาจจะใช้เป็นสารชีวภาพทดแทนยาปฏิชีวนะได้ในอนาคต นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบยาเขียวสามารถยับยั้งสารอนุมูลอิสระได้ถึงร้อยละ 100 ที่สารสกัดความ เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับกรดวิตามินซี (ascorbic acid) ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระใน ธรรมชาติ และที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบยาเขียว 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยังคงมีประสิทธิภาพใน การยับยั้งอนุมูลอิสระได้มากกว่าร้อยละ 50 จากรายงานก่อนหน้าพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระสามารถช่วย กำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์ ส่งผลต่อการอยู่รอดของเซลล์มากขึ้นในภาวะปกติของกุ้ง และจะช่วย กำจัดอนุมูลอิสระของกุ้งที่สร้างขึ้นในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกระบวนการเกิด phagocytosis ให้กลับมามีอยู่ในภาวะปกติและไม่ทำลายเซลล์ของกุ้งเอง (Bachère, 2000; Dandapat et al., 2003) ทั้งยัง พบว่าการนำสมุนไพรผสมในอาหารหรือฉีดให้กับสัตว์น้ำยังส่งผลกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำได้ (Chitmanat, 2013) จากผลการทดลองสารสกัดหยาบยาเขียวสองตำรับให้ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ที่แตกต่างกันอาจเกิดจากส่วนประกอบของยาเขียวทั้งสองตำรับมีความแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณของ สมุนไพรที่เป็นองค์ประกอบหลัก โดยยาเขียวตำรับที่ 1 มีองค์ประกอบหลัก ได้แก่ ใบพิมเสน จันทน์เทศ ใบสันพร้าวหอม พืชนาสน และสมุนไพรอื่นๆ ส่วนยาเขียวตำรับที่ 2 มีองค์ประกอบหลัก ได้แก่ ใบพิมเสน จันทน์แดง รากระย่อม ใบพรหมมิ จันทน์หอม และสมุนไพรอื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบสมุนไพรที่เป็นองค์ประกอบ หลักของยาเขียวตำรับที่ 1 และ 2 พบว่ามีองค์ประกอบหลักที่ต่างกันยกเว้นใบพิมเสน จากรายงานก่อนหน้า

ถึงฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ในใบพิมเสนพบว่าสารสกัดใบพิมเสนสดมีฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยสารสกัดจากใบพิมเสนสดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้มีประสิทธิภาพมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก และพบสารสำคัญหลายชนิดในพิมเสนที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ เช่น β -sitosterol, stigmasterol และ 7,3',4-tri-O-methylriodictyol เป็นต้น (Chakrapani et al., 2013; Senthilkumar et al., 2010) มีรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดจากจันทน์เทศมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Vibrio* spp. (Sivaram et al., 2004) รากระย่อมเป็นสมุนไพรที่ประกอบด้วยสารพฤษเคมีหลายชนิด เช่น alkaloids, flavonoids, phenols, saponins sterols, tannins และ terpenes เป็นต้น สารเหล่านี้ออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ด้านสารอนุพลีอิสระและด้านเซลล์มะเร็ง (Kumari et al., 2013) โดยพบว่าสารสกัดรากระย่อมมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในคนประเภทแกรมลบได้ดีกว่าแกรมบวก (Negi et al., 2014) ในใบพรมมีมีสารสำคัญชื่อว่า Bacoside-A ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบที่ก่อโรคในคน (Rajashekharappa et al., 2009) นอกจากนี้มีรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดจากจันทน์หอมก็มีสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบเช่นกัน (Butkhup & Samappito, 2011) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าส่วนประกอบของตำรับยาเขียวบางชนิดมีสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยเฉพาะสมุนไพรที่เป็นองค์ประกอบหลักของตำรับที่ 2 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดี อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อแยกหาสารสำคัญจากองค์ประกอบของยาเขียวที่ออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ สารต้านอนุมูลอิสระ และสารที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งซึ่งอาจจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะและพัฒนาเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์น้ำต่อไปในอนาคตได้

References

- Bachère, E. (2000). Shrimp Immunity and Disease Control. *Aquaculture*, 191 (1–3), 3-11.
- Brudeseth, B. E., Wiulsdod, R., Fredriksen, B. N., Lindmo, K., Lokling, K. E., Bordevik, M., Steine, N., Klevan, A., & Gravningen, K. (2013). Status and Future Perspectives of Vaccines for Industrialised Fin-Fish Farming. *Fish and Shellfish Immunology*, 35 (6), 1759-1768.
- Butkhup, L., & Samappito, S. (2011). In vitro Free Radical Scavenging and Antimicrobial Activity of Some Selected Thai Medicinal Plants. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5 (3), 254-265.

- Chakrapani, P., Venkatesh, K., Chandra Sekhar Singh, B., Arun Jyoth, B., Kumar, P., Amareshwari, P., & Roja Rani, A. (2013). Phytochemical, Pharmacological Importance of Patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth) an Aromatic Medicinal plant. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review & Research*, 21 (2), 7-15.
- Chitmanat, C. (2013). Effects of Herbal Products on Fish Immunity. *KKU Research Journal*, 18 (2), 257-269. (in Thai).
- Citarasu, T. (2012). Natural Antimicrobial Compounds for Use in Aquaculture. In B. Austin (Ed.), *Infectious Disease in Aquaculture* (pp. 419-456): Woodhead Publishing.
- Citarasu, T., Sivaram, V., Immanuel, G., Rout, N., & Murugan, V. (2006). Influence of Selected Indian Immunostimulant Herbs Against *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) Infection in Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon* with Reference to Haematological, Biochemical and Immunological Changes. *Fish and Shellfish Immunology*, 21 (4), 372-384.
- Dandapat, J., Chainy, G. B. N., & Janardhana Rao, K. (2003). Lipid Peroxidation and Antioxidant Defence Status During Larval Development and Metamorphosis of Giant Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 135 (3), 221-233.
- Direkbusarakom, S., Rungkomneradwong, S., Herunsalee, A., & Rungpan, L. (1996). *Screening of Thai Traditional Herbs Against Shrimp Pathogenic Bacteria*. (7/1996). National Institute of Coastal Aquaculture. (in Thai).
- Garcia, E. J., Oldoni, T. L., Alencar, S. M., Reis, A., Loguercio, A. D., & Grande, R. H. (2012). Antioxidant Activity By DPPH Assay of Potential Solutions to be Applied on Bleached Teeth. *Brazilian Dental Journal*, 23 (1), 22-27.
- Holmström, K., Gräslund, S., Wahlström, A., Pongshompoo, S., Bengtsson, B.-E., & Kautsky, N. (2003). Antibiotic use in Shrimp Farming and Implications for Environmental Impacts and Human Health. *International Journal of Food Science & Technology*, 38 (3), 255-266.

- Kulkarni, A., Rombout, J. H., Singh, I. S., Sudheer, N. S., Vlak, J. M., Caipang, C. M., Brinchmann, M. F., & Kiron, V. (2013). Truncated VP28 as Oral Vaccine Candidate Against WSSV Infection in Shrimp: An Uptake and Processing Study in The Midgut of *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology*, 34 (1), 159-166.
- Kumari, R., Rathi, B., Rani, A., & Bhatnagar, S. (2013). *Rauvolfia serpentina* L. Benth. ex Kurz.: Phytochemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 23 (2), 348-355.
- Lamuneplang, A. (2006). *School of Biological Shrimp*. Retrieved May 20, 2015 from <https://www.gotoknow.org/posts/1461>. (in Thai).
- Mohammed, H., Olivares-Fuster, O., LaFrentz, S., & Arias, C. R. (2013). New Attenuated Vaccine Against Columnaris Disease in Fish: Choosing The Right Parental Strain Is Critical for Vaccine Efficacy. *Vaccine*, 31 (45), 5276-5280.
- Nanasombat, S., & Teckchuen, N. (2009). Antimicrobial, Antioxidant and Anticancer Activities of Thai Local Vegetables. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3 (5), 443-449.
- National Drug Committee. (2006). List of Herbal Medicinal Products A.D. 2006. According to the Announcement of the National Drug Committee. Issue 5. (in Thai).
- Negi, J. S., Bisht, V. K., Bhandari, A. K., Bisht, D. S., Singh, P., & Singh, N. (2014). Quantification of Reserpine Content and Antibacterial Activity of *Rauvolfia Serpentina* (L.) Benth. ex Kurz. *African Journal of Microbiology Research*, 8 (2), 162-166.
- Panchan, R., Sirisorn, P., & Phaprom, S. (2010). *In vitro Antibacterial Activities of Crude Extract From Garlic Against Aeromonas hydrophila Isolated From Hybrid Catfish*. Paper presented at the Proceedings of 48th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries, Bangkok. (in Thai).
- Powell, A., Pope, E. C., Eddy, F. E., Roberts, E. C., Shields, R. J., Francis, M. J., Smith, P., Topps, S., Reid, J., & Rowley, A. F. (2011). Enhanced Immune Defences in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Post-Exposure To a Vibrio Vaccine. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107 (2), 95-99.

- Punitha, S. M. J., Babu, M. M., Sivaram, V., Shankar, V. S., Dhas, S. A., Mahesh, T. C., Immanuel, G., & Citarasu, T. (2008). Immunostimulating Influence of Herbal Biomedicines on Nonspecific Immunity in Grouper *Epinephelus Tauvina* Juvenile Against *Vibrio harveyi* Infection. *Aquaculture International*, 16 (6), 511-523.
- Rajashekharappa, S., Krishna, V., Sathyanarayana, B. N. & Gowdar, H. B. (2008). Antibacterial Activity of Bacoside-A- an Active Constituent Isolated of *Bacopa Monnieri* (L.) Wetttest. *Pharmacologyonline*, 2, 517-528.
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2010). Use of Herbs As Prophylactic and Therapeutic Agents in Fish. *Journal of Science & Technology, Ubon Ratchathani University*, 2 (4), 63-71. (in Thai).
- Senthilkumar, C. S., Suresh Kumar, M., & Rajasekara Pandian, M. (2010). In vitro Antibacterial Activity of Crude Leaf Extracts from *Tecoma Stans* (L) Juss. et Kunth, *Coleus forskohlii* and *Pogostemon Patchouli* Against Human Pathogenic Bacteria. *International Journal of PharmTech Research*, 2 (1), 438-442.
- Sivaram, V., Babu, M. M., Immanuel, G., Murugadass, S., Citarasu, T., & Marian, M. P. (2004). Growth and Immune Response of Juvenile Greasy Groupers (*Epinephelus tauvina*) Fed with Herbal Antibacterial Active Principle Supplemented Diets Against *Vibrio harveyi* Infections. *Aquaculture*, 237 (1-4), 9-20.
- Srijantuk, N. (2012). *The Situation in The Production and Export of Fishery Products of Thailand in 2012*. Retrieved December 15, 2014 from <http://fishco.fisheries.go.th/fisheconomic/Doc/news2.pdf>. (in Thai).
- Tummarongkongsatid, A., & Rojtinnakorn, J. (2007). Efficacy of Thai Herbs Extracts To Inhibit Bacterial Pathogens in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Journal of Fisheries Technology Research*, 1(2), 192-200. (in Thai).
- Velmurugan, S., Viji, V. T., Babu, M. M., Punitha, M. J., & Citarasu, T. (2012). Antimicrobial Effect of *Calotropis Procera* Active Principles Against Aquatic Microbial Pathogens Isolated from Shrimp and Fishes. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (2, Supplement), S812-S817.

คณะผู้เขียน

ดร. มลธิรา ศรีถาวร

อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140
e-mail: faasmtr@ku.ac.th

นางสาวอนุสรุา ทูยหุ่่น

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140
e-mail: anussara.tune@gmail.com

ดร. อรรวรรณ ชุณหชาติ

อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140
e-mail: faasowc@ku.ac.th

ดร. สุธิตเดช ปรีชารัมย์

อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140
e-mail: faasstd@ku.ac.th