

ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค
ในกุ้งก้ามกราม

Effective of Thai herbs extracts to inhibit bacterial pathogens in
Giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)

อัญชลี อัมรงค์สถิต¹ และ จิราพร โรจนทินกร¹
¹คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

ศึกษาสมุนไพรไทยหาง่าย 34 ชนิด ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสำคัญในกุ้งก้ามกราม 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Aeromonas hydrophila* (AH), *Vibrio parahaemolyticus* (VP) และ *V. harveyi* (VH) โดยใช้สมุนไพรสกัดด้วยเอทานอล 50% และเอทานอล 50% ต้ม ที่ 70°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดใบหูกวางด้วยเอทานอล 50% ต้ม มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ AH และ VP สูงที่สุด (15.78, 19.35 มม.) สารสกัดกระเทียมสดด้วยเอทานอล 50% มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ VH สูงที่สุด (19.8 มม.) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดต่อเชื้อโรคโดยหาค่า MIC/MBC วิธี broth dilution พบว่าสารสกัดกระเทียมสดด้วยเอทานอล 50% มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อเชื้อ AH (MIC = 5 ppt; MBC = 10 ppt) สารสกัดใบหูกวางด้วยเอทานอล 50% ต้ม มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อเชื้อ VP (MIC = 2 ppt; MBC = 3 ppt) และ VH (MIC = 1 ppt; MBC = 9 ppt) ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อลูกกุ้งก้ามกราม (PL15) โดยหาค่า LC₅₀ ที่ 96 h พบว่าสารสกัดเทียนตาตุ๊กแทน มีพิษระดับสูงต่อกุ้ง (LC₅₀ 96 h = 0.42 ppt) จากการทดสอบพบว่าสารสกัดเปลือกทับทิม ใบหูกวาง กระเทียมสด ชาเขียวญี่ปุ่น และใบชะพลู มีฤทธิ์และประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อได้ทั้ง 3 ชนิด มีความเป็นพิษต่อลูกกุ้งก้ามกรามระดับต่ำ ดังนั้นสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดนี้เหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยสูง

Abstract

Local Thai herbs 34 species showed inhibition to the important bacterial pathogen 3 species i.e. *Aeromonas hydrophila* (AH), *Vibrio parahaemolyticus* (VP) and *V. harveyi* (VH). Herbs was extracted with 50% ethanol and 50% ethanol then boiled at 70°C for 1 h. The study included disc diffusion method for activity test. It was found that the most effective for AH and VP was Indian almond 50% ethanol boiled (15.78, 19.35 mm), VH was fresh garlic 50% ethanol extract (19.8 mm). Detection of MIC/MBC value by broth dilution method for efficiency test was conducted and the results show that the highest activity of AH were fresh garlic 50% ethanol (MIC = 5 ppt; MBC = 10

ppt), VP and VH were Indian almond 50% ethanol boiled extract (MIC = 2 ppt; MBC = 3 ppt), (MIC = 1 ppt; MBC = 9 ppt). Toxicity test in PL15 giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*), review that the extract of dill (*Anethum graveolens* L.) (LC₅₀ 96 h = 0.42 ppt). It is found that pomegranate peel (*Punica granatum* L. var.), Indian almond leaf (*Terminalia catappa* L.), fresh garlic (*Allium sativum* Linn.), Japanese green tea (*Camellia sinensis*) and piper leaf (*Piper sarmentosum*) extracts showed high effectiveness and low toxicity. Therefore these herbs are satisfied to apply in prevention and treatment of bacterial disease for effective and safety.

คำนำ

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในกุ้งก้ามกรามมี 3 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* ก่อให้เกิดโรคเสี้ยนดำ โรคจุดดำบนเปลือกกุ้ง สำหรับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ก่อให้เกิดโรคเปลือกกร่อน และ *V. harveyi* ก่อให้เกิดโรคเรืองแสง (กุ้งก้ามกราม, 2548) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้เข้าไปสร้างสารพิษ exotoxins ทำให้เกิดอาการเปลือกกร่อน จุดดำบนเปลือกบริเวณหัว ลำตัว และระยางค์ของกุ้ง (Inglis *et al.*, 1993) การรักษาทำได้โดยใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มคลอแรมเฟนิคอล ออกซิเตตราซัยคลิน และซัลฟานิลาไมด์ (ปภาศิริ, 2537) แต่การใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะเป็นปัญหาสำคัญเรื่องการตกค้างในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อม (สุปรานี, 2545) ในปี 2544 ประเทศออสเตรเลียตรวจพบยาคลอแรมเฟนิคอลในเนื้อกุ้งส่งออกจากประเทศเซเชลล์ และในปี 2545 ประเทศกลุ่ม EU ตรวจพบสารไนโตรฟูแรนในผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งจากประเทศไทย (ลีลา, 2545) ส่งผลกระทบต่อธุรกิจส่งออกกุ้งและเกิดปัญหาที่ติดกันทางการค้าสูงขึ้น ดังนั้นนักวิจัยหลายกลุ่มจึงมีการศึกษาการใช้สมุนไพรซึ่งเป็นสารธรรมชาติมาใช้เพื่อรักษาโรคในกุ้ง เช่น สถาพรและคณะ (2539) พบว่าสารสกัดกะเม็ง ฟ้าทะลายโจร มะยม และมะระขี้้นกด้วยเอทานอล 50% สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp. ในกุ้งกุลาดำได้ เต็มดวง (2540) รายงานว่าสารสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp. ในกุ้งกุลาดำได้เช่นกัน สุจิตรา (2541) ใช้สารสกัดชาเขียวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.2) และอาหาร MHB (Mueller Hinton Broth) สามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำ และ Immanuel *et al.* (2004) รายงานว่า สารสกัดเมล็ดละหุ่งด้วยเบนธานอล ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในกุ้งแช่บ๊วย

ในงานวิจัยนี้เลือกใช้สมุนไพรไทยหางาย 34 ชนิด เนื่องจากมีข้อมูลว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดี จึงนำสมุนไพรเหล่านี้มาเตรียมสารสกัด ทำการทดสอบฤทธิ์และประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งก้ามกราม และทดสอบความเป็นพิษต่อลูกกุ้งก้ามกราม เพื่อเป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

สมุนไพรวัวอย่างและการเตรียมสารสกัดหยาบจากสมุนไพรวัว

พืชสมุนไพรวัวที่ใช้ศึกษามีจำนวน 34 ชนิด ได้แก่ เปลือกทับทิม ใบหูกวาง ใบหูกวางสด กระเทียมสด ใบชะพลู ชาเขียวญี่ปุ่น ใบหม่อน เทียนตาดักแตน ต้นและใบฟ้าทะลายโจร ใบฟ้าทะลายโจรสด ใบน้อยหน่า ใบสะระแหน่ เหง้ากระชายม่วง หัวปลีลิงจู้ ใบลำโพงขาว ใบขี้เหล็ก ใบมะระขี้นก ผลมะระขี้นก ใบมะระหวาน เปลือกว่านหางจระเข้ รุ้งว่านหางจระเข้ บัวบก บัวบกสด ใบเทียนบ้านสด เชียงดาสด เชียงดา สำหรับยาสไปรูลิน่า ใบขลุ่ย ลำต้นต้อยติ่ง ผลมะขามสด มะเข็ญ กะเม็ง เทียนข้าวเปลือก เมล็ดผักชีลาว และยางหนุมนั่งแทน ซึ่งหาได้ทั่วไป แสดงในตารางที่ 1

นำสมุนไพรวัวที่ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปสกัดโดย 1) แห้ด้วยเอทานอล 50% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 2) แห้ด้วยเอทานอล 50% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปต้ม ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใช้อัตราส่วนสมุนไพรวัว 5 กรัม/เอทานอล 50% ปริมาตร 30 ml จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 4 และกรองด้วย filter holder 0.45 µm

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรวัวในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้วิธี Disc diffusion

เชื้อแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด คือ *Aeromonas hydrophila* (AH) สายพันธุ์ DMST 2798, *Vibrio parahaemolyticus* (VP) สายพันธุ์ DMST 15285 และ *V. harveyi* (VH) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

เตรียมเชื้อ AH โดยเลี้ยงในอาหาร NB (Nutrient broth) ส่วน VP และ VH เลี้ยงใน NB ที่เติม NaCl 1.5% บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเทียบความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mc Farland No.0.5 นำไป swab บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (Tryptic Soy Agar) หยดสารสกัดสมุนไพรวัวลงบน paper disc ขนาด 5 มม. ปริมาตร 25 µl/disc แล้วนำไปวางบนจานเพาะเชื้อ TSA ที่เตรียมไว้ บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การทดสอบค่า MIC/MBC ของสารสกัดสมุนไพรวัวในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้วิธี Broth dilution

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรวัวโดยหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ทำการเลี้ยงเชื้อ AH ในอาหาร NB ส่วน VP และ VH ใน NB ที่เติม NaCl 1.5% บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเทียบความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mc Farland No.0.5 ใส่เชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว 30 µl/อาหาร NB หรือ NB ที่เติม NaCl 1.5% ปริมาตร 3 ml และสารสกัดสมุนไพรวัวความเข้มข้นต่างๆ โดยคิดความเข้มข้นจากปริมาณสารสกัดที่ใส่ลงไป ในหลอดอาหารที่ใส่

เชื้อแล้ว บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น และ spread plate นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อในช่วง 30-300 cfu/ml และบันทึกผล

สัตว์ทดลองและการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพืชสมุนไพร (LC₅₀ 96 h)

กึ่งกัมภรณะหลังคว่ำได้จากสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดลำพูน นำมาอนุบาล 21 วัน ทดสอบค่าความเป็นพิษต่อกึ่งกัมภรณะโดยหาค่า Lethal Concentration for 50 percent 96 hour (LC₅₀ 96 h) จากการแช่ลูกกึ่ง ด้วยสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นค่าต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้น 5 ค่าของแต่ละสารสกัด (ความเข้มข้นอยู่ในช่วงค่า MIC) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ที่อุณหภูมิห้อง ใช้โหลแก้วขนาด 10 x 10 x 30 ซม. ใส่ น้ำ 1 ลิตร กึ่งกัมภรณะ (PL15) จำนวน 20 ตัว/การทดลอง ให้อากาศตลอดเวลา นับจำนวนกึ่งที่ตาย เป็นเวลา 96 ชั่วโมง คำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50% ที่เวลา 96 ชั่วโมง ด้วยวิธี Probit analysis (Finney, 1981)

การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบขนาดของ Inhibition zone ค่า MIC/MBC ค่าความเป็นพิษ (LC₅₀ 96 h) ของสารสกัดสมุนไพรในกึ่งกัมภรณะ (PL15)

ผลการศึกษา

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

ผลการทดสอบของสารสกัดสมุนไพร 31 ชนิด ต่อ โดยวิธี Disc diffusion พบว่าสารสกัดสมุนไพร 11 ชนิด ได้แก่ เปลือกทับทิม ใบหูกวาง ใบหูกวางสด กระเทียมสด ชาเขียวญี่ปุ่น ใบชะพลู เทียนตาตุ๊กแตน ใบมะระหวาน ต้นและใบฟ้าทะลายโจร ใบน้อยหน่า และใบสะระแหน่ ด้วยเอธานอล 50% และเอธานอล 50% ต้ม มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ AH ดังนี้ 10.15, 12.05, 13.93, 15.78, 13.16, 14.18, 11.53, 11.1, 10.32, 12.15, 11.75, 7.73, 10.81, 9.42, 9.45, 9.4, 8.5 และ 10.46 มม. ตามลำดับ ส่วนเชื้อ VP ดังนี้ 10.45, 14.82, 18.45, 19.35, 15.76, 15.3, 17.58, 13.4, 7.20, 14.8, 12.73, 14.03, 7.35, 7.6, 11.1, 7.2, 7.4, 9.71 และ 8.6 มม. ตามลำดับ และเชื้อ VH ดังนี้ 12.03, 14.05, 18.3, 18.42, 16.05, 15.1, 19.8, 18.17, 10.42, 11.1, 10.45, 8.50, 6.4, 6.57, 8.35, 6.8, 7.1, 6.3 และ 8.15 มม. ตามลำดับ จากการทดสอบพบว่า สารสกัดเปลือกทับทิม ใบหูกวาง ใบหูกวางสด กระเทียมสด ชาเขียวญี่ปุ่น และใบชะพลู ด้วยเอธานอล 50% และเอธานอล 50% ต้ม สามารถยับยั้งฤทธิ์เชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1

สารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ AH และ VP ได้แก่ มะเข็ญ สำหรับเชื้อ AH และ VH ได้แก่ ฝรั่ง ว่านหางจระเข้ และผลมะยมสด ส่วนเชื้อ VP และ VH ได้แก่ เหง้ากระชายม่วง หัว้าลิ้นงู ใบลำโพงขาว ใบขี้เหล็ก ใบมะระขี้้นก เปลือกว่านหางจระเข้ บัวบก ใบเทียนบ้านสด และกะเม็ง สำหรับสารสกัดสมุนไพรที่

มีฤทธิ์ยับยั้งเพียงเชื้อ VP ได้แก่ ผลมะระขี้นก ใบหม่อน และเซียงดาสด ส่วนสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเพียงเชื้อ VH ได้แก่ บัวบกสด สหราชายสไปรูลิน่า เซียงดา และใบขลุ่ แต่ไม่มีสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ AH เพียงชนิดเดียว จากการทดลองพบว่าสารสกัดสมุนไพรที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้ง 3 เชื้อ ได้แก่ ลำต้นต้อยติ่ง ใบฟ้าทะลายโจรสด เทียนข้าวเปลือก เมล็ดผักชีลาว ยางหนุมานนึ่งแห้ง

ได้คัดเลือกสารสกัดสมุนไพร 13 ชนิด มาทำการทดสอบหาค่าประสิทธิภาพและความเป็นพิษต่อไป ได้แก่ สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อทั้ง 3 ชนิด คือ กระเทียมสด เปลือกทับทิม ชาเขียวญี่ปุ่น ใบหูกวาง ใบชะพลู ใบมะระหวาน และเมล็ดเทียนตาตั๊กแตน สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อ VP และ VH ได้แก่ เหง้ากระชายม่วง หนุ่กล้วยาลิ้นงู ใบลำโพงขาว ใบขี้เหล็ก และใบมะระขี้นก และสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อ VP ได้แก่ ผลมะระขี้นก เนื่องจากขนาดของ Inhibition zone มีฤทธิ์ยับยั้งทั้ง 3 เชื้อมากที่สุด

การทดสอบหาค่า MIC/MBC ของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

ผลการทดสอบหาค่า MIC/MBC ของสารสกัดสมุนไพร 13 ชนิดต่อเชื้อ AH พบว่า สารสกัดกระเทียมสดด้วยด้วยเอธานอล 50% (MIC = 5 ppt; MBC = 10 ppt) มีประสิทธิภาพสูงสุด รองลงมาคือ สารสกัดเปลือกทับทิม (MIC = 9 ppt; MBC = 15 ppt) และสารสกัดใบหูกวางด้วยเอธานอล 50% ต้ม (MIC = 10 ppt; MBC = 20 ppt) เชื้อ VP พบว่า สารสกัดใบหูกวางด้วยด้วยเอธานอล 50% ต้ม (MIC = 2 ppt; MBC = 3 ppt) มีประสิทธิภาพสูงสุด รองลงมาคือ สารสกัดใบหูกวาง (MIC = 2 ppt; MBC = 4 ppt) และสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยเอธานอล 50% (MIC = 3 ppt; MBC = 20 ppt) ส่วนเชื้อ VH พบว่า สารสกัดใบหูกวางด้วยด้วยเอธานอล 50% ต้ม (MIC = 1 ppt; MBC = 9 ppt) มีประสิทธิภาพสูงสุด รองลงมาคือ สารสกัดใบหูกวาง (MIC = 1 ppt; MBC = 9 ppt) และสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยเอธานอล 50% (MIC = 2 ppt; MBC = 10 ppt) ดังแสดงในตารางที่ 1

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพร

การวิเคราะห์ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อกิ้งก่ามกรมระยะ PL15 โดยนำอัตราการตาย (%) และค่าความเข้มข้นของสารสกัด (ppt, part per thousand) มาสร้างกราฟแสดงแนวโน้ม probit แล้วหาค่า LC_{50} 96 h จากความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่งภายใน 96 ชั่วโมง ผลค่า LC_{50} 96 h จากการคำนวณ พบว่าสารสกัดใบมะระขี้นกสกัดด้วยเอธานอล 50% ต้ม (LC_{50} 96 h = 14.3 ppt) มีพิษระดับต่ำที่สุดต่อกิ้งก่ามกรม รองลงมาคือใบมะระขี้นก (LC_{50} 96 h = 13.8 ppt) และหนุ่กล้วยาลิ้นงูสกัดด้วยเอธานอล 50% (LC_{50} 96 h = 11.9 ppt) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพร 13 ชนิด ต่อเชื้อก่อโรค 3 ชนิด คือ

A. hydrophila, *V. paraheamolyticus* และ *V. harveyi* และความเป็นพิษต่อกุ้งก้ามกราม

สารสกัดสมุนไพร	วิธี พ.ร.	pH	<i>A. hydrophila</i>			<i>V. paraheamolyticus</i>			<i>V. harveyi</i>			LC ₅₀ (ppt)
			Inhibition zone (mm)	MIC (ppt)	MBC (ppt)	Inhibition zone (mm)	MIC (ppt)	MBC (ppt)	Inhibition zone (mm)	MIC (ppt)	MBC (ppt)	กุ้ง
กระเทียมสด (หัว) <i>Allium sativum</i> Linn.	1	6.95	11.53	5	10	17.58	7	10	19.8	15	20	2.83
	2	6.71	11.1	11	13	13.4	15	20	18.17	15	20	1.21
ทับทิม (เปลือก) <i>Punica granatum</i> L. var.	1	4.63	10.15	9	15	10.45	3	20	12.03	5	15	3.17
	2	5.18	12.05	10	20	14.82	6	20	14.05	5	15	3.04
ชาเขียวญี่ปุ่น (ใบ) <i>Camellia sinensis</i>	1	6.03	10.32	35	40	14.03	20	35	10.42	12	18	2.54
	2	5.73	12.15	10	25	14.8	15	30	11.1	10	15	5.07
หูกวาง (ใบ) <i>Terminalia catappa</i> L	1	4.88	13.93	10	40	18.45	2	4	18.3	1	12	3.04
	2	4.92	15.78	20	30	19.35	2	3	18.42	1	9	4.92
หูกวางสด (ใบ) <i>Terminalia catappa</i> L.	1	4.81	13.16	ND	ND	15.3	ND	ND	15.1	ND	ND	ND
	2	4.83	14.18	ND	ND	15.76	ND	ND	16.05	ND	ND	ND
ชะพลู (ใบ) <i>Piper sarmentosum</i> Roxber Humter	1	6.17	11.75	30	60	12.73	10	20	10.45	30	50	3.68
	2	5.79	7.73	20	30	7.20	25	30	8.50	25	30	3.20
เทียนดาตักแตน (เมล็ด) <i>Anethum graveolens</i> Linn	1	6.81	10.81	10	30	7.35	35	40	6.4	5	10	1.27
	2	6.13	-	ND	ND	7.6	35	50	6.5	5	10	0.42
กระชายม่วง (เหง้า) <i>Boesenbergia</i> sp.	1	7.05	-	ND	ND	8.96	10	25	8.9	3	20	0.63
	2	7.23	-	ND	ND	7.72	10	25	9.12	5	15	0.98
มะระหวาน (ใบ) <i>Sechium edule</i> Sw	1	5.63	9.42	10	45	11.1	20	70	7.7	2	10	2.64
	2	5.71	-	ND	ND	7.2	20	60	8.35	2	10	3.40
หน้่าลิ้นงู (ทั้งต้น) <i>Hedyotis corymbosa</i> Lamk.	1	5.97	-	ND	ND	12.56	100	160	8.46	30	50	11.9
	2	5.89	-	ND	ND	12.65	100	140	12.73	20	30	11.8
ลำโพงขาว (ใบ) <i>Catura metet</i> L. var metel	1	5.97	-	ND	ND	12.56	110	130	8.46	30	40	10.3
	2	5.89	-	ND	ND	12.65	100	120	12.73	30	60	9.9
ซีเหล็ก (ใบ) <i>Senna siamea</i> (Lam.) Irwin & Barnaby	1	4.03	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND
	2	4.04	-	ND	ND	10.13	50	60	11.7	20	40	8.9
มะระขี้้นก (ใบ) <i>Momordica charantia</i> Linn.	1	6.33	-	ND	ND	6.33	40	80	8.51	6	9	13.8
	2	6.19	-	ND	ND	8.8	70	90	8.67	3	6	14.3
มะระขี้้นก (ผล) <i>Momordica charantia</i> Linn.	1	7.0	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND
	2	6.9	-	ND	ND	9.07	90	100	-	ND	ND	9.4

หมายเหตุ ND = No Data

ตารางที่ 1(ต่อ)

สารสกัดสมุนไพร	วิธี ที่	pH	<i>A. hydrophila</i>			<i>V. parahaemolyticus</i>			<i>V. harveyi</i>			LC ₅₀ (ppt)
			Inhibition zone (mm)	MIC (ppt)	MBC (ppt)	Inhibition zone (mm)	MIC (ppt)	MBC (ppt)	Inhibition zone (mm)	MIC (ppt)	MBC (ppt)	กึ่ง
สระระแห่ (ใบ) <i>Mentha condifolia</i> Opiz.	1	6.21	8.5	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND
	2	6.18	10.46	ND	ND	8.6	ND	ND	8.15	ND	ND	ND
น้อยหน่า (ใบ) <i>Annonasquamosa</i> L.	1	5.24	-	ND	ND	-	ND	ND	7.1	ND	ND	ND
	2	5.12	9.4	ND	ND	9.71	ND	ND	6.3	ND	ND	ND
ฟ้าทะลายโจร (ต้น + ใบ) <i>Andrographis paniculata</i> Wall.	1	7.44	9.45	ND	ND	7.4	ND	ND	6.8	ND	ND	ND
	2	7.14	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND
Control	-	-	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND
Ethanol 50%	-	-	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND = No Data

วิจารณ์ผล

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้เอธานอล 50% เป็นตัวทำละลาย เมื่อเปรียบเทียบกับผล clear zone กับงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้า พบว่า สารสกัดสมุนไพรบางชนิดได้ผลสอดคล้องกัน ได้แก่ Kim (1997) รายงานว่าสารสกัดกระเทียมสดด้วยเอธานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดี หยาดรุ้ง (2544) รายงานว่าสารสกัดกระเทียมสดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* Ponce et al. (2003) รายงานว่าสารสกัดสระระแห่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ส่วน Gislene et al. (2000) รายงานว่าสารสกัดทับทิมและสระระแห่ด้วยเอธานอล อัตราส่วน 1:1 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เช่นกัน และ Kloucek et al. (2005) รายงานว่าใบหูกวางสกัดด้วยเอธานอล 80% สามารถต่อต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนได้ 9 ชนิด

นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบค่า MIC/MBC กับงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้ พบว่าสารสกัดสมุนไพรบางชนิดได้ค่าต่างกันเล็กน้อย ได้แก่ อังคณา (2546) รายงานว่าสารสกัดมะระขี้นก (ไม่ระบุส่วนที่ใช้) ด้วยเอธานอล ภายใต้เครื่องซอพต์เลท สามารถยับยั้งเชื้อไวรัส ที่ MIC = 2.5 ppt แต่จากงานวิจัยนี้ พบว่าสารสกัดใบมะระขี้นกมีค่า MIC = 40-70 ppt และสารสกัดผลมะระขี้นกมีค่า MIC = 9 ppt ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธีการสกัดที่ต่างกัน

สำหรับสมุนไพรบางชนิดที่ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบเพียงค่า inhibition zone แต่มีรายงานอื่นที่ศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรเหล่านี้ ได้แก่ สถาพรและคณะ (2539) รายงานว่าสารสกัดมะยมด้วยเอธานอล ที่ความเข้มข้น 1,987-3,548 ppm มีความเป็นพิษต่อลูกกุ้งกุลาดำ PL15 ระดับต่ำ และ เต็มดวง (2540) รายงานว่า

สารสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยเอทานอล มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ค่า MIC= 16 ppm และที่ความเข้มข้น 688 ppm มีความเป็นพิษต่อลูกกุ้งกุลาดำ PL20 ระดับต่ำ

สรุปผล

สำหรับเชื้อ AH และ VP พบว่าสารสกัดใบหูกวางด้วยเอทานอล 50% ต้ม มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสูงที่สุด (AH = 15.78, VP = 19.35 มม.) ส่วน VH พบว่าสารสกัดกระเทียมสดด้วยเอทานอล 50% มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสูงที่สุด (19.8 มม.) ค่าประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ AH จากค่า MIC/MBC พบว่าสารสกัดกระเทียมสดด้วยเอทานอล 50% มีประสิทธิภาพสูงสุด (MIC = 5 ppt; MBC = 10 ppt) ส่วนเชื้อ VP และ VH พบว่าสารสกัดใบหูกวางด้วยเอทานอล 50% ต้ม มีประสิทธิภาพสูงสุด (VP : MIC = 2 ppt; MBC = 3 ppt, VH : MIC = 1 ppt; MBC = 9 ppt) และพบว่าสารสกัดใบมะระขี้นกด้วยเอทานอล 50% ต้ม (LC_{50} 96 h = 14.3 ppt) มีพิษต่อลูกกุ้งก้ามกรามระดับต่ำที่สุด

จากการทดลองพบว่าสารสกัดเปลือกทับทิม ใบหูกวาง กระเทียมสด ชาเขียวญี่ปุ่น และใบชะพลู มีฤทธิ์และประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อได้ทั้ง 3 ชนิด มีความเป็นพิษต่อลูกกุ้งก้ามกรามระดับต่ำ และหาง่ายในท้องถิ่น ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเพื่อผลิตเป็นยารักษาโรคแบคทีเรีย และนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไป

จากการทดลองครั้งนี้ จะเห็นได้ว่าสามารถนำสารสกัดสมุนไพรไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคแบคทีเรียในกุ้งก้ามกราม การใช้สมุนไพรทดแทนยาปฏิชีวนะเป็นทางเลือกที่ดีทางหนึ่ง เนื่องจากเป็นสารสกัดธรรมชาติ มีความปลอดภัยสูง ไม่มีสารตกค้าง ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

คำขอบคุณ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก ทุนวิจัยและพัฒนา สำนักงานวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2547-2549

เอกสารอ้างอิง

- กุ้งก้ามกราม. 2548. โรคกุ้งก้ามกราม. วารสารสัตวน้ำ. 16.(185):121-124.
 เต็มดวง สมศิริ. 2540. การศึกษาฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรต่อเชื้อไวรัสโอ. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง.
 ปภาศิริ ศรีโสภณภรณ์. 2537. โรคและพยาธิของสัตว์น้ำ. สำนักพิมพ์ริ้วเขียว. กรุงเทพมหานคร. 184 หน้า.

- สุจิตรา สหสันถฤกษ์พงษ์. 2541. การศึกษาประสิทธิภาพของ Tea Polyphenal ในการป้องกันโรคไวรัสโอชิสในกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. 90 หน้า.
- สถาพร ติเรกบุษราคม, สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์, อังคณา หิรัญสาลี และลิลา เรืองแป้น. 2539. ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยบางชนิดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 7/2539. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. 7 หน้า
- สุปราณี ชินบุตร. 2545. ยาดกค่างในเนื้อกุ้ง. วารสารการประมง. 55.(3):213-214.
- ลิลา เรืองแป้น. 2545. ปัญหาปลาปฏิชีวนะกับการเพาะเลี้ยงกุ้ง. วารสารการประมง. 55.(3):203-211.
- หยาดรุ้ง สุวรรณรัตน์. 2544. ประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. 96 หน้า.
- อังคณา หิรัญสาลี. 2546. ใช้สมุนไพรไทยต้านไวรัสหัวเหลือง. วารสารสัตว์น้ำเศรษฐกิจ. 2.(8):69-72.
- Finney, D. J. 1980. probit analysis. Cambridge University. New York. 333 pp.
- Gislene, G. F. Nascimento, Juliana Locatelli, Paulo C. Freitas and Giuliana L. Silva. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 21.
- Immanuel, G., V. C. Vincybai, V. Sivaram, A. Palavesam and M. P. Marlan. 2004. Effect of butanalic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Peneaus indicus* juveniles. *Aquaculture*. 236.(1-4):53-65.
- Inglis, Valerie, Ronald J. Roberts and Niall R. Bromage. 1993. Bacterial diseases of fish. Blackell Scientific Publications. Oxford. 312 pp
- Kloucek, P., Z. Polesny, B. Svobodova, E. vlkova and L. Kokoska. 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. *Journal of Ethnopharmacology*. 99:309-312.
- Kim, R. Finer.1997. Evaluation of Natural Compounds for Antimicrobial Activity in the Introductory Microbiology Laboratory. *The American Biology Teacher*. 59.(1):p.44-47.
- Ponce, A.G., R. Fritz, C. del Valle and S. I. Roura. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm. – Wiss. μ - Technol*. 36:679-684.