View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Directory of Open Access Journals

นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของสมุนไพรไทยต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค การเจริญเติบโต สุขภาพ และความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ

กิจการ ศุภมาตย์ [1] นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ [2] มะลิ บุณยรัตผลิน [3] จรีพร เรืองศรี [4] ฐานันดร์ ทัตตานนท์ [5] และ ธนาวุฒิ กล่าวเกลี้ยง [6]

Abstract

Supamattaya, K.[1], Suntorncharoennon, N.[2], Boonyaratpalin, M.[3], Ruangsri, J.[1], Tattanon, T.[4], and Klowkliang, T.[5]

Effects of Thai medicinal plants on pathogenic bacterial, growth performance, health condition and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius)

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(Suppl. 1): 55-70

Chemical analysis of turmeric (*Curcuma longa*) extracts using TLC/densitometry, showed an extract contain 21.57%w/w of three important curcuminoids: curcumin, desmethoxycurcumin and bisdesmethoxy-curcumin. GC and MS were used to analyze volatile oils. Aromatic turmerone, α-turmerone and zingiberene

[1]Aquatic Animal Health Research Center, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, [2]Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University Sri-ayudhaya Road, Ratchathewi, Bangkok 10400, [3]Department of Fisheries, Kaset Klang, Bangkhen, Chatuchak, Bangkok 10900 , [4]Songkhla Coastal Fisheries Research and Development Institute, Department of Fisheries, Muang, Songkhla 90000, [5]Satun Coastal Fisheries Research and Development Center, Department of Fisheries, La-ngu, Satun 91110, Thailand.

[1]Dr. rer. nat. (Aquatic Animal Disease) รองศาสตราจารย์ [4]วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) นักวิชาการประมง ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112 [2]Ph.D. (Phamarcology) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ราชเทวี กรุงเทพฯ 10400 [3]Ph.D. (Fish Nutrition) ผู้เชี่ยวชาญพิเศษด้านอาหารสัตว์น้ำ สำนักวิชาการ กรมประมง เกษตรกลาง บางเขน เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 [5]วท.บ. (ประมง) นักวิชาการประมง สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 94000 [6]วท.บ. (วาริชศาสตร์) นักวิชาการประมง ศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์น้ำชายฝั่งสตูล อำเภอละงู จังหวัดสตูล 91110
Corresponding e-mail : kidchakan.s@psu.ac.th
รับต้นฉบับ 27 กรกฎาคม 2547 รับลงพิมพ์ 20 กันยายน 2547

were also obtained. Qualitative and quantitative analyses alcoholic extract of *Andrographis paniculata* using TLC, revealed that the extracts contain three important compounds in total lactone of 30.49% w/w. There are andrographolide,14-deoxy-11-12-didehydroandrographolide and neoandrographolide. TLC-chromatogram of *Clinacanthus nutans* extract after reacted with anisaldehyde/sulfuric acid showed a 9 key compounds, while preliminary neutralization test of the compounds revealed that there were active compounds against HSV-1 virus.

***In vitro* efficacy test revealed that *Curcuma longa* and *Andrographis paniculata* extracts at 250 and 1,500 mg/L could eradicate 15 isolates of *Vibrio* spp. which were isolated from infected shrimps. Effects of medicinal plant extracts incorporated into the diet on shrimp immune responses were investigated. Shrimp fed diet containing *Clinacanthus nutans* extract at 20 mg/kg of diet had good growth, FCR and immune responses. The shrimp that were fed diet containing *Curcuma longa* extracts at 25 mg/kg of diet for 7-14 days showed high resistance to *Vibrio harveyi*. Likewise, the shrimp fed *Andrographis paniculata* extract at 25 mg/kg of diet for 14 days had a higher resistance to WSSV. Incorporating the medicinal extracts at higher levels resulted in reduction in diet palatability which consequently had an effect on a decrease in growth, immune responses and resistance to bacterial and WSSV infection.**

Key words : Thai medicinal plants, growth, survival, health condition, white spot syndrome virus (wssv), *Penaeus monodon*

บทคัดย่อ

กิจการ ศุภมาตย์ นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ มะลิ บุณยรัตผลิน จรีพร เรืองศรี ฐานันดร์ ทัตตานนท์ และ ธนาวุฒิ กล่าวเกลี้ยง

ผลของสมุนไพรไทยต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค การเจริญเติบโต สุขภาพ และความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ

ว.สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(ฉบับพิเศษ 1): 55-70

การวิเคราะห์ทางเคมีของสารสกัดขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) โดยวิธี TLC/densitometry พบสารสำคัญในกลุ่ม curcuminoid 3 ชนิดคือ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin รวม 21.57% w/w วิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยโดยวิธี GC และ MS พบน้ำมันระเหยหลายชนิด เช่น aromatic turmerone, α-turmerone, zingiberene ผลวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณสารสกัดแอลกอฮอล์ฟ้าทะลายโจร (*Andographis paniculata*) โดยใช้วิธี TLC พบสารสกัดฟ้าทะลายโจรมีสารสำคัญกลุ่ม total lactone 3 ชนิดคือ andrographolide, 14-deoxy-11-12-didehydroandrographolide และ neoandrographolide คิดเป็น 30.49% w/w จาก TLC-chromatogram ของสารสกัดพญาปล้องทองหลังทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde/sulfuric acid พบสารประกอบ 9 ชนิด ขณะที่การทดสอบปฏิกิริยาการลบล้างฤทธิ์เชื้อไวรัสของสารสกัดเบื้องต้นพบให้ผลยับยั้งเชื้อ HSV-1

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อก่อโรคกุ้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรเข้มข้น 250 และ 1,500 มก./ลิตร ยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp. 15 ไอโซเลตได้ การศึกษาผลของสมุนไพรในอาหารต่อภูมิคุ้มกันกุ้งกุลาดำ พบสารสกัดพญาปล้องทอง 20 มก./กก. ทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันดี และพบกุ้งที่ได้รับอาหารผสมขมิ้นชันไม่เกิน 25 มก./กก. 7- 14 วัน สามารถต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้มากขึ้น ขณะที่กุ้งชุดที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรในระดับ 25 มก./กก. นาน 14 วัน มีความต้านทานต่อเชื้อ WSSV สูงขึ้น ผลการทดลองพบการผสมสารสกัดสมุนไพรในอาหารระดับที่สูงเกินไปทำให้กุ้งมีความอยากอาหารลดลง ส่งผลให้การเจริญเติบโตการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน และความสามารถในการต้านทานต่อโรคติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส WSSV ลดลง

จากการที่ประเทศคู่ค้ากุ้งของไทยเพิ่มความเข้มงวดของข้อกำหนดการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะในกุ้งกุลาดำ ประกอบกับราคาของกุ้งลดลงอย่างต่อเนื่อง ปัจจุบันเกษตรกรจึงหันมาใช้สมุนไพรในการเลี้ยงกุ้งมากขึ้นเพื่อลดต้นทุน ลดปัญหาสารตกค้างในกุ้งกุลาดำ แต่การนำสมุนไพรมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำยังขาดข้อมูลทางด้านวิทยาศาสตร์สนับสนุนในเรื่องของประสิทธิภาพ ความปลอดภัย และการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรให้คงที่ ทั้งคุณภาพของสมุนไพรที่เป็นวัตถุดิบหรือปริมาณสารสำคัญ เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการนำสมุนไพรมาใช้ การวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ฟ้าทะลายโจร (*Andographis paniculata*) และพญาปล้องทอง (*Clinacanthus nutans*) ต่อเชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลอง ผลต่อการเจริญเติบโต อัตรารอด การตอบสนองภูมิคุ้มกัน ความสามารถในการต้านทานโรคของกุ้งกุลาดำ โดยใช้สมุนไพรในรูปของสารสกัด เพื่อลดปัญหาการเน่าเสียของน้ำ และง่ายต่อการควบคุมปริมาณการใช้ เพื่อประโยชน์ในการป้องกันและต้านทานการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำ ลดต้นทุนการผลิตในส่วนที่ต้องใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมี อีกทั้งยังลดปัญหาการกีดกันทางการค้าเนื่องจากผลการตกค้างของยาต้องห้ามในกุ้งกุลาดำแช่แข็งที่ส่งขายต่างประเทศ และเพื่อให้การเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นอาชีพที่ยั่งยืนให้ผลตอบแทนสูงคู่เกษตรกรไทยต่อไป

วิธีการทดลอง

1. การสกัด วิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของสมุนไพร

นำสมุนไพร 3 ชนิดได้แก่ เหง้าขมิ้นชัน ใบและดอกฟ้าทะลายโจร และใบพญาปล้องทองที่พิสูจน์ชนิดโดยเทียบจาก Thai Herbal Pharmacopoeia (1995) หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ อบจนแห้งที่อุณหภูมิ 50°C บดให้ละเอียด นำไปสกัดด้วยแอลกอฮอล์ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Thai Herbal Pharmacopoeia (1995) โดยหมักผงขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรด้วยแอลกอฮอล์ 95% หมักผงใบพญาปล้องทองด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 1 สัปดาห์ แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง หลังจากนั้นจึงหมักกากสมุนไพรซ้ำ 2-3 ครั้ง จนกว่าได้สารสกัดครั้งสุดท้ายใส และระเหยตัวทำละลายในสารสกัดโดยใช้เครื่อง rotary evaporator (Aspirator A-35, EYELA, rotary vacuum evaporator N-N series) ที่อุณหภูมิ 60°C เก็บสารสกัดของสมุนไพรแต่ละชนิดในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4°C แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพในสารสกัดแอลกอฮอล์ขมิ้นชันด้วยวิธี Thin layer chromatography/densitometry (TLC/densitometry) โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (silica gel GF_{254}) ใช้ n-hexane : chloroform : 95% ethanol อัตราส่วน 41:49:10 เป็น solvent system และส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร หาชนิดและปริมาณน้ำมันหอมระเหยด้วย Gas chromatography (GC) ร่วมกับ Mass spectroscopy (MS) วิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารสำคัญในฟ้าทะลายโจรและพญาปล้องทองด้วยวิธี TLC โดยใช้ตัวดูดซับชนิดเดียวกันคือซิลิกาเจล (silica gel GF_{254}) แต่ใช้ solvent system ต่างกันคือ $CHCl_3$: 95% ethanol อัตราส่วน 85:15 สำหรับสารสกัดฟ้าทะลายโจร และใช้ $CHCl_3$: methanol อัตราส่วน 9 : 1 สำหรับสกัดสารพญาปล้องทอง และตรวจสอบผลของสารสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่นเดียวกับการวิเคราะห์สารสกัดจากขมิ้นชัน ส่วนสารสกัดพญาปล้องทองตรวจสอบโดยการทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde/sulfuric acid และส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

2. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ HSV-1

ทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ HSV-1 ของสารสกัดพญาปล้องทองโดยเตรียมสารสกัดแอลกอฮอล์พญาปล้องทองให้มีความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-100 มก./ลิตร เตรียมเซลล์ไลน์ (Ela-cell) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ α-MEM ที่เติม fetal bovine serum (FBS) 10% ในถาด micro-well ชนิด 96 หลุม และบ่มไว้ในตู้ควบคุมปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลายเชื้อไวรัส HSV-1 ให้มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ MOI 0.1 แล้วนำสารละลายสารสกัดพญาปล้องทองที่เตรียมไว้มาเติมในลงเซลล์ไลน์เพาะเลี้ยงให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลุม 0 5 10 20 30 40 และ 50 ไมโครกรัม/มล. ความเข้มข้นละ 8 หลุม นำถาดมาปิดทับด้วยแผ่นพลาสติก แล้วบ่มเพาะในตู้ควบคุม

ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C ตรวจสอบความสามารถในการเข้าทำลายเซลล์ของเชื้อ HSV-1 และคำนวณความเข้มข้นของสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสได้ 50% ($TCID_{50}$) ในระยะเวลา 14 วัน โดยใช้สูตรที่รายงานใน Reed และ Muench (1938)

3. การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ *Vibrio* spp. ในหลอดทดลอง (*in vitro*)

3.1 การเตรียมสารละลายสารสกัดสมุนไพร

สมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพต่อเชื้อแบคทีเรียเป็นสารสกัดสมุนไพรที่ได้ทำการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณสารสำคัญแล้ว โดยคิดปริมาณสารออกฤทธิ์จากสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชันเป็น 21.57% ฟ้าทะลายโจรเป็น 30.49% และพญาปล้องทองคิดสารออกฤทธิ์เป็น 100% นำสารสกัดมาเตรียมเป็นสารละลายโดยใช้ตัวทำละลาย tri-ethylene glycol (การทดสอบพบ tri-ethylene glycol เข้มข้น 10% ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลฆ่าเชื้อแบคทีเรีย) จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 50 มล. ด้วยสารละลายเกลือ 1.5% ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ต้องการ

3.2 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller Hinton (MH) เพื่อทดสอบเชื้อ *Vibrio* spp. 15 ไอโซเลต

เจือจางสารละลายขมิ้นชันจากสารละลายเริ่มต้น 5,000 มก./ลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MH ผสมเกลือ 1.5% ให้ระดับความเข้มข้นของสารสำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 0-172.56 มก./ลิตร

เจือจางฟ้าทะลายโจรและพญาปล้องทองจากสารละลายเริ่มต้น 50,000 มก./ลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน ให้มีความเข้มข้นของสารสำคัญอยู่ในช่วง 0-10,000 มก./ลิตร

3.3 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรในสารละลายเปปโตนเพื่อทดสอบเชื้อ *Vibrio* spp. 10 ไอโซเลต

เตรียมสารละลายโดยชั่งสารสกัดแอลกอฮอล์ขมิ้นชัน ฟ้าทะลายโจร และพญาปล้องทอง ละลายในตัวทำละลาย tri-ethylene glycol เช่นเดียวกับข้อ 3.1 และทำการเจือจางสารละลายขมิ้นชันจากสารละลายเริ่มต้น 10,000 มก./ลิตร ด้วยสารละลายเปปโตน 0.3% ผสมเกลือ 1.5% ให้ระดับความเข้มข้นของสารสำคัญในสารละลายอยู่ในช่วง 0-500 มก./ลิตร

เจือจางฟ้าทะลายโจรและพญาปล้องทองจากสารละลายเริ่มต้น 10,000 มก./ลิตร ในสารละลายเดียวกัน ให้มีความเข้มข้นของสารสำคัญอยู่ในช่วง 0-2,500 มก./ลิตร

3.4 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรในอาหารแข็งเพื่อทดสอบเชื้อ *Vibrio* spp. 10 ไอโซเลต

ทำการเตรียมสารละลายของสารสกัดสมุนไพร เช่นเดียวกับข้อ 3.1 และเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MH ที่มีความเข้มข้นลดลง 10 เท่าของสูตรอาหารปกติ แล้วเติมวุ้น 1.5% เกลือ 1.5% หลังอบฆ่าเชื้อแล้วนำมาแช่ไว้ในอ่างน้ำอุ่น 56°C ทำการผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เหมือนกับข้อ 3.3 ให้เข้ากันอย่างรวดเร็วแล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ให้แข็งตัว อบที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 คืน และนำมาทดสอบผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

3.5 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งกลาดำ

แยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* sp. หลายๆ ไอโซเลตจากกุ้งกุลาดำที่ป่วยเป็นโรค จากนั้นนำมาเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) ผสมเกลือ 1.5% เตรียมสารละลายเชื้อโดยขูดเชื้อซึ่งเลี้ยงบนอาหารแข็งนาน 15-18 ชั่วโมง ละลายในน้ำเกลือ 1.5% ในหลอดทดลองและเทียบความขุ่นของเชื้อให้ได้เท่ากับสารละลาย McFarland turbidity standard เบอร์ 0.5 (มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร อยู่ระหว่าง 0.08-0.10) ซึ่งสารละลายแบคทีเรียที่ได้นี้จะมีจำนวนเชื้อประมาณ 1×10^8 CFU/มล. เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.6 การทดสอบผลของสารสกัดแอลกอฮอล์ของสมุนไพรต่อเชื้อก่อโรคจากกุ้งกุลาดำในหลอดทดลอง (*in vitro*)

ดูดสารผสมอาหารเลี้ยงเชื้อและสมุนไพรความเข้มข้นต่างๆ ในข้อ 3.2 และ 3.3 ใส่หลอดทดลองหลอดละ 2 มล. ความเข้มข้นละ 3 หลอด และอาหารแข็งที่ผสมสมุนไพรความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งเตรียมไว้ในข้อ 3.4 ความเข้มข้นละ 3 จานนำมาขีดแบ่งเป็นส่วนๆ 10 ส่วน แล้วเขียนหมายเลขกำกับ นำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่เตรียมตามวิธีในข้อ 3.5 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของสารสกัดสมุนไพร เทียบกับชุดควบคุมที่

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมสารสกัดสมุนไพรตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Christofilogiannis (2000) และ Branson (2001)

4. การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเจริญเติบโตและการตอบสนองภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

4.1 การเตรียมอาหารทดลอง สภาวะการเลี้ยง และวัดการเจริญเติบโต

เตรียมอาหารทดลอง 7 สูตร ให้มีชนิดขององค์ประกอบอาหารตามรายละเอียดที่รายงานใน Boonyaratpalin และคณะ (2001) โดยอาหารมีปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า และเยื่อใยเป็น 39.96 10.72 8.88 และ 2.05% ตามลำดับ และมีพลังงานในอาหาร 406.19 กิโลจูล เท่ากันทุกสูตรแต่มีระดับของสารสำคัญในสมุนไพรแตกต่างกัน แต่ละสูตรตามรายละเอียดใน Table 1 ใช้อาหารทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาดตัวเริ่มต้นเฉลี่ย 0.5 กรัม สูตรละ 4 ซ้ำๆ ละ 20 ตัว ในตู้กระจกขนาด 250 ลิตร เติมน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ให้กุ้งกินอาหารจนอิ่มวันละ 4 มื้อ นาน 8 สัปดาห์ ดูดตะกอนออกจากตู้ทุกวัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำ 30-50% ทุก 2 วัน ทำการชั่งน้ำหนักตัวเฉลี่ยทุก 2 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองคำนวณหาน้ำหนักตัวเฉลี่ยสุดท้าย อัตรารอด อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ความต้องการอาหาร อัตราการกินอาหาร/ตัว/วัน เทียบกับกุ้งทดลองชุดควบคุมที่ให้อาหารไม่ผสมสมุนไพร

4.2 การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการตอบสนองภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

กุ้งจากชุดการทดลองในข้อ 4.1 เมื่อเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์ แบ่งออกเป็น 3 ส่วน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวมตามวิธีการที่ดัดแปลงจากกิจการและสิทธิ (2538) กิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสตามวิธีการที่รายงานใน กิจการ และคณะ (2543) ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของซีรัม และประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากตับและตับอ่อน และระบบทางเดินอาหารของกุ้งที่ได้รับอาหารผสมสมุนไพรและกุ้งที่ได้รับอาหารไม่ผสมสมุนไพรในหลอดทดลอง ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Martin และคณะ (1993) และ Straka และ Stokes (1957)

5. การศึกษาผลของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรในอาหารต่อการต้านทานเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในกุ้งกุลาดำ

เตรียมอาหารทดลองให้มีชนิดขององค์ประกอบอาหารเท่ากันทุกสูตร โดยใช้องค์ประกอบในอาหารกุ้งตามรายละเอียดที่ดัดแปลงจาก Boonyaratpalin และคณะ (2001) ยกเว้นปริมาณสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดที่เติมให้มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ต่างกันในแต่ละสูตรเป็น 0, 5, 25, 50 และ 100 มก./กก. เลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาด 4-6 กรัม ในถังไฟเบอร์ขนาด 3 ตัน เติมน้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน นำอาหารทดลองแต่ละสูตรให้กุ้งกินจนอิ่มวันละ 4 มื้อ เปลี่ยนถ่ายน้ำ 30-50% ทุก 2 วัน กุ้งทดลองหลังให้อาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันนาน 7 และ 14 วัน นำมาทดสอบการต้านทานต่อโรคโดยการแช่เชื้อ *V. harveyi* ส่วนกุ้งทดลองหลังให้อาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรนาน 7 และ 14 วัน นำมาทดสอบการต้านทานต่อโรคโดยการแช่เชื้อ *V. harveyi* และฉีดเชื้อไวรัส WSSV เลี้ยงกุ้งทดลองในตู้กระจกขนาดความจุ 250 ลิตร น้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ให้อาหารชุดควบคุม หลังแช่และฉีดเชื้อนาน 10 วัน ทำการคำนวณอัตรารอดตายของกุ้งทดลอง

Table 1. Concentration of extracts in feed given to black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).

Plants	Concentration of extracts in the feed (mg/kg)						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
(A) Turmeric	0	43.14	215.7	0	0	0	0
(B) *Clinacanthus*	0	0	0	20	100	0	0
(C) *Andrographis*	0	0	0	0	0	304.9	0
A:B:C	0	0	0	0	0	0	43.14:100:30.49

ผลการทดลอง

1. ผลการสกัด คุณภาพ และปริมาณสารสำคัญในสารสกัดสมุนไพร

ผลการทดลองสกัดสารจากสมุนไพรแห้งบดโดยวิธีหมัก (maceration) ด้วยแอลกอฮอล์ 70-95% พบว่าสามารถสกัดสารจากผงเหง้าขมิ้นชันได้ 14.42% w/w สกัดสารจากใบและดอกฟ้าทะลายโจรบดได้ 39.50% w/w สกัดสารจากใบพญาปล้องทองบดได้สารสกัด 9.33% w/w

การวิเคราะห์ทางเคมีพบสารสกัดแอลกอฮอล์ขมิ้นชันมีสารสำคัญกลุ่ม curcuminoids รวม 21.57% w/w ประกอบด้วยสารต่างๆ 3 ชนิดคือ curcumin 9.28% w/w desmethoxycurcumin 5.20% w/w และ bisdesmethoxycurcumin 6.94% w/w ตาม TLC chromatogram ใน Figure 1 และพบปริมาณน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ รวม 38.50% v/w (Table 2) โดยที่ปริมาณของสารกลุ่ม aromatic turmerone มีมากที่สุดคิดเป็น 51.11% w/v เมื่อเทียบกับสารกลุ่มอื่น

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพของสารสกัดฟ้าทะลายโจรพบสารสำคัญกลุ่ม total lactone 30.49% w/w โดยแยกเป็นสาร 3 ชนิดหลักคือ andrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide และ neoandrographolide ตาม TLC chromatogram ใน Figure 2 โดยมีปริมาณสาร 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide มากที่สุด (6.86% w/w) รองลงมาคือ สาร andrographolide (1.78% w/w) และสาร neoandrographolide (1.28 % w/w)

ผลการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีสารสกัดพญาปล้องทองพบแถบสารสำคัญในสารสกัดที่ให้ผลบวกหลังทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde/sulfuric acid จำนวน 7 แถบ และให้ผลบวกเมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร จำนวน 9 แถบ แต่ไม่สามารถระบุชนิดของสารที่พบได้เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน β-sitosterol (Figure 3)

2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพญาปล้องทองในการยับยั้งเชื้อ HSV-1

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพญาปล้องทองในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 โดยบ่มเชื้อไวรัสกับสารละลายสารสกัดพญาปล้องทองความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 14 วัน พบสารสกัดพญาปล้องทองเข้มข้น 29.29 ไมโครกรัม/มล. สามารถยับยั้งเชื้อ HSV-1 ได้ 50% ($TCID_{50}$)

3. ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ *Vibrio* spp. ในหลอดทดลอง (*in vitro*)

3.1 ผลของสารสกัดสมุนไพรในอาหารเลี้ยงเชื้อ MH ต่อเชื้อ *Vibrio* spp. 15 ไอโซเลต

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพร 3 ชนิด คือ ขมิ้นชัน ฟ้าทะลายโจร และพญาปล้องทอง โดยทำการเจือจางสมุนไพรในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MH และทดสอบการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *Vibrio* spp. 15 ไอโซเลต ด้วยวิธีการเจือจางในหลอดทดลองพบว่าขมิ้นชันที่ระดับความเข้มข้น 0-10.78 มก./ลิตร ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ ที่ระดับความเข้มข้นของสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชันเป็น 21.56-43.14 มก./ลิตร ฆ่าเชื้อ *Vibrio* spp. ได้ 3-5 ไอโซเลต (คิดเป็น 20-33.33%) ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 50-172.56 มก./ลิตร สามารถฆ่าเชื้อได้ 7 ไอโซเลต (คิดเป็น 46.67%) ฟ้าทะลายโจรในอาหารเหลว MH ที่ความเข้มข้น 0-1,200 มก./ลิตร ยับยั้งและฆ่าเชื้อได้ 3 ไอโซเลต (คิดเป็น 20%) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 2,500, 5,000 และ 10,000 มก./ลิตร ยับยั้งเชื้อกลุ่มวิบริโอได้ 40, 73.33 และ 100% ตามลำดับ การผสมสารสกัดพญาปล้องทองใน

Table 2. The volatile oils composition and its retention time (min) from turmeric (*Curcuma longa*) extract.

Compound	Retention time (min)
L-phellandrene	9.21
1,8-cineole	9.82
β-terpinolene	10.95
trans-caryophyllene	16.58
ar-curcumene	17.37
zingiberene	17.57
β-bisabolene	17.97
(+)-α-curcumene	18.98
ar-turmerone	19.94
α-turmerone	20.30

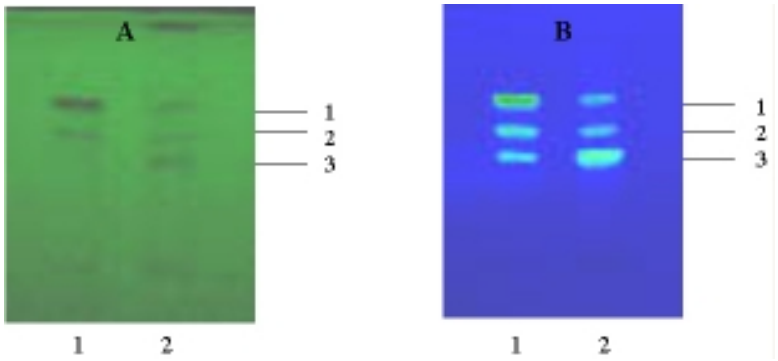

Figure 1. TLC chromatogram of turmeric (*Curcuma longa*) extract compare to curcumin; A = observed under UV light at 254 nm, B = observed under UV light at 366 nm, band 1 = curcumin, Rf value = 0.70; band 2 = desmethoxycurcumin, Rf value = 0.61; band 3 = bisdes-methoxycurcumin, Rf value = 0.50; lane 1 = curcumin; lane 2 = turmeric extract; Adsorbent = silica gel GF_{254}; Solvent system = n-hexane : chloroform : 95% ethanol = 41 : 49 : 10.

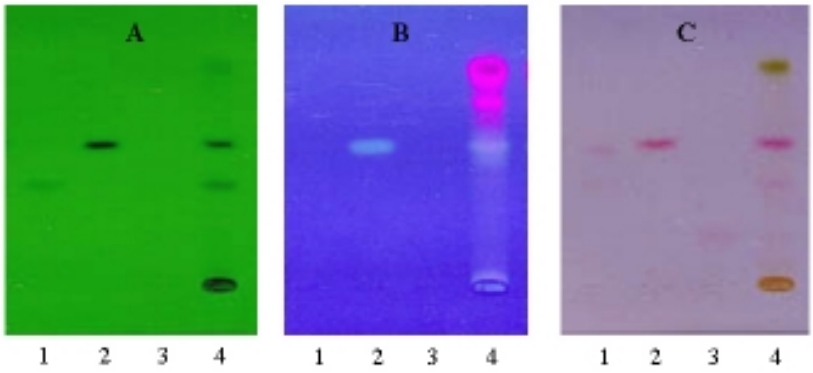

Figure 2. TLC chromatogram of *Andrographis*; A = observed under UV light at 254 nm, B = observed under UV light at 366 nm, C = after reacted with Kedde's reagent; lane 1 = andrographolide, lane 2 = 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, lane 3 = neoandrographolide, lane 4 = *Andrographis* extract; Adsorbent : silica gel GF_{254}; Solvent system : $CHCl_3$: 95%ethanol = 85:15.

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเดียวกันพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0-3,000 มก./ลิตร ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ ขณะที่ความเข้มข้น 6,000 และ 10,000 มก./ลิตร ยับยั้งเชื้อได้เพียง 20 และ 60% ตามลำดับ (Table 3)

3.2 ผลของสารสกัดสมุนไพรในสารละลายเปปโตนต่อเชื้อ *Vibrio* spp. 10 ไอโซเลต

เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรที่เจือจางในสารละลายเปปโตนต่อการยับยั้งเชื้อกลุ่ม *Vibrio* spp. 10 ไอโซเลต พบความเข้มข้นที่คิดจากปริมาณสารสำคัญของขมิ้นชันในสารละลายเปปโตน 25, 50, 100, 150 และ 200 มก./ลิตร ยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp. 10 ไอโซเลต ได้ 20, 30, 40, 60 และ 90% ตามลำดับ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 250-500 มก./ลิตร ยับยั้งเชื้อกลุ่มเดียวกันได้ 100% ความเข้มข้นที่คิดจากปริมาณสารสำคัญของฟ้าทะลายโจรในสารละลายเปปโตนเข้มข้น 500 และ 1,000 มก./ลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้ 40 และ 90% โดยสามารถยับยั้งเชื้อได้ทุกไอโซเลตที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 1,500 มก./ลิตร สำหรับสารสกัดพญาปล้องทองพบว่ามีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่ำมาก โดยที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด

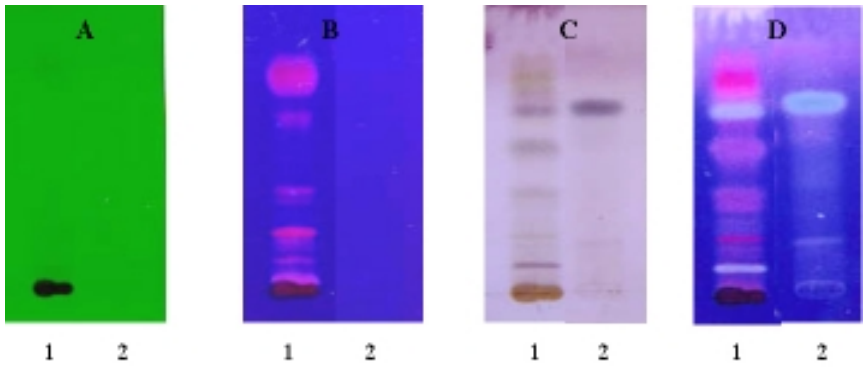

Figure 3. TLC chromatogram of *Clinacanthus* extract compare to β-sitosterol; A = observed under UV light at 254 nm; B = observed under UV light at 366 nm; C = after reacted with anisaldehyde/ sulfuric acid; D = after reacted with anisaldehyde/sulfuric and observed under UV light at 366 nm ; lane 1 = *Clinacanthus* extract ; lane 2 = β-sitosterol; Adsorbent : silica gel GF_{254} ; Solvent system : $CHCl_3$: Methanol = 9 : 1

Table 3. *In vitro* efficiency of 3 species of plant extracts in inhibiting and eradicating 15 isolates of *Vibrio* spp. from infected shrimp (test in MH broth)

Concentration of plants extract in medium (mg/L)	Inhibited isolates / Total isolates	% inhibition
	Turmeric	
0-10	0/15	0
21.56	3/15	20
30 - 43.14	5/15	33.33
50- 172.56	7/15	46.67
	Andrographis	
0-121.92	0/15	0
243.92-1200	3/15	20
2,500	6/15	40
5,000	11/15	73.33
10,000	15/15	100
	Clinacanthus	
0-3,000	0/15	0
6,000	3/15	20
10,000	9/15	60

ในเปปโตน 500-2,000 มก./ลิตร ยับยั้งเชื้อวิบริโอกลุ่มที่ใช้ทดสอบได้เพียง 1 ไอโซเลต หรือ 10% ขณะที่ความเข้มข้น 2,500 มก./ลิตร ยับยั้งเชื้อได้เพียง 2 ไอโซเลต หรือ 20% เท่านั้น (Table 4)

3.3 ผลของสารสกัดสมุนไพรในอาหารแข็งต่อเชื้อ *Vibrio* spp. 10 ไอโซเลต

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ 10 ไอโซเลต เหมือนกับข้อ 3.2 ของสมุนไพรชนิดต่างๆ ที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MH ความเข้มข้นต่ำกว่าสูตรอาหาร

ปกติ 10 เท่า พบเชื้อ *Vibrio* spp. 4 ไอโซเลต ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารสกัดขมิ้นชัน 25 มก./ลิตร ขณะที่ความเข้มข้นสูงขึ้น 50, 100, 150 และ 200 มก./ลิตร ยับยั้งเชื้อได้ 60, 70, 80 และ 90% ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้น 250 และ 500 มก./ลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่มวิบริโอได้ทุกไอโซเลต ผลการทดสอบประสิทธิภาพของฟ้าทะลายโจรพบว่าการผสมสารสำคัญลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 500 และ 1,000 มก./ลิตร สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 50 และ 90% ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 1,500 มก./ลิตร ขึ้นไปจึงยับยั้งเชื้อได้ 100% ส่วนพญาปล้องทองที่ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0-2,000 มก./ลิตร ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้เลย ในขณะที่ความเข้มข้น 2500 มก./ลิตร ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เพียง 10% (Table 5)

4. ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

เมื่อทดลองเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสมสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด พบกุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดแต่ละชนิด และกุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดรวมกัน มีการเจริญเติบโต อัตรารอดต่ำกว่าชุดควบคุม มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการกินอาหารสูงกว่าชุดควบคุม เว้นแต่กุ้งชุดที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดพญาปล้องทอง 20 มก./กก. มีการเจริญเติบโต และมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Table 6)

5. ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการตอบสนองภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดบางประการที่บ่งชี้ถึงการตอบสนองภูมิคุ้มกันพบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดสมุนไพรระดับต่างๆ มีแนวโน้มของปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนต่ำกว่าชุดควบคุม เว้นแต่กุ้งชุดที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดพญาปล้องทอง 20 มก./กก. มีปริมาณเม็ดเลือดรวมไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ส่วนกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหาร

Table 4. ***In vitro*** **efficiency of 3 species of plant extracts in inhibiting and eradicating 10 isolates of** ***Vibrio*** **spp. from infected shrimp (test in 0.3% peptone water).**

Concentration of plants extract in medium (mg/L)	Inhibited isolates / Total isolates	% inhibition
	Turmeric	
0	0/10	0
25	2/10	20
50	3/10	30
100	4/10	40
150	6/10	60
200	9/10	90
250-500	10/10	100
	Andrographis	
0	0/10	0
500	5/10	50
1,000	9/10	90
1,500-2,500	10/10	100
	Clinacanthus	
0-1500	0/10	0
2000	1/10	10
2500	2/10	20

Table 5. ***In vitro*** **efficiency of 3 species of plant extracts in inhibiting and eradicating 10 isolates of** ***Vibrio*** **spp. from infected shrimp (test in semi-solid MH medium).**

Concentration of plants extract in medium (mg/kg)	Inhibited isolates / Total isolates	% inhibition
	Turmeric	
0	0/10	0
25	4/10	40
50	6/10	60
100	7/10	70
150	8/10	80
200	9/10	90
250-500	10/10	100
	Andrographis	
0	0/10	0
500	5/10	50
1,000	9/10	90
1,500-2,500	10/10	100
	Clinacanthus	
0-2000	0/10	0
2500	1/10	10

ทุกสูตรพบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 7) เช่นเดียวกับผลประสิทธิภาพของซีรัมในการยับยังเชื้อ *V. harveyi* ในหลอดทดลอง และปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่คงเหลืออยู่ในลำไส้และตับที่พบปริมาณจากกุ้งทุกชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 8 and 9)

6. ผลของสารสกัดขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรในอาหารต่อการต้านทานเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในกุ้งกุลาดำ

เมื่อทดลองให้กุ้งกุลาดำกินอาหารที่มีสารสกัดขมิ้นชันเข้มข้นต่างๆ กัน นาน 7 และ 14 วัน พบว่ากุ้งชุดที่ได้รับอาหารผสมสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชัน 5 (T2) และ 25 (T3) มก./กก. มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียโดยมีอัตรารอดตายและความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์รอดตาย (RPS) สูงกว่ากุ้งชุดอื่นๆ (Table 10) ส่วนกุ้งที่ได้รับอาหารผสมฟ้าทะลายโจร 7 วัน ไม่สามารถต้านทานเชื้อ *V. harveyi* ได้โดยมีอัตรารอดตายและมีค่า RPS ต่ำกว่ากุ้งชุดควบคุม ขณะที่กุ้งชุดที่ได้รับอาหารผสมฟ้าทะลายโจร 50 มก./กก. นาน 14 วัน มีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียสูงกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย (Table 11) แต่พบกุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 5-50 มก./กก. 14 วัน มีความต้านทานต่อเชื้อ WSSV ได้สูงกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับอาหารผสมฟ้าทะลายโจรและชุดที่ได้รับอาหารผสมสมุนไพรเข้มข้น 100 มก./กก. (Table 12)

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษานี้พบว่าวัตถุดิบขมิ้นชันที่นำมาเตรียมเป็นสารสกัดมี curcuminoids น้ำมันหอมระเหยกลุ่ม aromatic turmerone ในปริมาณที่สูงกว่าข้อกำหนดของ Thai Herbal Pharmacopoeia (1995) ที่กำหนดว่าจะต้องมีสารสำคัญดังกล่าวและน้ำมันหอมระเหยไม่น้อยกว่า 5.0% w/w และ 6.0% v/w และเมื่อทำการสกัดวัตถุดิบดังกล่าวด้วยแอลกอฮอล์ พบว่าสามารถทำให้สาร curcuminoids ในตัวอย่างมีความเข้มข้นสูงขึ้นประมาณ 3.9 เท่า (5.4% เป็น 21.57%) น้ำมันหอมระเหยรวมในตัวอย่างสารสกัดมีค่า 38.50% v/w สูงกว่าในวัตถุดิบประมาณ

Table 6. Growth performance, survival rate, FCR, feed consumption and rate of feed intake of shrimp fed experimental diets for a 8 wk period.

Parameters	Diets						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Final indiv. wt.(g)	4.86 ± 0.22^{ab}	3.28 ± 0.36^{c}	2.06 ± 0.09^{d}	5.25 ± 0.51^{a}	4.82 ± 0.47^{b}	2.98 ± 0.35^{c}	3.21 ± 0.13^{c}
Total weight gain (%)	181.63 ± 13.01^{b}	89.83 ± 17.02^{e}	17.84 ± 5.92^{e}	204.41 ± 27.76^{a}	176.40 ± 21.93^{b}	67.72 ± 19.80^{d}	83.40 ± 5.39^{cd}
Survival (%)	93.33 ± 5.82^{a}	84.67 ± 3.61^{b}	68.67 ± 6.71^{c}	88.67 ± 8.04^{ab}	83.50 ± 3.83^{b}	67.67 ± 6.38^{c}	71.00 ± 3.10^{c}
FCR	1.51 ± 0.11^{b}	2.27 ± 0.29^{b}	9.27 ± 5.61^{a}	1.36 ± 0.08^{b}	1.64 ± 0.17^{b}	2.74 ± 0.76^{b}	2.35 ± 0.23^{b}
Feed consumption (g/shrimp)	5.04 ± 0.27^{bc}	4.05 ± 0.40^{e}	3.54 ± 0.42^{f}	5.33 ± 0.35^{b}	5.89 ± 0.32^{a}	4.41 ± 0.54^{de}	4.70 ± 0.27^{cd}
Rate of feed intake (%/ 100 g body wt./day)	2.64 ± 0.16^{b}	2.65 ± 0.16^{b}	2.72 ± 0.13^{ab}	2.57 ± 0.13^{b}	2.94 ± 0.23^{a}	2.70 ± 0.25^{ab}	2.84 ± 0.19^{ab}

Means±SD. Values in the same row sharing a common superscript are not statistically different (p>0.05).

4.8 เท่า โดยในน้ำมันหอมระเหยของสารสกัดแอลกอฮอล์มีสารกลุ่ม aromatic turmerone 19.78% w/w ซึ่งเป็นปริมาณที่เข้มข้นกว่าในวัตถุดิบ 5.5 เท่า (3.59% เป็น 19.78% w/w) ส่วนผลการศึกษาปริมาณสารสำคัญในตัวอย่างฟ้าทะลายโจร พบว่ามีสารสำคัญ คือ total lactone อยู่ 11.56% สูงกว่าข้อกำหนดของ Thai Herbal Pharmacopoeia (1995) อยู่เกือบ 2 เท่า ส่วนพญาปล้องทองที่ใช้ในการศึกษานี้ยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงปริมาณสารสำคัญ อย่างไรก็ตามการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดจากการทดลองนี้พบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์ของพญาปล้องทองมีสารสำคัญที่สามารถต้านเชื้อไวรัส HSV-1 ได้โดยมีระดับความเข้มข้น 29.29 มก./ลิตร

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรคในกุ้งกุลาดำของสารสกัดสมุนไพรในหลอดทดลอง พบว่าขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าของ Mahady และคณะ (2002) ที่พบสารสกัดจากขมิ้นชันยับยั้งเชื้อ *Helicobacter pylori* ได้ ในขณะที่ Negi และคณะ (1999) รายงานว่าน้ำมันหอมระเหย (turmeric oil) ที่แยกจากขมิ้นชันมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดทั้งแกรมบวกและแกรมลบ Limsong และคณะ (2004) พบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์ฟ้าทะลายโจรยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Streptococcus mutan* สายพันธุ์ ATCC 25175 และ TPF-1 ได้ ส่วน Rasmussen และคณะ (2000) พบว่าสารสกัดจากขมิ้นชันสามารถต้านปรสิต (*Plasmodium falciparum* และ *P. major*) ในหลอดทดลองได้ ส่วนการศึกษาของ Roth และคณะ (1998) พบสารสกัดจากใบขมิ้นชันยับยั้งการเจริญของยีสต์ *Candida kruseii* และ *C. parapsilosis* ได้ อีกทั้งมีรายงานว่าสารในขมิ้นชันยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืชได้หลายชนิด (Kim *et al*., 2003) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยกลไกการยับยั้งอาจเกิดได้หลายกลไก เช่น Kumar และคณะ (2001) พบว่าสาร curcumin และอนุพันธ์ต่างๆ รวมทั้ง curcumin peptide และเกลือของ curcumin มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยไปขัดขวางกระบวนการผลิตเอ็นไซม์ β-lactamase ของจุลินทรีย์ ขณะที่ Roth และคณะ (1998) พบว่าสาร

Table 7. Total hemocyte count (THC), phenoloxidase activity (PO) of shrimp fed experimental diets for a 8 wk period.

Treatment	THC (x 10^4 cell/mm^3)	PO activity (Unit/min/mg prot.)
T_1 (control)	7.14 ± 3.04^{ab}	183.95 ± 179.80^{NS}
T_2 (turmeric 43.14 mg/kg)	4.44 ± 1.73^{bc}	101.31 ± 53.04^{NS}
T_3 (turmeric 215.7 mg/kg)	5.09 ± 3.21^{abc}	49.43 ± 22.17^{NS}
T_4 (*Clinacanthus* 20 mg/kg)	7.64 ± 3.81^{a}	161.59 ± 73.03^{NS}
T_5 (*Clinacanthus* 100 mg/kg)	5.98 ± 2.16^{abc}	126.16 ± 61.58^{NS}
T_6 (*Andrographis* 304.92 mg/kg)	4.02 ± 2.56^{c}	82.96 ± 47.73^{NS}
T_7 (turmeric: *Clinacanthus*: *Andrographis*; 43.14:100:30.49 mg/kg)	3.34 ± 2.16^{c}	64.65 ± 34.73^{NS}

Means±SD. Values in the same column sharing a common superscript are not statistically different (p>0.05).

Table 8. *Vibrio harveyi* eradication of shrimp serum fed experimental diets for a 8 wk period.

Treatment	Incubation time (h)			
	6	9	12	24
T_1 (control)	11.00 ± 5.55	8.00 ± 5.24	6.25 ± 4.46	7.00 ± 4.14
T_2 (turmeric 43.14 mg/kg)	10.00 ± 3.70	8.00 ± 3.70	8.00 ± 3.70	8.00 ± 3.70
T_3 (turmeric 215.7 mg/kg)	10.23 ± 6.50	9.33 ± 7.34	7.33 ± 6.77	4.67 ± 5.75
T_4 (*Clinacanthus* 20 mg/kg)	12.00 ± 4.28	12.00 ± 4.28	11.00 ± 4.14	11.00 ± 4.14
T_5 (*Clinacanthus* 100 mg/kg)	14.00 ± 3.70	11.00 ± 5.55	11.00 ± 5.55	9.00 ± 5.95
T_6 (*Andrographis* 304.92 mg/kg)	13.00 ± 5.95	13.00 ± 5.95	12.00 ± 6.05	7.25 ± 7.32
T_7 (turmeric: *Clinacanthus*: *Andrographis*; 43.14:100:30.49 mg/kg)	13.50 ± 4.75	13.50 ± 4.75	11.75 ± 6.09	11.25 ± 6.58

Means±SD. The values in the same column are not statistically different (p>0.05).

curcuminiods ต้านเชื้อราโดยยับยั้งกิจกรรมของ topo-isomerases ส่วน Limsong และคณะ (2004) พบว่าสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยการทำให้กิจกรรมของ glucosyltransferase และ glucan-binding lectin ของเชื้อลดลง นอกจากนั้นมีรายงานว่าสาร curcumin และอนุพันธ์หลายชนิดมีฟีนอลและไฮดรอกซิลอยู่ในโมเลกุล ซึ่งมีคุณสมบัติไปยับยั้งการสังเคราะห์ prostagrandin (PG synthetase) และ leucotrienes ของเซลล์ (Kiuchi *et al*., 1992)

อย่างไรก็ตามการทดลองนี้พบว่าประสิทธิภาพของสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจะน้อยลงในสภาพแวดล้อมที่มีสารอาหารอยู่มากเกินพอ (MH-broth) จากผลดังกล่าวอาจเป็นเพราะตะกอนในอาหารไปจับกับโมเลกุลของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย จึงน่าจะเป็นแนวทางที่บ่งชี้ว่าการประยุกต์ใช้สารสกัดสมุนไพรเพื่อลดปริมาณแบคทีเรียในน้ำที่มีตะกอนอยู่มากอาจไม่สัมฤทธิ์ผลเท่าที่ควร เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของสมุนไพรแต่ละชนิดในระดับความเข้มข้นใกล้เคียงกันพบขมิ้นชันมีประสิทธิภาพดีที่สุด นั่นคือขมิ้นชันความเข้มข้นประมาณ 200 มก./ลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MH ยับยั้งการเจริญของเชื้อวิบริโอ 15 ไอโซเลต ได้ประมาณ 50% ในขณะที่ฟ้าทะลายโจรเข้มข้นกว่า 6 เท่ายับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่มเดียวกันได้เพียง 20% เท่านั้น เช่นเดียวกับสารสกัดขมิ้นชันในสารละลายเปปโตนและใน

Table 9. Total bacteria and total *Vibrio* spp. in hepatopancreas and mid-gut tissue of shrimp fed experimental diets for a 8 wk period.

Treatment	Hepatopancreas (CFU/g tissue)		Mid-gut (CFU/g tissue)	
	Total bacteria	Total *Vibrio* spp.	Total bacteria	Total *Vibrio* spp.
T_1 (control)	$9.63x10^6 \pm 1.21x10^7$	$8.69x10^7 \pm 1.51x10^6$	$3.16x10^9 \pm 1.84x10^9$	$6.68x10^7 \pm 1.21x10^7$
T_2 (turmeric 43.14 mg/kg)	$4.57x10^7 \pm 5.53x10^7$	$3.08x10^6 \pm 3.44x10^6$	$2.54x10^9 \pm 2.60x10^9$	$2.37x10^8 \pm 1.21x10^8$
T_3 (turmeric 215.7 mg/kg)	$1.04x10^9 \pm 2.06x10^9$	$7.04x10^6 \pm 1.54x10^7$	$5.46x10^9 \pm 5.24x10^9$	$9.44x10^7 \pm 1.21x10^7$
T_4 (*Clinacanthus* 20 mg/kg)	$2.15x10^8 \pm 5.50x10^8$	$1.14x10^7 \pm 3.08x10^7$	$1.94x10^9 \pm 1.49x10^9$	$4.51x10^7 \pm 1.21x10^8$
T_5 (*Clinacanthus* 100 mg/kg)	$1.58x10^7 \pm 2.35x10^7$	$1.68x10^6 \pm 3.83x10^8$	$2.70x10^9 \pm 1.98x10^9$	$6.15x10^7 \pm 1.21x10^7$
T_6 (*Andrographis* 304.92 mg/kg)	$2.60x10^7 \pm 4.43x10^7$	$1.65x10^5 \pm 3.13x10^5$	$2.35x10^9 \pm 3.16x10^9$	$1.24x10^7 \pm 1.21x10^7$
T_7 (turmeric: *Clinacanthus*: *Andrographis*; 43.14:100:30.49 mg/kg)	$9.28x10^7 \pm 1.63x10^8$	$1.25x10^7 \pm 3.38x10^7$	$2.62x10^9 \pm 1.91x10^9$	$3.91x10^7 \pm 1.21x10^7$

Means±SD. The values in the same column are not statistically different (p>0.05)

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเข้มข้น 250 มก./ลิตร สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อกลุ่ม *Vibrio* ssp. ได้ถึง 100% ขณะที่ต้องใช้ฟ้าทะลายโจรเข้มข้นสูงกว่า 6 เท่าจึงสามารถฆ่าเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลต ที่ใช้ทดสอบได้ ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชันมีโครงสร้างและคุณลักษณะที่สามารถจับกับเซลล์แบคทีเรียได้มากกว่าฟ้าทะลายโจร ซึ่ง Arauja และ Leon (2001) กล่าวว่า curcumin ในขมิ้นชันมีโมเลกุลของสารที่มี diene ketone อยู่ในโครงสร้างจำนวนมากทำให้ตัวสารมีคุณสมบัติเป็น lipophylicity สูงขึ้น สามารถแทรกซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ง่ายขึ้นซึ่งน่าจะเสริมให้กลไกการยับยั้งเชื้อที่กล่าวมาข้างต้นเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นด้วย

สำหรับสารสกัดพญาปล้องทองจากการทดลองนี้พบมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่ำมาก โดยที่ความเข้มข้น 6,000 มก./ลิตร ในอาหารเหลว MH และ 2,500 มก./ลิตร ในสารละลายเปปโตนยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 26.67 และ 20% เท่านั้น จากรายงานก่อนหน้าของสถาพร และคณะ (2539) พบว่าเสลดพังพอน (พญาปล้องทอง) เข้มข้น 500 มก./ลิตร ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp. 10 ไอโซเลต เช่นกัน จึงบ่งชี้ให้เห็นว่าสารสำคัญในพญาปล้องมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่ำในขณะที่ผลการศึกษานี้พบสารสกัดพญาปล้องทองเพียง 29.29 มก./ลิตร สามารถยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-1 ได้สอดคล้องกับรายงานที่ว่าฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพญาปล้องทองคือการต้านการอักเสบและต้านเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคอีสุกอีใส เริม งูสวัด (Thai Herbal Pharmacopoeia, 1995) และเชื้อไวรัส HSV-2 (Yoosook *et al*., 1999) การศึกษาวิจัยเพื่อใช้สารสกัดจากพืชชนิดนี้ในการควบคุมเชื้อไวรัสในกุ้งทะเลเป็นแนวทางที่น่าสนใจในอนาคต

เมื่อทดลองใช้สมุนไพรผสมอาหารให้กุ้งกินต่อเนื่องนาน 8 สัปดาห์ พบว่าผลที่ได้ยังไม่เป็นที่น่าพอใจเนื่องจากเมื่อนำขมิ้นชันมาผสมอาหารให้กุ้งกินทำให้กุ้งมีความต้องการอาหารลดลง โดยเห็นได้ชัดเมื่อผสมสมุนไพรแต่ละชนิดในปริมาณที่เข้มข้นขึ้นความต้องการอาหารของกุ้งจะลดลง ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการตอบสนองภูมิคุ้มกันลดลงเว้นแต่ชุดที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดพญาปล้องทอง 20 มก./กก. ที่กุ้งมีการเจริญเติบโตและมีการตอบสนองภูมิคุ้มกันสูงกว่าชุดที่ได้รับสมุนไพรเข้มข้นสูง ซึ่งจาก

Table 10. Percent survival and relative percent survival (% RPS) of shrimp fed turmeric supplemented diets for a 7 and 14 day period and challenge with *Vibrio harveyi* by immersion method for a 10 day period.

Treatment	Survival (%)		Relative percent survival (% RPS)	
	7 day	14 day	7 day	14 day
T_1 (turmeric 0 mg/kg)	40	25	-	-
T_2 (turmeric 5 mg/kg)	55	65	27.27	61.53
T_3 (turmeric 25 mg/kg)	60	45	33.33	44.44
T_4 (turmeric 50 mg/kg)	10	25	-300	0
T_5 (turmeric 100 mg/kg)	25	30	-600	16.67

Remark: After a 7 day feeding period shrimp were reared in seawater with initial *V. harveyi* concentration $1.41x10^6$ CFU/ml.
After a 14 day feeding period shrimp were reared in seawater with initial *V. harveyi* concentration $1.67x10^6$ CFU/ml.

Table 11. Percent survival and relative percent survival (% RPS) of shrimp fed *Andrographis* supplemented diets for a 7 and 14 day period and challenge with *Vibrio harveyi* by immersion method for a 10 day period.

Treatment	Survival (%)		Relative percent survival (% RPS)	
	7 day	14 day	7 day	14 day
T_1 (*Andrographis* 0 mg/kg)	90	75	-	-
T_2 (*Andrographis* 5 mg/kg)	90	60	0	-25
T_3 (*Andrographis* 25 mg/kg)	75	70	-20	-7.14
T_4 (*Andrographis* 50 mg/kg)	90	80	0	6.25
T_5 (*Andrographis* 100 mg/kg)	65	75	-38.46	0.00

Remark: After a 7 day of feeding period shrimp were reared in seawater with initial *V. harveyi* concentration $1.57 x10^6$ CFU/ml.
After a 14 day of feeding period shrimp were reared in seawater with initial *V. harveyi* concentration $1.52 x10^6$ CFU/ml.

ผลดังกล่าวเป็นไปได้ว่าการผสมสารสกัดสมุนไพรในอาหารระดับสูงๆ น่าจะมีผลให้กลิ่น รสชาติ และเนื้อสัมผัสของอาหารเสียไป สำหรับผลการทดลองผสมสารสกัดขมิ้นชันในอาหารเข้มข้นตั้งแต่ 5- 100 มก./กก. (0.0005-0.1%) ให้กุ้งกุลาดำกิน เป็นระยะเวลาสั้นๆ 7-14 วัน พบว่ากุ้งที่ได้รับสารสำคัญขมิ้นชันในอาหารระดับ 5-25 มก./กก. มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* ได้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยชุดที่ได้รับอาหาร 14 วัน มีประสิทธิภาพ ในการต้านทานต่อโรคได้ดีกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเพียง 7 วัน แต่ที่ระดับความเข้มข้นของสมุนไพรตั้งแต่ 50-100 มก./กก. กุ้งมีความสามารถในการต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคลดลง แสดงให้เห็นว่าเมื่อต้องการให้กุ้งได้รับสารสำคัญในขมิ้นชันเพิ่มขึ้นควรให้ปริมาณน้อยๆ เป็นระยะเวลานาน เพราะการให้ขมิ้นชันในปริมาณที่สูงอาจมีสารบางชนิดในสารขมิ้นชันในปริมาณที่มากเกินไปจนมีผลไปกดระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ หรือมีผลทำลายเซลล์

Table 12. Percent survival and relative percent survival (% RPS) of shrimp fed *Andrographis* supplemented diets for a 14-day period and challenge with WSSV by injection method for a 10-day period.

Treatment	Survival (%)	Relative percent survival (% RPS)
T_1 (*Andrographis* 0 mg/kg)	35	-
T_2 (*Andrographis* 5 mg/kg)	50	30
T_3 (*Andrographis* 25 mg/kg)	70	50
T_4 (*Andrographis* 50 mg/kg)	45	22.22
T_5 (*Andrographis* 100 mg/kg)	35	0

เนื้อเยื่อส่วนต่างๆ จนกุ้งอ่อนแอ เมื่อได้รับเชื้อก่อโรคจะทำให้เกิดการติดเชื้อและตายง่ายขึ้น ซึ่งผู้วิจัยจะทำการศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรในอาหารต่อพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับกุ้งกุลาดำในโอกาสต่อไป สำหรับผลการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อโรคของกุ้งชุดที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจร 50 มก./กก. นาน 14 วัน พบมีความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่นเล็กน้อย ในขณะที่การผสมสารสกัดดังกล่าวในระดับ 25 มก./กก. ทำให้กุ้งมีความสามารถต้านทานต่อเชื้อ WSSV ได้ดีขึ้น

จากผลการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่าสามารถใช้แอลกอฮอล์สกัดสารจากตัวอย่างสมุนไพรไทยทั้ง 3 ชนิด โดยยังคงปริมาณและคุณภาพสารสำคัญในตัวอย่างไว้ เนื่องจากปริมาณสารสำคัญในตัวอย่างสารสกัดสูงกว่าปริมาณในวัตถุดิบซึ่งทำให้ง่ายในการควบคุมปริมาณการใช้ อีกทั้งสารสกัดดังกล่าวยังคงคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ก่อในโรคกุ้งได้ นอกจากนั้นเมื่อนำสารสกัดสมุนไพรที่ได้มาผสมอาหารให้กุ้งกุลาดำในระดับความเข้มข้น ไม่เกิน 25 มก./กก. (0.025%) กุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันมีประสิทธิภาพในการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้น ในขณะที่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดฟ้าทะลายโจรในปริมาณเท่ากันติดต่อกันอย่างน้อย 14 วัน มีประสิทธิภาพในการต้านต่อเชื้อไวรัส WSSV ได้ดีขึ้น ผลการทดลองจึงน่าจะเป็นแนวทางในศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อนำสมุนไพรไทยมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคติดเชื้อในกุ้งกุลาดำแทนการใช้สารปฏิชีวนะได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติในการสนับสนุนทุนวิจัย ขอขอบคุณ นส.พ.สุจินต์ ธรรมศาสตร์ บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) ในการสนับสนุนสัตว์ทดลอง

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์ และสิทธิ บุณยรัตผลิน. 2538. การศึกษาภูมิคุ้มกันโรคและแนวทางในการใช้วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.หน้า 1-7.

กิจการ ศุภมาตย์ อุษณีย์ เอกปณิธานพงษ์ Itami, T. และจิราพร เกสรจันทร์. 2543. เทคนิคในการศึกษาองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์ ฉบับวทท. 22 (ฉบับพิเศษ): 567-580.

สถาพร ดิเรกบุษราคม สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์ อังคณา หิรัญสาลี และลิลา เรืองแป้น. 2539. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยบางชนิดในการยับยั้งเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 7/2539 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 7 หน้า.

Araujo, C.A.C. and Leon, L.L. 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 96: 723-728.

Boonyaratpalin, M., Supamattaya, K., Verakunpiriya, V. and Suprasert, D. 2001. Effects of aflatoxin B1 on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). Aquacult. Res. 32: 388-398.

Branson, E. 2001. Clinical relevance of minimum inhibitory concentrations (MICs). Aquacult. 196: 289-296.

Christofilogiannis, P. 2000. Current inoculation method in MIC determination. Aquacult. 196: 297-302.

Kim, M.K., Choi, G.J. and Lee, H.S. 2003. Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome derived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. J. Agric Food Chem. 51:1578-1581.

Kiuchi, F., Iwakami, S., Hanaoko, F. and Sankawa, U. 1992. Inhibition of prostagrandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoid. Chem. Pharm. Bull. 40: 387-391.

Kumar, S., Narain, U., Tripathi, S. and Misra, K. 2001. Syntheses of curcumin bioconjugates and study of their antibacterial activities against β-lactamase producing microorganisms. Bioconjug. Chem. 12: 464-469.

Limsong, J., Benjavongkulchai, E. and Kuvatanasuchati, J. 2004. Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. J. Ethnopharmacol. 92: 281-289.

Mahady, G.B., Pendland, S.L., Yun, G. and Lu, Z.Z. 2002. Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. Anticancer Res. 22 (6C): 4179-4181.

Martin, G.G., Poole, D., Poole, C., Hose, J.E., Arias, M., Reynolds, L., Mckrell, N. and Whang, A. 1993. Clearance of bacteria injection into the hemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. J. Invertebr. Pathol. 62:308-315.

Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., Jagan-Mohan Rao, L. and Sakariah, K.K. 1999. Antibacterial activity of turmeric oil: a by-product from curcumin manufacture. J. Agric Food Chem. 47:4297-4300.

Rasmussen, H.B., Christensen, S.B., Kvist, L.P. and Karazmi, A. 2000. A simple and efficient separation of the curcumins, the antiprotozoal constituents of *Curcuma longa*. Planta Med. 66: 396-398.

Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27: 493-497.

Roth, G.N., Chandra, A. and Nair, M.G. 1998. Novel bioactivities of *Curcuma longa* constituents. J. Nat. Prod. 61:542-545.

Straka, R.P. and Stokes, J.L. 1957. Rapid destruction of bacteria in commonly used diluent and its elimination. Appl. Microbiol. 5: 21.

Thai Herbal Pharmacopoeia.1995. Vol. I. Prachachon Co. Ltd., Bangkok, Thailand . 140 p.

Yoosook, C., Panpisutchai, Y., Chaichana, S., Santisuk, T. and Reutrakul, V. 1999. Evaluation of anti HSV-2 activities of *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans*. J. Ethnopharmacol. 67: 179-187.