ผลของการใช้สารสกัดสมุนไพรร่วมกับนาโน-เคอร์ซิตินผสมในอาหารต่อการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

พงศกร น้อยมูล

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2564

ผลของการใช้สารสกัดสมุนไพรร่วมกับนาโน-เคอร์ซิตินผสมในอาหารต่อการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

พงศกร น้อยมูล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ
สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ผลของการใช้สารสกัดสมุนไพรร่วมกับนาโน-เคอร์ซิตินผสมในอาหารต่อการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

พงศกร น้อยมูล

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ

พิจารณาเห็นชอบโดย **อาจารย์ที่ปรึกษา**

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนกันต์ จิตมนัส)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุดาพร ตงศิริ)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.จงกล พรมยะ)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุดมลักษณ์ สมพงษ์)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)
รองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน
อธิการบดี มหาวิทยาลัยแม่โจ้
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ชื่อเรื่อง ผลของการใช้สารสกัดสมุนไพรร่วมกับนาโน-เคอร์ซิตินผสมในอาหารต่อการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

ชื่อผู้เขียน นายพงศกร น้อยมูล

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนกันต์ จิตมนัส

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรและนาโน-เคอร์ซิตินต่อการเจริญเติบโตและการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล โดยแบ่งการทดสอบเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกทดสอบผลของสารสกัดจากสมุนไพรไทย โอทู-ฟลาโวมอล (บริษัท เวิลด์ โกรว์ จำกัด) ต่อการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *S. agalactiae* โดยใช้ปลานิลขนาด 40±10 กรัม จำนวน 20 ตัว ปล่อยในกระชังขนาด 1 ตารางเมตร ทดลองให้อาหาร 5 สูตร คือ อาหารควบคุม อาหารผสมสารสกัด 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ให้อาหาร 4-5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว วันละ 2 มื้อ ทดลอง 8 สัปดาห์ พบว่า ปลานิลในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมสารสกัด 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัมนั้นมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มอื่น ๆ ในส่วนของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน อัตราการแลกเปลี่ยนเนื้อ อาหารที่ปลากิน และอัตรารอด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) หลังการทดสอบฉีดเชื้อ *S. agalactiae* 1 x 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตรต่อตัว 10 วัน พบว่า กลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสูงที่สุด รองลงมาคือกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรและแนวโน้มการตายลดลงตามระดับที่เพิ่มขึ้นของสารสกัด ในขั้นตอนที่ 2 ทดสอบใช้ผลิตภัณฑ์นาโน-เคอร์ซิตินร่วมกับสารสกัดจากสมุนไพรไทย โอทู-ฟลาโวมอล ผสมอาหารเพื่อเสริมการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ *S. agalactiae* โดยปล่อยปลานิลขนาดเริ่มต้น 40±10 กรัม จำนวน 20 ตัว ลงในกระชังขนาด 1 ตารางเมตร ทดลองให้อาหาร 4 สูตรคือ อาหารควบคุม อาหารผสมสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรร่วมกับนาโน-เคอร์ซิติน 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ให้อาหาร 4-5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว วันละ 2 มื้อ ทดลอง 8 สัปดาห์ พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของปลานิลทั้ง 4 กลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่น้ำหนักของกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-

เคอร์ซิตินที่ 25 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมนั้นมีแนวโน้มการเจริญเติบโตที่ดีกว่ากลุ่มอื่น ในส่วนของอัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ กลุ่มสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในส่วนของอาหารที่ปลากิน กลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 50 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อัตรารอดตายไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กิจกรรมไลโซไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดร่วมกับนาโน-เคอร์ซิตินกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) เมื่อเข้าสัปดาห์ที่ 6 และ 8 กิจกรรมกระบวนการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนและกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ค่ากลูตาไธโอนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างก่อนทดลองและหลังการทดลอง และค่ามาลอนไดอัลดีไฮด์พบว่าก่อนการทดลองและหลังการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่เมื่อแนวโน้มของค่ามาลอนไดอัลดีไฮด์ลดลงตามระดับที่ได้รับสารสกัดร่วมกับนาโน-เคอร์ซิติน และการทดสอบฉีดเชื้อ *S. agalactiae* 1 x 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตรต่อตัว พบว่าใน 10 วันกลุ่มควบคุมได้มีอัตราการตายสูงที่สุด รองลงมาคือกลุ่มที่ได้รับสารสกัดร่วมกับนาโน-เคอร์ซิติน 25 จากการศึกษาพบว่าควรใช้สารสกัด 0.1 มิลลิลิตรและนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จะสามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโต ลดปริมาณการใช้อาหาร กระตุ้นการทำงานของกิจกรรมไลโซไซม์ เพิ่มปริมาณสารกลูตาไธโอนและลดปริมาณของสารมาลอนไดอัลดีไฮด์

คำสำคัญ : ปลานิล, เคอร์ซิตินอนุภาคนาโน, สารสกัดธรรมชาติ, ภูมิคุ้มกัน, สเตรปโตคอคคัส

Title EFFICACY OF DIETARY HERBAL EXTRACT AND NANO-QUERCETIN ON GROWTH, INNATE IMMUNE RESPONSES, ANTIOXIDANT AND RESISTANCE OF NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) AGAINST *Streptococcus agalactiae* INFECTION

Author Mr. Pongsakorn Noimoon

Degree Master of Science in Fisheries Technology and Aquatic Resources

Advisory Committee Chairperson Assistant Professor Dr. Chanagun Chitmanat

ABSTRACT

This research aimed to determine the effects of herbal extract and Nano-Quercetin on growth performances and disease resistance against *Streptococcus agalactiae* in tilapia. The experiment was divided into 2 steps. The first experiment, the commercial herbal extract (Otwo flavomol, World Grow Co., Ltd.) was dietary applied to investigate its effects on growth performances and disease resistance against *S. agalactiae*. Tilapia (40 grams, 20 fish/m^3) were divided into 5 groups before being fed for 8 weeks with Herbal extract 0 (Control), herbal extract 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 mL/1 kg feed. The feeding rate was 4-5 % *body weight per day*; feeding was applied twice a day. The results showed that weight gain of fish fed with herbal extract 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 mL additive feeds enhanced significantly ($P<0.05$) when compared with control. But average daily gain feed intake and survival were not significantly different ($P>0.05$). After challenge with *S. agalactiae*, the survival rates of fish fed with herbal extract additive feeds were less than a control group; the higher herbal extract feeding, the greater survival rates were noticed. The second experiment, the effects of herbal extract with Nano-Quercetin dietary supplementation on growth performances, immune responses, and resistance of Nile tilapia against *S. agalactiae* were investigated. Fish (40 grams, 20 fish/m^3) were divided into 4 groups before being fed

for 8 weeks with Herbal extract 0 (Control), herbal extract 0.1 mL+25 mg Nano-Quercetin, herbal extract 0.1 mL +50 mg Nano-Quercetin and herbal extract 0.1 mL+75 mg Nano-Quercetin. Fish were fed experimental diets at a rate of 4-5 % body weight/day. The results showed that weight gain, average daily gain, and survival rate were not significantly different (P>0.05). However, feed intake and FCR of tilapia fed with herbal extract 0.1+ Nano-Quercetin group decreased significantly (P<0.05) when compared with control. The serum lysozyme activities of tilapia fed with herbal extract + 25, 50 and 75 mg of Nano-Quercetin enhanced significantly (P<0.05) when compared with control after the 6^{th} to 8^{th} week of the experiment. While phagocytosis activity and respiratory burst activity was not significantly different (P>0.05). Malondialdehyde of fish before and after feeding herbal extract 0.1+ Nano-Quercetin did not significantly decrease (P>0.05). But tilapia fed with herbal extract 0.1+ Nano-Quercetin showed a highly significant difference in glutathione (P<0.05). After challenge with *S. agalactiae*, the survival rates in groups fed with herbal extract 0.1+ 75 mg Nano-Quercetin were 96.67%, herbal extract 0.1 + 50 mg Nano-Quercetin were 90.00%, and herbal extract 0.1 25 were 83.33% mg Nano-Quercetin. In this experiment group herbal extract 0.1+ 25 mg Nano-Quercetin can enhance growth performances, decrease FCR, stimulate the lysozyme activity, increase the amount of glutathione, and reduce the amount of malondialdehyde of tilapia.

Keywords : Nile tilapia, Nanoparticles quercetin, Herbal extract, Immune response, Streptococcus agalactiae

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนกันต์ จิตมนัส ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุดาพร ตงศิริ กรรมการที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.จงกล พรมยะ กรรมการที่ปรึกษา ผู้ให้ความเมตตากรุณา ช่วยเหลือสนับสนุนและให้คำแนะนำกับปัญหาอุปสรรคต่าง ๆ สำหรับการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ทั้งสละเวลาอันมีค่าในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทะนงศักดิ์ สัสดีแพง ผู้ให้ความเมตตากรุณาช่วยเหลือสนับสนุนความรู้ด้านการทำผลิตภัณฑ์นาโน คอยให้คำปรึกษาและให้ยืมใช้อุปกรณ์ส่วนตัวในการทดลอง จนทำให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จในการศึกษา

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.สุรชัย พิกุลแก้ว ผู้ให้ความกรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ลำปาง ที่ได้อนุเคราะห์ให้ใช้สถานที่ ห้องปฏิบัติการ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านในคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ ที่ให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา ทุน สกว พวอ และบริษัท เวิลด์ โกรว์ จำกัด ที่ส่งเสริมการศึกษาร่วมทั้งให้การสนับสนุนทุนทั้งด้านการเรียนและการดำเนินชีวิต ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และเป็นกำลังใจที่ดี จนทำให้ผู้เขียนประสบความสำเร็จในการศึกษา

พงศกร น้อยมูล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญ ..... ซ

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญภาพ ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร 3

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) 3

ชีววิทยาของปลานิล 3

ปัญหาการเลี้ยงปลานิลของไทย 4

โรคติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตโคซิส (Streptococcosis) 5

ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลา 6

สารในน้ำเลือดและเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน 7

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 8

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) 9

ฟลาโวนอยด์-เคอร์ซิติน 10

เทคโนโลยีนาโน-พอลิเมอริกไมเซลล์ (Polymeric Micelles) 11

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 13

บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัยและวิธีการ 15
อุปกรณ์ 15
การวางแผนการทดลอง 15
การทดลองช่วงที่ 1 15
การทดลองช่วงที่ 2 16
สัตว์ทดลอง 16
การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง 17
การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ 18
วิเคราะห์ข้อมูลด้านการเจริญเติบโต 18
น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น 18
น้ำหนักอาหารที่ปลากิน 19
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ 19
อัตรารอด 19
การพัฒนาเคอร์ซิติน 19
ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย 20
การตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระ 20
ตรวจสอบ Thio barbituric acid reactive substance 20
ตรวจสอบ Glutathione 20
ตรวจสอบผลการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลานิล 21
กระบวนการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (respiratory burst activity) 22
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ 22
ระยะเวลาในการวิจัยและสถานที่ดำเนินการ 23
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 24
ผลการทดลอง 24

ผลการทดลองช่วงที่ 1 ระดับของสารสกัดที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลานิล.....24
ผลการทดลองช่วงที่ 2 การนำเอาระดับของสารสกัดที่ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมาร่วมกับสารนาโน-เคอร์ซิติน.....26
วิจารณ์ผลการทดลอง.....32
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....37
สรุปผลการศึกษา.....37
ข้อเสนอแนะ.....37
บรรณานุกรม.....38
ภาคผนวก.....45
ภาคผนวก ก การตรวจสอบผลการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันไม่จำเพาะของปลา.....46
การวิเคราะห์กระบวนการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน.....48
ภาคผนวก ข ประมวลภาพการดำเนินงานวิจัย.....50
ประวัติผู้วิจัย.....54

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ปัจจัยและวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารอาหาร.....17

ตารางที่ 2 ปริมาณเปอร์เซ็นต์ของความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน และเยื่อใยในอาหารผสมสารสกัดร่วมกับนาโน-เคอร์ซิติน.....17

ตารางที่ 3 ปัจจัยและวิธีการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ 18

ตารางที่ 4 ค่าคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงปลานิลในกระชัง.....18

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของปลานิลที่ได้รับสารสกัดในความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....24

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลานิลที่ได้รับสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....26

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 Size distribution report by intensity ของ นาโน-เคอร์ซิติน วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Malvern.....19

ภาพที่ 2 อัตราการการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเฉลี่ยรายสัปดาห์ของปลานิลที่ได้รับสารสกัดในความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....25

ภาพที่ 3 อัตราการตายสะสมของปลานิลที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้นต่างกันเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ S. agalactiae 1 x 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตรต่อตัว.....25

ภาพที่ 4 อัตราการการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเฉลี่ยรายสัปดาห์ของปลานิลที่ได้รับสารสกัดและ นาโน-เคอร์ซิตินในความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....27

ภาพที่ 5 กิจกรรมไลโซไซม์ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 8.....28

ภาพที่ 6 กิจกรรมกระบวนการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริม สารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 8.....28

ภาพที่ 7 กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริม สารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 8.....29

ภาพที่ 8 ปริมาณกลูต้าไธโอนของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสารสกัด 0.1 มิลลิลิตร ผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมตั้งแต่เริ่มการทดลอง ถึงสิ้นสุดการทดลอง.....30

ภาพที่ 9 ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสารสกัด 0.1 มิลลิลิตร ผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมตั้งแต่เริ่มการทดลอง ถึงสิ้นสุดการทดลอง.....30

ภาพที่ 10 อัตราการตายสะสมของปลานิลที่ได้รับสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมต่างกันเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ S. agalactiae ปริมาณ 1 x 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตรต่อตัว.....31

มหาวิทยาลัยแม่โจ้
MAEJO UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

ปลานิลได้รับความนิยมจากตลาดทั้งในประเทศและต่างประเทศ เนื่องจากมีรสชาติดี เนื้อแน่น เจริญเติบโตและแพร่พันธุ์ได้รวดเร็ว อุตสาหกรรมการเลี้ยงปลานิลจึงมีการขยายตัวอย่างมากในประเทศ มีการผลิตปลานิลได้มากกว่า 217,928 ตัน ในปี 2560 คิดเป็นร้อยละ 52.73 ของปริมาณการผลิตปลาน้ำจืด (fishery statistics analysis and research group, 2019) ในขณะที่ผลผลิตปลานิลทั่วโลกมีสูงถึง 4,200,000,000 ตันในปี 2559 (FAO, 2018) ธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำช่วยสร้างงาน สร้างรายได้ เป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่สำคัญ การเพาะเลี้ยงปลานิลในไทยยังมีโอกาสขยายตัวเพิ่มได้อีก เนื่องจาก ตลาดปลานิลทั่วโลกมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ หากมีการพัฒนาการเลี้ยงให้ได้มาตรฐานตามแต่ละประเทศต้องการ อย่างไรก็ตามเกษตรกรมักจะเลี้ยงปลานิลหนาแน่นมากเพื่อให้ได้ผลผลิตต่อรอบสูง จึงส่งผลให้ปลาที่เลี้ยงโตช้า ขนาดปลาไม่สม่ำเสมอ เป็นโรคได้ง่าย ทำให้จำหน่ายไม่ได้ราคา (คีรี, 2542)

แม้ว่าปลานิลสามารถเลี้ยงได้ทั้งในบ่อดินและในกระชัง อุปสรรคที่สำคัญของการเพาะเลี้ยงปลานิล คือ โรคปลานิล ซึ่งปัจจุบันปลานิลเป็นโรคได้ง่ายขึ้น โดยมีสาเหตุเหนี่ยวนำจากการขนย้ายที่อาจจะทำให้ปลาเครียดหรือมีบาดแผล การปล่อยเลี้ยงหนาแน่นมากและขาดการจัดการที่ดี (Ghiraldelli et al., 2006) รวมทั้งความแปรปรวนของสภาพแวดล้อม ในขณะที่การใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันรักษาโรคไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคและทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นมากจนผู้เลี้ยงไม่สามารถแข่งขันทางการตลาดได้ ดังนั้นการที่จะประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงปลานิลจะต้องมีการจัดการสุขภาพที่ดี ได้แก่ การเตรียมบ่อที่ดี ใช้ลูกพันธุ์ที่ดีมีคุณภาพ รักษาความสะอาดบ่อ เครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ เพื่อลดโอกาสความเสี่ยงในการเกิดโรคและแพร่ระบาดของโรคสัตว์น้ำ (ชนกันต์, 2556)

โรคติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตโคซิส (streptococcosis) เป็นโรคหลักที่สร้างความเสียหายแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิล พบระบาดรุนแรงในหน้าร้อน สามารถทำให้ปลาตายจำนวนมากในเวลาอันสั้นหากมีการติดเชื้อรุนแรง อัตราการตายจากโรคนี้พบสูงเมื่ออุณหภูมิน้ำสูงกว่า 26 °C โรคติดเชื้อนี้สามารถติดต่อจากปลาที่เป็นโรคที่อาศัยอยู่ในบ่อหรือกระชังเดียวกัน (Mian et al., 2009) เพื่อบรรเทาความเสียหายจากโรคติดเชื้อดังกล่าว ได้มีการทดลองหาสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะสารสกัดไฟโตเจนนิก (phytogenic extract) ที่หลากหลายมาผสมอาหารให้ปลานิล สารสกัดไฟโตเจนนิกเป็นส่วนผสมของพืช สมุนไพร เครื่องเทศ น้ำมันหอมระเหยซึ่งช่วยกระตุ้นการกินอาหาร การย่อยอาหารและการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้มีแนวคิดที่จะใช้สารเคอร์ซิตินมาผสมในอาหารเลี้ยงปลา โดยเคอร์ซิตินเป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) อยู่ในหมู่ฟังชั่นของฟลาโวนอล (flavonols) (วิภพ, 2556) ซึ่งเป็นสารที่พบมากและหาได้ง่ายในพืชหรือพืชสมุนไพร และผลไม้ (Buchweitz et al., 2016) เคยมีการศึกษาสารฟลาโวนอลใช้ในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียจากใบฝรั่งเชื่อกันว่าเป็นผลจากฤทธิ์ของเคอร์ซิติน มาช่วยต้านเชื้อ (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010) ทั้งนี้เคอร์ซิตินเป็นสารที่ไม่ละลายในน้ำจึงมีความคิดเสริมที่จะใช้เทคนิคนำสารที่เหมาะสมต่อการเคลือบเคอร์ซิตินโดยการให้อยู่ในรูปแบบอนุภาคนาโน (nanoparticle) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการละลายในน้ำ และให้สามารถดูดซึมได้ง่ายขึ้น (ฐิศิรักษ์ และประณีต, 2557)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาระดับการใช้ที่เหมาะสมของสารสกัดสมุนไพร ต่อประสิทธิภาพของการเจริญเติบโต และการต้านทานเชื้อ *S. agalactiae* ของปลานิล

2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรร่วมกับนาโน-เคอร์ซิตินต่อประสิทธิภาพของการเจริญเติบโต และการต้านอนุมูลอิสระและการเสริมภูมิคุ้มกันต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลานิล

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบระดับของอัตราการใช้สารสกัดสมุนไพรที่เหมาะสมในการเลี้ยงปลานิล และสามารถนำไปใช้ได้จริง ให้คุ้มค่ากับการลงทุน

2. ได้รู้ถึงระดับของการใช้สารสกัดสมุนไพรร่วมกับนาโน-เคอร์ซิตินที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลานิล และสามารถนำไปใช้ได้จริงคุ้มค่ากับการลงทุน และลดระยะเวลาการเลี้ยงลงจากการที่ปลาเติบโตได้ไวขึ้น

3. ลดความสูญเสียของปลาที่ตายจากการติดเชื้อโรค *Streptococcus agalactiae*

4. เพื่อให้รู้ถึงประโยชน์จากสารสกัดธรรมชาติและลดการใช้ยาปฏิชีวนะ

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Class: Teleostei

Order: Perciformes

Family: Cichlidae

Genus: *Oreochromis*

Species: *Oreochromis niloticus*

(ITIS. n.d.)

ชีววิทยาของปลานิล

ปลานิล มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* มีริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถวลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาลและมีลายพาดขวาง 9 ถึง 10 แถบ บริเวณครีบหลัง ครีบก้น และครีบหางมีจุดขาวและเส้นสีดำตัดขวาง มีครีบหลังอันเดียวประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 15 ถึง 18 อันและครีบอ่อน 12 ถึง 14 อันครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 3 อัน และก้านครีบอ่อน 12 ถึง 14 อัน ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล ตรงกลางเกล็ดมีสีเข้มที่กระดูกแก้มมีสีเข้มอยู่ 1 จุด ปลานิลมีนิสัยชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง สามารถกินอาหารได้ทั้งพืชและสัตว์ หรือแพลงก์ตอนพืชและสัตว์ เป็นปลาที่กินอาหารในเวลากลางวันและหยุดกินในเวลากลางคืน สามารถกินอาหารได้ทั้งผิวน้ำ กลางน้ำ และก้นบ่อ (กรมประมง, ม.ป.ป.-ก)

ปลานิลสามารถผสมพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี โดยใช้ระยะเวลา 2 ถึง 3 เดือนต่อครั้ง ระยะเวลาการผสมพันธุ์สามารถลดลงได้หากปลาได้รับอาหารเพียงพอและเหมาะสม โดยใน 1 ปีจะสามารถผสมได้ 5 ถึง 6 ครั้ง ความสมบูรณ์เพศของปลานิลจะพัฒนาสมบูรณ์เมื่อมีขนาด 6.5 เซนติเมตรขึ้นไป รูปร่างภายนอกของปลานิลเพศผู้และเพศเมียจะมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก แต่จะสามารถสังเกตลักษณะเพศได้โดยการดูติ่งเพศ ใกล้บริเวณกับช่องทวาร โดยปลาเพศผู้จะมีติ่งเพศเรียวยาวยื่นออกมา ปลาเพศเมียติ่งเพศจะมีขนาดกลมใหญ่และมีรูช่วงกลางติ่ง ขนาดปลาที่จะแยกเพศได้ชัดเจนจะต้องมีความ

ตั้งแต่ 10 เซนติเมตรขึ้นไป สำหรับปลาที่โตเต็มที่สามารถสังเกตเพศได้โดยการดูสีที่ลำตัว โดยในปลาเพศผู้บริเวณใต้คางและลำตัวจะมีสีเข้มกว่าปลาเพศเมีย นอกจากนี้ปลาเพศผู้จะมีลักษณะใหญ่กว่าปลาเพศเมีย (กรมประมง, ม.ป.ป.-ข)

ในช่วงผสมพันธุ์วางไข่ ปลานิลเพศผู้จะแยกออกจากฝูงไปสร้างรัง โดยปลาจะเลือกบริเวณเชิงลาดหรือก้นบ่อที่มีระดับลึกระหว่าง 0.5 ถึง 1 เมตร ปลาเพศผู้จะใช้หัวปักลงตั้งฉากแล้วเคลื่อนไหวลำตัวเพื่อเขี่ยดินตะกอนออก พร้อมกับใช้ปากงับเศษสิ่งของต่างๆออกไปทิ้งนอกรัง เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 20 ถึง 35 เซนติเมตร ลึกประมาณ 3 ถึง 6 เซนติเมตรเมื่อสร้างรังเรียบร้อยแล้วปลาเพศผู้จะหวงอาณาเขตโดยจะไล่ปลาอื่นให้ออกจากบริเวณนั้น และแสดงพฤติกรรมเกี้ยวปลาเพศเมีย เมื่อเลือกปลาเพศเมียแล้วจะแสดงอาหารจับคู่กันโดยใช้หางดีดและกัดกันเบา ๆ และเริ่มการผสมวางไข่ โดยปลาเพศผู้จะใช้บริเวณหน้าผากดุนที่ใต้ท้องเพศเมียเพื่อกระตุ้นให้วางไข่ ปลาจะวางไข่ครั้งละ 10 ถึง 15 ฟอง และปลาเพศผู้จะว่ายไปเหนือไข่พร้อมกับปล่อยน้ำเชื้อลงไปเพื่อผสมกับไข่จากนั้นแม่ปลาจะเก็บไข่ที่ได้รับการผสมไว้ในปาก โดยจะทำเช่นนี้จนกว่าการผสมพันธุ์จะแล้วเสร็จ ปริมาณไข่ที่วางรวมกันจะอยู่ที่ประมาณ 50 ถึง 600 ฟอง ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์และขนาดของแม่ปลา ใช้เวลาประมาณ 1 ถึง 2 ชั่วโมง แม่ปลาจะว่ายออกจากรังและพ่อปลาจะคอยหาโอกาสเลือกปลาเพศเมียตัวอื่นต่อ (กรมประมง, ม.ป.ป.-ข)

ความต้องการสารอาหารในปลานิล ระดับโปรตีนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลานิลจะแตกต่างกันตามช่วงอายุ สำหรับลูกปลาวัยอ่อน และลูกปลานิ้วจะต้องการโปรตีนที่ระดับ 30 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์แต่ในปลาใหญ่จะต้องการโปรตีนที่ระดับ 25 ถึง 30 เปอร์เซ็นต์และความถี่ในการให้อาหารควรให้ปริมาณ 4 ถึง 5 ครั้งต่อวันเนื่องจากว่าปลานิลเป็นปลาที่ไม่มีกระเพาะอาหารจริงจึงทำให้กินอาหารได้ทีละน้อย และในส่วนของอัตราการให้อาหารปลานิลสำหรับลูกปลาวัยอ่อน และลูกปลานิ้วจะมีอัตราการให้อาหารที่ 6 ถึง 8 เปอร์เซ็นต์ในปลาใหญ่จะให้อาหารลดลงเหลือเพียง 3 ถึง 4 เปอร์เซ็นต์ (กรมประมง, ม.ป.ป.-ก)

ปัญหาการเลี้ยงปลานิลของไทย

ถึงแม้ว่าปลานิลเป็นปลาที่สามารถเลี้ยงได้ง่าย มีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว แต่ยังมีปัญหาการเลี้ยงปลานิลในประเทศ ผลผลิตปลานิลจากการเพาะเลี้ยงในปี 2562 ปริมาณ 213,871 ตัน บนเนื้อที่เลี้ยงปลานิลทั้งประเทศ 445,778 ไร่ ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ 480 กิโลกรัม เมื่อเทียบกับปี 2561 พบว่า ผลผลิตลดลงร้อยละ 1.3 เนื้อที่เลี้ยงลดลงร้อยละ 0.3 และผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ลดลงร้อยละ 1.0 โดยผลผลผลิตปลานิลในปี 2562 ลดลง เนื่องจากเกษตรกรประสบภัยแล้งเร็วและยาวนานกว่าปี 2561 ส่งผลให้ปริมาณน้ำในเขื่อน อ่างเก็บน้ำและแหล่งน้ำตามธรรมชาติมีน้อย ประกอบกับช่วงเดือนสิงหาคมถึงกันยายน เกษตรกรประสบกับพายุโพดุลและคาจิกิในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและ

ภาคเหนือบางจังหวัด ส่งผลให้ผลผลิตปลานิลเสียหาย ทำให้ผลผลิตปลานิลระดับประเทศลดลง อย่างไรก็ตามจากการประชุมคณะอนุกรรมการบริหารจัดการกลุ่มสินค้าประมงเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2562 ณ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์มีมติให้คงปริมาณสินค้าปลานิลให้คงอยู่ในระดับประมาณ 200,000 ตันต่อปี เพื่อป้องกันมิให้ผลผลิตออกมาล้นตลาดจนกระทบต่อราคา (เกวลิน, 2563)

นอกจากปัญหาปริมาณน้ำไม่เพียงพอต่อการเลี้ยง ปัญหาคุณสมบัติของน้ำที่ไม่เหมาะสม ทำให้การเลี้ยงปลานิลไม่ประสบผลสำเร็จเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีปัญหาการเลี้ยงปลาที่หนาแน่น การผูกขาดของลูกพันธุ์ปลาและอาหาร ต้นทุนอาหารที่สูง ขายปลาไม่ได้ราคาที่เหมาะสมและที่สำคัญ คือ โรคติดเชื้อในปลานิล เมื่อปลาแสดงอาหารผิดปกติชาวบ้านมักจะสอบถามจากพนักงานขายจากบริษัท และกลุ่มชาวบ้านที่เลี้ยงปลากันเอง ซึ่งบางทีการปรึกษากันเองของชาวบ้านในบางครั้งอาจจะใช้ยาปฏิชีวนะมาเลี้ยงร่วมด้วย (กรมประมง, ม.ป.ป.-ข)

การเลี้ยงปลานิลของไทย มี 2 รูปแบบหลัก คือ การเลี้ยงปลาในบ่อดินและการเลี้ยงปลาในกระชังในแหล่งน้ำธรรมชาติ การเลี้ยงปลานิลในกระชังมีข้อจำกัดในการจัดการมากกว่าการเลี้ยงในบ่อ การจัดการการผลิตของปลานิลที่เลี้ยงในบ่อมีการจัดการที่เป็นระบบทั้งในด้านการควบคุมโรคและการให้อาหาร ซึ่งสามารถทำได้ง่ายและสะดวกกว่าการเลี้ยงในกระชัง สิ่งสำคัญคือการดูแลเลี้ยงปลานิลให้เจริญเติบโตตามความต้องการของผู้บริโภค จะต้องมีประสิทธิภาพในการจัดการที่ดี สำหรับผลผลิตปลานิลของผู้เลี้ยงปลานิลในกระชังของแต่ละฟาร์ม ผลผลิตเกือบทั้งหมดจะมีบริษัทที่ร่วมธุรกิจเป็นผู้มารับซื้อที่ฟาร์มหรือที่กระชัง จึงพบว่าเกษตรกรจะประสบกับปัญหาราคาผลผลิตต่ำในบางฤดูกาลและถูกผู้ซื้อกดราคา (ปาริชาด, 2545)

โรคติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตโคซิส (Streptococcosis)

เดิมทีมีการพูดกันว่า ปลานิลมีความทนทานต่อโรคแบคทีเรีย ปรสิต เชื้อราและไวรัสเมื่อเทียบกับปลาที่เพาะเลี้ยงชนิดอื่น ๆ อย่างไรก็ตามในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา พบว่า ปลานิลมีความเสี่ยงต่อโรคทั้งจากแบคทีเรียและพยาธิ เชื้อโรคที่พบบ่อย ได้แก่ *Streptococcus* sp., *Flavobacterium columnare, Aeromonas hydrophila, Edwarsiella tarda, Ichthyophitirius multifillis, Tricodhina* sp. และ *Gyrodactylus niloticus* (Klesius et al., 2008) โดยการติดเชื้อสเตรปโตคอกโคซิสกลายเป็นปัญหาสำคัญในการเลี้ยงปลานิลและก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างรุนแรง *Streptococcus iniae* และ *Streptococcus agalactiae* เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์หลักที่มีผลต่อการผลิตปลานิลในทั่วโลก (Evans et al., 2002)

Streptococcus agalactiae ซึ่งเป็นเชื้อโรคในปลาที่เกิดขึ้นใหม่เมื่อปลาติดเชื้อจะมีอาการป่วยและการตายอย่างมีนัยสำคัญซึ่งพบได้ในปลาน้ำจืดและน้ำเค็มหลายชนิดทั่วโลก (Evans et al., 2002) *Streptococcus agalactiae* ได้รับการรายงานครั้งแรกในสัตว์น้ำจืดที่เลี้ยงในกระชังในปี พ.ศ. 2509 (Robinson and Meyer, 1966) ล่าสุดมีรายงานการระบาดของแบคทีเรียชนิดนี้ในปลาจาก 7 ประเทศใน 3 ทวีป ได้แก่ สหรัฐอเมริกา (อเมริกาเหนือ) อิสราเอล ญี่ปุ่น คูเวตและไทย (เอเชีย) ฮอนดูรัส (อเมริกากลาง) และบราซิล (อเมริกาใต้) เชื้อโรคนี้ยังแยกได้จากปลา 17 ชนิด ได้แก่ ปลาเรนโบว์เทราต์, ซีบรีม, ปลานิล, ปลาหางเหลือง, ปลาดุก, ปลาจวด, *Aplocheilus panchax*, *menhaden* spp., *mullet* spp. และปลาจะระเม็ดขาว โดยลักษณะของปลาจะละเม็ดขาวเมื่อติดเชื้อจะมีอาการตกเลือดที่เหงือก ไม่กินอาหาร การเคลื่อนตัวของกระดูกสันหลังผิดปกติจนทำให้ว่ายน้ำเป็นเกลียวหรือหมุนอยู่ใต้ผิวน้ำ การตกเลือดที่ฐานของครีบ ในกระจกตา และสัญญาณที่โดดเด่นที่สุดคือ ตาโปน (popeye) เมื่อผ่าปลาดูแล้วพบมีของเหลวสีเลือดอยู่ในโพรงร่างกาย ม้ามโตและแดงตับซีด และบางครั้งมีรอยเลือดออกที่ผิวหนัง (Salvador et al., 2005) Klesius et al. (2000) และ Klesius et al. (2008) ได้ประมาณความเสียหายทางเศรษฐกิจของปลาที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียประมาณปีละ 150 ล้านเหรียญสหรัฐ เมื่อปี 2000 และเพิ่มเป็น 250 ล้านเหรียญสหรัฐ เมื่อปี 2008

แบคทีเรีย *Streptococcus* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม อยู่เป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น ไม่สร้างสปอร์และไม่เคลื่อนที่ มีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอาหารวุ้นที่เติมเลือด (blood agar medium) การแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียมาจากปลาที่ติดเชื้อ แล้วแพร่ไปยังปลาที่แข็งแรงทางสิ่งขับถ่าย บาดแผลของปลาที่เลี้ยงในความหนาแน่นสูง สาเหตุเหนี่ยวนำให้ปลาเกิดโรคเกิดจากความเครียดเนื่องจากอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่มีคุณภาพไม่เหมาะสม ออกซิเจนละลายในน้ำต่ำ อุณหภูมิสูง แอมโมเนียสูง มีรายงานการใช้ยาปฏิชีวนะ oxytetracycline ในการรักษาปลานิลที่ติดเชื้อ *S. iniae* (Darwish and Griffin, 2002) และมีรายงานพบว่า แบคทีเรียสามารถพัฒนาตัวเองให้ดื้อยาปฏิชีวนะ (Amal and Zamri-Saad, 2011)

ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลา

ระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) เป็นระบบที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับภูมิต้านทานของร่างกายสัตว์ ประกอบด้วยเซลล์หลายชนิดทำหน้าที่ร่วมกันในการปกป้องกำจัดเชื้อโรค สิ่งแปลกปลอม เซลล์ผิดปกติ หรือเซลล์หมดอายุ โดยเซลล์ที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันมาหลายกลุ่ม เช่น ลิมโฟไซท์ (lymphocyte) ฟาโกไซท์ (phagocyte) เป็นต้น ในภาวะปกติเซลล์เหล่านี้ส่วนใหญ่จะอยู่ในชั้นเนื้อเยื่อน้ำเหลือง เลือด น้ำเหลือง และไขข้อกระดูก ยกเว้นพลาสม่าเซลล์ (plasma cell) ระบบภูมิคุ้มกันของปลานั้นใกล้เคียงกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ประกอบด้วยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

(innate immune system หรือ non-specific immune system) และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immune system หรือ specific immune system) องค์ประกอบของทั้งสองระบบสามารถแบ่งออกได้เป็นภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell-mediated immunity หรือ CMI) และภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำหรือสารที่อยู่ในเลือด (humoral-mediated immunity หรือ HMI) การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเกิดได้อย่างรวดเร็ว แต่คงอยู่เพียงชั่วระยะเวลาสั้น ๆ ไม่มีความจำเพาะกับสิ่งแปลกปลอมและไม่มีการจดจำ (no memory) ในขณะที่ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะอาศัยการทำงานของเซลล์ลิมโฟไซต์ ได้แก่ T และ B cells ถึงแม้การทำงานของลิมโฟไซต์จะใช้ระยะเวลานานในการกระตุ้นและตอบสนอง แต่มีความจำเพาะและสามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมชนิดต่าง ๆ ทำให้การตอบสนองในครั้งถัดมา มีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากกว่าครั้งแรก

สุขภาพของปลาส่วนใหญ่จะขึ้นอยู่กับภูมิคุ้มกับแบบไม่จำเพาะ ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันด่านแรกในการป้องกันและเข้าทำลายเชื้อโรค มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการป้องกันการระบาดของเชื้อก่อโรคในปลา (วิบูลย์ศรี, 2537) ปลามีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกัน โดยมีการสร้างลิมโฟไซท์ที่ตับในระยะวัยอ่อน ซึ่งลิมโฟไซท์เหล่านี้แพร่กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย โดยเฉพาะที่ม้ามและต่อมน้ำเหลือง แต่เมื่อปลาโตขึ้นกระดูกสันหลังจะเป็นแหล่งกำเนิดลิมโฟไซท์ ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาส่วนใหญ่ (Vadstein, 1998)

สารในน้ำเลือดและเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

สารในน้ำเลือดเป็นเอนไซม์หรือกลุ่มซีรัมโปรตีนหลากหลายชนิด ทำหน้าที่ควบคุม หยุดยั้งเชื้อก่อโรคไม่ให้แพร่กระจายไปได้กว้างขวางขึ้น (โสมทัต, 2538) เช่น ไลโซไซม์ (lysozyme) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) ซึ่งเอนไซม์นี้มีคุณสมบัติในการตัดพันธะ β-1, 4 ไกลโคซิดิกระหว่าง N-acetylglucosamine และ N-acetylmuramic acid ซึ่งโพลิเมอร์เหล่านี้เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียทำให้ผนังเซลล์พังเสียหาย จึงถือได้ว่าไลโซไซม์เป็นเอนไซม์ที่ใช้ป้องกันตัวเองจากการติดเชื้อแบคทีเรียโดยสามารถทำลายมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ (mucopolysaccharide) ที่ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกทำให้เซลล์แตกได้ ส่วนผนังชั้นนอกสุดของแบคทีเรียแกรมลบเป็นพวกลิโพโปรตีน (lipoprotein) แต่ถ้ามีแอนติบอดีกับคอมพลีเมนต์เข้าช่วยทำลายชั้นลิโพโปรตีนก่อน ไลโซไซม์จะสามารถเข้าทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบได้ (วิน, 2549) ไลโซไซม์ถูกผลิตออกมาจากเซลล์ที่ทำหน้าที่จับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic cell) เช่น โมโนไซท์ (monocyte) แมโครฟาจ (macrophage) และโพลีมอร์โฟนูเคลียร์-แกรนูโลไซท์ (polymorphonuclear granulocyte) แล้วปล่อยออกมาในกระแสเลือดซึ่งจะอยู่ในส่วนของน้ำเลือด กิจกรรมของไลโซไซม์จะขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของร่างกายหรือตัวปลา ความเครียด และปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ (Murray and Fletcher, 1976)

ฟาโกไซติกเซลล์ (phagocytic cell) ทำหน้าที่จับกินเชื้อโรค สิ่งแปลกปลอมหรือกำจัดเซลล์ที่ตายแล้ว โดยถูกการทำงานได้จากสารหรือชิ้นส่วนของแบคทีเรีย C5a และสารขับหลั่งจากเซลล์ (cytokines) ขั้นตอนแรกของการจับเซลล์เชื้อโรคจะจับเข้ากับผิวเซลล์ฟาโกไซต์ ในการจับกันจะต้องการอนุภาคประจุบวก เช่น Ca^{2+} หรือ Mg^{2+} และการจับกินจะดีขึ้นเมื่อมีออพโซนิน (opsonin) เป็นสารช่วยให้เกิดฟาโกไซโตซิส หลังจากนั้นเซลล์ฟาโกไซท์จะยื่นเท้าเทียม (pseudopod) ออกไปล้อมเชื้อโรคเมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ของฟาโกไซท์มาเชื่อมกัน จะทำให้เซลล์เชื้อโรคหลุดเข้ามาภายในกลายเป็นฟาโกโซม์ (phagosome) ต่อมาไลโซโซม หรือแกรนูล (granule) ของฟาโกไซต์จะจะเคลื่อนมารวมกับฟาโกโซมกลายเป็นฟาโกไลโซโซม (phagolysosome) แล้วปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยเชื้อโรค หลังจากนั้นจะปล่อยส่วนที่ทำลายแล้วออกนอกเซลล์ (โสมทัต, 2538) ในกระบวนการย่อยเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม ฟาโกไซติกเซลล์จะมีการใช้ออกซิเจนอย่างมากเรียกว่าเรสพิราโทรี-เบริท์ส (respiratory burst) หรือออกซิเดทีฟ-เบริท์ส (oxidative burst) โดยการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase และออกซิเจนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion, O_2^-) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียสูง อีกทั้งเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีแกรนูล จะปล่อยเอนไซม์ myeloperoxidase ออกมาเพื่อไปกระตุ้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เปลี่ยนรูปเป็นโคโลรามีน์ (choloramines) และซิงค์เลทออกซิเจน (singlet oxygen) ซึ่งมีศักยภาพในการทำลายเชื้อแบคทีเรียและไวรัส (Verlhac et al., 1996)

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

หากปลาได้รับอาหารพอเหมาะและมีคุณค่าทางอาหารครบถ้วนตามความต้องการ ปลาจะมีสุขภาพที่ดี ทำให้มีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคได้ดี นอกจากนี้แล้วยังมีสารที่สามารถช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) โดยการฉีด กิน หรือแช่ โดยทั่วไปแล้วการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมักจะให้เป็นสารผสมในอาหาร เนื่องจากจัดการได้ง่าย ลดต้นทุน โดยสารที่ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาจะแบ่งออกเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะมักจะผสมสารลงในอาหารเช่น ไคติน (chitin) ไคโตซาน (chitosan) กลูแคน (glucan) วิตามิน (vitamin) พืชหรือสารสกัดจากพืช (plant extract) โพรไบโอติต (probiotic) เป็นต้น สารเหล่านี้จะช่วยเพิ่มการทำงานของไลโซไซม์ คอมพลีเมนท์ ช่วยกระตุ้นการทำงานของแมโครฟาจ และในส่วนของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะมักจะนิยมฉีดวัคซีน จะใช้เชื้อจำเพาะต่อโรคแล้วนำไปทำให้เชื้ออ่อนแรงโดยการใช้ความร้อน ฟอร์มาลีน แล้วนำไปฉีดให้กันปลาเพื่อสารภูมิคุ้มกันต่อโรคจำเพาะซึ่งวิธีนี้จะให้ผลดี ลดการตายจากเชื้อก่อโรคได้ (ชนกันต์ จิตมนัส, 2545) มีการทดลองเกี่ยวกับวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. และ *Flavobacterium columnare* แต่ยังไม่มีวัคซีนที่ขึ้นทะเบียนและวางขายเชิงพาณิชย์ในประเทศไทย

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

อนุมูลอิสระ (free radicals) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอม หรือโมเลกุล พบได้ทุกแห่งใน สิ่งมีชีวิต และในเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุล กลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามากและสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุล อื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิด ความสมดุลหรือเสถียรซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ ตลอดเวลา นอกจากนี้อนุมูลอิสระสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภท ทั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ลิพิด (lipid) โปรตีน (protein) เอนไซม์ (enzyme) ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) เซลล์เมมเบรน (cell membrane) คอลลาเจน (collagen) ไมโตคอนเดรีย (mitocondria) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissues) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และ ก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ อนุมูลอิสระนอกจากจะเกิดภายในสิ่งมีชีวิตแล้วอนุมูลอิสระสามารถเกิดจากภายนอก สิ่งมีชีวิตหรือในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การได้รับเชื้อโรค เช่น การติดเชื้อโรคไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (immune diseases) (Ames et al., 1993)

สารต้านอนุมูลอิสระถือว่ามีความสำคัญต่อ กระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ หรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมาย หลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) เป็นต้น (เจนจิรา และประสงค์, 2554) สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ซึ่งเป็นได้ทั้งเอนไซม์ วิตามิน และสารอื่น ๆ ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นวิตามิน เช่น vitamin C (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ไซโตพลาซึม) vitamin E (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เมมเบรน) และ glutathione (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ป้องกัน อันตรายจากอนุมูลอิสระที่ไซโตพลาซึมและเมมเบรน) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ glutathione peroxidase (GPX) glutathione reductase และ glutathione transferase ซึ่งทำหน้าที่ทำให้โมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็น

ออกซิเจนและน้ำ ส่วนเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) สามารถเปลี่ยน O_2^- เป็น H_2O_2 สารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ได้แก่ carotenoids และ ubiquinones เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันอนุมูลอิสระ ออกซิเจนทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ (บุหรัน และคณะ, 2553)

ฟลาโวนอยด์-เคอร์ซิติน

ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นกลุ่มของสารประกอบ ที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นฟีนิลเบนโซไพโรน (phenylbenzopyrones) ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็กและมีโครงสร้างประกอบ ด้วยการจัดเรียงตัวของคาร์บอน 15 ตัว (C6 - C3 – C6) เป็น วงแหวน 3 วง โดยสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชัน ซึ่งแทนที่ในโครงสร้างพื้นฐาน ได้เป็น 7 กลุ่ม ได้แก่

1. ฟลาโวนอล (flavonols) เช่น เคอร์ซิติน (quercetin) แคมป์เฟอรอล (kaempferol) ไมริซิติน (myricetin)

2. ฟลาโวน (flavones) เช่น ลูติโอลิน (luteolin), อาพิจินิน (apigenin) ไครซิน (chrysin)

3. ฟลาวาโนน (flavanones) เช่น เฮสเพอริติน (hesperetin) นารินจินิน (naringenin)

4. ฟลาวานอล (flavanols) เช่น แคทิชิน (catechin), แกลโลแคทิชิน (gallocatechin) อีพิแคทิชิน (epicatechin)

5. ฟลาวาโนนอล (flavanonols) เช่น แทกซิโฟลิน (taxifolin)

6. ไอโซฟลาโวน (isoflavones) เช่น เดดซีน (daidzein), จีนิสตีน (genistein) ไกลซิตีน (glycitein)

7. แอนโธไซยานิดิน (anthocyanidins) เช่น ไซยานิดิน (cyanidin), เดลฟินิดิน (delphinidin) (วิภพ, 2556)

มีงานวิจัยจำนวนมากแสดงให้เห็นว่าฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง เช่น ต้านอนุมูลอิสระ ต้านโรคเบาหวาน ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ปรับการทำงานระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (วิภพ, 2556) ในขณะที่ครึ่งหนึ่งของอาหารในกระเพาะเคลื่อนที่เข้าสู่ลำไส้เล็ก ในลำไส้เล็กความเป็นกรดจะลดลง โดย pH จะสูง ขึ้นเกินความเป็นกลางเพียงเล็กน้อย ปกติสารฟีโนลิคจะแตกตัวเป็นประจุได้ไฮโดรเจนไอออนและฟีโนเลทไอออน อย่างไรก็ตามค่า K_a ของสารฟีโนลิคต่ำ (>10-10) ดังนั้นฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่ที่อยู่ในรูปของอไกลโคนจะถูกดูดซึมได้ ส่วนฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงก็จะถูกส่งออกไปสู่ลำไส้ส่วนปลาย จากรายงานการวิจัยในคนพบว่า ฟลาโวนอยด์ในลำไส้เล็กถูกดูดซึมได้ 2 ลักษณะใหญ่ ๆ

1) ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ ถูกดูดซึมโดยตรง

2) ถูกไฮโดรไลซ์โดยแบคทีเรีย หรือเอนไซม์ได้อไกลโคนแล้วจึงถูกดูดซึม (วิภพ, 2556)

เดิมเคยมีความเชื่อกันว่าฟลาโวนอยด์ถูกดูดซึมในรูปของอไกลโคนเท่านั้น โดยถูกดูดซึมในลำไส้ใหญ่หลังจากถูกเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ที่ผลิตจากแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ ดึงน้ำตาลออก สำหรับฟลาโวนอยด์ที่ถูก ไฮโดรไลซ์โดยแบคทีเรีย หรือเอนไซม์ ได้อไกลโคนแล้วจึงถูกดูดซึมนั้น อาจถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์ แลคเตสโฟไรซินไฮโดรเลส (lactase phloridzin hydrolase: LPH) ซึ่งเป็นเบต้ากลูโคซิเดส ที่อยู่บริเวณเนื้อเยื่อ บรัชบอร์ดเดอร์แมมเบรน (brush border membrane) ของลำไส้เล็ก ได้เป็นอไกลโคนแล้วจึงถูกดูดซึม แต่อย่างไรก็ดี เอนไซม์แลคเตสโฟไรซินไฮโดรเลสก็ไฮโดรไลซ์ สารได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำตาลและ อไกลโคน ฟลาโวนอยด์เป็นสารมีขั้วค่อนข้างสูง ด้วยมีกลุ่มไฮดรอกซิล (hydroxyl) หลายกลุ่มในขณะที่เนื้อเยื่อสมองเป็นเนื้อเยื่อที่มีไขมันสูงและยังมีผนังกั้นระหว่างสมองกับเลือดที่เรียกว่าบลัดเบร็นแบริเออร์ (blood brain barrier: BBB) ผนังของบลัดเบร็นแบริเออร์เป็นชั้นเยื่อบุชั้นใน (endothelium) มีทางให้สารซึมผ่านได้หลายทาง ได้แก่ช่องว่างระหว่างเซลล์ (paracellular pathway) ที่ยอมให้สารที่ละลายน้ำได้บางชนิดซึมผ่านได้ ส่วนสารที่ละลายได้ในไขมันจะซึมผ่านแบบ transcellular diffusion ส่วนพวกเพปไทด์จะมีตัวนำส่งเฉพาะ นอกจากนี้ จะมี efflux transporters เช่น P-gp, MRP หรือ organic cationic transporter ฯลฯ ซึ่งจะเรียงตัวในชั้นต่าง ๆ ของสมอง (Youdim et al., 2004)

เคอร์ซิตินเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอล (flavonols) ที่พบได้ทั่วไปในผักผลไม้และถั่ว ในธรรมชาติพบ เคอร์ซิตินไกลโคไซต์ (quercetin glycoside) เป็นหลักและประกอบด้วยเคอร์ซิตินอไกลโคน (quercetin aglycone) ที่จับกับน้ำตาล เช่นกลูโคสหรือลูทีน (lutein) เอนไซม์ในลำไส้ก็จะแปลงเป็นอไกลโคนและถูกดูดซึมโดยเนื้อเยื่อผนังลำไส้เซลล์ (enterocyte) เมื่อเคอร์ซิตินได้รับการเปลี่ยนแปลงก็จะเข้าไปจับกับสารอนุพันธ์อื่น ๆ ที่ถูกดูดซึม เช่น โปรตีน เป็นต้น เคอร์ซิตินเป็นกลุ่มสารฟลาโวนอยด์ที่ยอมรับกันว่าเป็นต้านอนุมูลอิสระที่ดีชนิดหนึ่งและช่วยลดการอักเสบของเนื้อเยื่อต่าง ๆ (Kim et al., 2006)

เทคโนโลยีนาโน-พอลิเมอริกไมเซลล์ (Polymeric Micelles)

นาโน (nano) เป็นคำที่มีรากศัพท์มาจากคำในภาษากรีกว่า Nanos ซึ่งแปลว่า แคระ หรือเล็ก เป็นหน่วยวัดทางคณิตศาสตร์เท่ากับ “เศษหนึ่งส่วนพันล้านส่วน” เมื่อนำไปวางไว้หน้าหน่วยวัดใด ๆ หมายถึง “เศษหนึ่งส่วนพันล้านส่วนของหน่วยวัดนั้นๆ” เช่น นาโนเมตร (nanometer: nm) หมายถึง “เศษหนึ่งส่วนพันล้านเมตร” มีค่าเท่ากับ 0.000 000 001 เมตร หรือ 10^{-9} (ณยา และคณะ, 2557) และระบบนำส่งยาแบบนาโนพาร์ทิเคิลจะมีอนุภาคที่มีขนาดอยู่ในช่วง 1-1000 นาโนเมตรซึ่งระบบนำส่งยาแบบนาโนสามารถนำส่งสารได้ทั้งที่มีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic substance) และไม่ชอบน้ำ (hydro-phobic substance) นาโนพาร์ทิเคิลก็เป็นระบบนำส่งยาสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพ

สูง ช่วยในการนำส่งตัวยาที่ละลายน้ำได้น้อย และนำส่งยาที่สลายตัวได้ง่ายได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังสามารถช่วยให้ยาออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น (Bhadoriya et al., 2011)

พอลิเมอริกไมเซลล์ (polymeric micelles) ระบบนำส่งยานี้ ถูกพัฒนาขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดปัญหาต่าง ๆ เช่น ปัญหาการละลายน้ำได้น้อยของยาบางชนิด จึงทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาของยาบางชนิดไม่ได้ผลที่ดีนัก พอลิเมอริกไมเซลล์ ได้ถูกพัฒนาขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1984 โดย Bader ต่อมาระบบนำส่งยาในรูปแบบนี้ เริ่มได้รับความสนใจ ในการนำมาพัฒนาประยุกต์ใช้ในการนำส่งสารสำคัญ หรือสารที่ละลายน้ำได้น้อย เพื่อให้ผลในการรักษาดียิ่งขึ้นและลดผลข้างเคียงของสาร การเตรียมจะใช้พอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติเป็นแอมฟิฟิลิก (ampphiphilic) ประกอบด้วยสองส่วนคือ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (ไม่มีขั้ว) และส่วนที่ชอบน้ำ (มีขั้ว) โดยจะมีการจัดเรียงโมเลกุลเป็นทรงกลมเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีขั้ว เช่น น้ำ โดยหันโมเลกุลด้านไม่มีขั้วไว้ภายในและด้านที่มีขั้วไว้ภายนอก การจัดเรียงตัวของโมเลกุลจะเกิดขึ้นเอง (self-assembly) เมื่อความเข้มข้นของสารถึงจุดความเข้มข้นวิกฤต (critical micells concentration; CMC) เรียกอนุภาคทรงกลมนี้ว่าไมเซลล์ พอลิเมอร์ที่ใช้อาจเป็นแอมฟิฟิลิกบล็อกโคพอลิเมอร์ หรือกราฟท์โคพอลิเมอร์ เมื่อก่อตัวเป็นพอลิเมอริกไมเซลล์ โครงสร้างภายในจะทำหน้าที่เก็บกักสารที่ละลายน้ำไม่ดีส่วนโครงสร้างภายนอกจะทำหน้าที่ปกป้องสารสำคัญไม่ให้ถูกทำลาย และช่วยให้โครงสร้างมีความคงตัว เมื่ออยู่ในกระแสเลือด พอลิเมอริกไมเซลล์จะมีความคงตัว เนื่องจากมีอนุภาคขนาดเล็กประมาณ 10-100 นาโนเมตร มีค่า CMC อยู่ที่ 10^{-6}-10^{-7} ซึ่งต่ำกว่าไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า CMC อยู่ที่ 10^{-3} (ฐิศิรักษ์ และประณีต, 2557)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Sen et al. (2015) ศึกษาการใช้สารสกัดฟลาโวนอยด์จากใบฝรั่งต่อการต้านการอักเสบจากการเติม Lipopolysaccharide ลงไปในเซลล์ Macrophage ที่แยกได้จากไตส่วนหน้า (*in vitro*) โดยฟลาโวนอยด์สามารถเข้าไปบล็อก *NF-kB* ทำให้มีการแสดงออกของ *NF-kB* ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ควบคุม (ฟลาโวนอยด์ 0 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2), nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) และ tumour necrosis factor alpha (TNF-α) หรือ interleukin-1b (IL-1β) ซึ่งผลของการลดระดับของ NO, PGE2, iNOS, COX-2, TNF-α และ IL-1β ทำให้การอักเสบของเนื้อเยื่อลดลงซึ่งหากมีการอักเสบในปริมาณที่มากและต่อเนื่องจะทำให้เกิดมะเร็ง หรือเจ้าบ้านอ่อนแอ

Wang et al. (2012) ศึกษาผลของฟลาโวนอยด์จากเห็ดกระถินพิมาน (*Phellinus igniarius*) ที่มีผลต่อปลาสเตอร์เจียน (sturgeon caviar) โดยเห็ดกระถินพิมานจะถูกสกัดด้วยเอทานอล 60 เปอร์เซ็นต์ (Ethanol) กล่าวว่าระดับของฟลาโวนอยด์ที่ระดับ 0.02 เปอร์เซ็นต์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าวิตามินซี โดยให้ผลใกล้เคียงกับ butylated hydroxyanisole (BHA) และฟลาโวนอยด์ยังสามารถช่วยกระตุ้นประสาทสัมผัสของปลาสเตอร์เจียนให้ดีขึ้น

Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn (2007) ศึกษาฟลาโวนอยด์-เคอร์ซิตินจากใบฝรั่ง (*Psidium guajava*) โดยการศึกษาปริมาณต่ำสุดของการใช้เคอร์ซิติน (Minimum inhibitory concentration) ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในปลา ด้วยการเติมเคอร์ซิตินลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 10 มิลลิลิตร (10^2 CFU/mL) ซึ่งเคอร์ซิตินในระดับ 200-300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในปลา *Aeromonas hydrophila, Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida, Flavobacterium columnare, Lactococcus garvieae, Streptococcus agalactiae* และ *Vibrio salmonicida* โดยวัดจากค่า Optical density (OD) ที่ 600 nm

Pês et al. (2016) ทดลองใช้เคอร์ซิติน ($C_{15}H_{10}O_7$) ผสมในอาหารแล้วนำมาเลี้ยงปลากดเงิน (*Rhamdia quelen*) เพื่อดูระดับสารต้านอนุมูลอิสระ พารามิเตอร์ของเลือดและการแสดงออกของฮอร์โมน โดยนำเคอร์ซิตินมาผสมในอาหาร 0, 0.15 และ 0.30 เปอร์เซ็นต์แล้วนำมาให้ปลากดเงินขนาด 215 กรัมเป็นเวลา 21 วัน พบว่าการเสริมเคอร์ซิตินในระดับ 0.15 เปอร์เซ็นต์ให้ผลดีเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและไม่มีความแตกต่างกันในระหว่างกลุ่มทดลองที่ได้รับเคอร์ซิติน 0.30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการให้เคอร์ซิตินสามารถลดระดับของคอร์ติซอล (cortisol) เพิ่มระดับของโกรทฮอร์โมน (Growth hormone) และเพิ่มระดับของปริมาณเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (superoxide dismutase, catalase,

glutathione peroxidase และ glutathione S-transferase) ในส่วนต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อสมอง เหงือก ตับ ไต และกล้ามเนื้อ

Elham et al. (2013) ศึกษาการใช้สารสกัดจากตำแยกัด (Nettle) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันของปลาเรนโบว์เทร้าต์ (*Oncorhynchus mykiss*) ได้ทดลองนำมาผสมอาหารให้ปลาขนาด 18±0.2 กรัมกินเป็นเวลา 14 วันพบว่าระดับของการทำงานของไลโซไซม์ (Lysozyme activity) มีการทำงานที่ดีขึ้นเมื่อปลาได้รับสารสกัดเคอร์ซิตินที่ 0.50 และ 1 เปอร์เซ็นต์โปรตีนรวมมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม การทำงานของแบคทีเรีย *(Aeromonas hydrophila*) มีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อปลาได้รับเคอร์ซิติน 1 เปอร์เซ็นต์

Sassa-deepaeng et al. (2016.) ศึกษาการพัฒนาระบบนำส่งสารไคซิน (chrysin) ด้วยการบรรจุลงไปด้วยระบบ poloxamer micelles โดยใช้ poloxamer สองชนิดคือ Pluronic F-68 และ Pluronic F-127 สามารถเพิ่มอัตราการละลายน้ำของไคซินได้เพิ่มขึ้น ส่วนลักษณะของขนาดสารไคซินที่ละลายในเอทานอลเมื่อบรรจุด้วย Pluronic F-68 และ Pluronic F-127 พบว่าอัตราส่วนที่ 1:3 (ไคซิน: Pluronic) มีขนาด 12.5±4.1 นาโนเมตรและ 11.2±2.7 นาโนเมตรตามลำดับ

Palle and Neerati (2017) ศึกษาการใช้สารเคอร์ซิตินอานุภาคนาโน (ขนาดอนุภาคต่ำกว่า 300 นาโนเมตร) ในหนู (Rats) เคอร์ซิตินนาโนสามารถลดความเครียดลงหลังจากการให้ยา Scopolamine ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยา Scopolamine เพียงชนิดเดียว และเคอร์ซิตินในรูปแบบธรรมดา ช่วยเพิ่ม glutathione และ catalase ในเนื้อเยื่อสมองได้เมื่อเทียบกับกลุ่มทดลองที่ได้รับยา Scopolamine เพียงชนิดเดียว และเคอร์ซิตินในรูปแบบธรรมดา

Chakraborty et al. (2012) ศึกษาเคอร์ซิตินในรูปแบบนาโน (ขนาดอนุภาค 15±2.34 นาโนเมตร) เพื่อใช้ในการป้องกันการอักเสบของกระเพาะอาหารหนูจากการให้เอทานอล (เอทานอล 4 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัม) เคอร์ซิตินนาโนสามารถลดอัตราการเกิดแผลในกระเพาะอาหารเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเอทานอลเพียงอย่างเดียว (อัตราการเกิดแผลในกระเพาะ เคอร์ซิตินนาโน 10 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ได้รับเอทานอลอย่างเดียว 55 เปอร์เซ็นต์) และผนังของกระเพาะอาหารหลังจากได้รับเคอร์ซิตินนาโนมีขนาดที่หนาขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเอทานอลเพียงอย่างเดียว

บทที่ 3
การดำเนินงานวิจัยและวิธีการ

อุปกรณ์

1. ลูกปลานิล
2. ตู้กระจกขนาด 24 นิ้ว
3. เคอร์ซิติน (Sigma)
4. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 และ 3 ตำแหน่ง
5. กล้องจุลทรรศน์
6. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
7. ตู้บ่มเชื้อ
8. เครื่องมือและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการต่าง ๆ เช่น บีกเกอร์, ขวดรูปชมพู, ขวดวัดปริมาตร, จานเพาะเชื้อ เป็นต้น
9. เครื่องมือและอุปกรณ์วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ
10. เครื่องมือและอุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำ
11. เครื่องมือและอุปกรณ์วิเคราะห์ภูมิคุ้มกัน
12. เครื่องมือและอุปกรณ์วิเคราะห์เอนไซม์

การวางแผนการทดลอง

การวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ช่วง คือ

การทดลองช่วงที่ 1 ทดลองลูกปลานิลโดยใช้ผลิตภัณฑ์สารสกัดชนิดเข้มข้นของบริษัท เวิร์ด โกร์วจำกัด (ตามปริมาณคำแนะนำของทางบริษัท) เพื่อศึกษาปริมาณการใช้สารผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต อัตรารอดหลังจากการรับเชื้อ *S. agalactiae* โดยมีชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 (Control) ให้อาหารผสมผลิตภัณฑ์สารสกัดที่ 0 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 2 (Ex 0.1) ให้อาหารผสมผลิตภัณฑ์สารสกัดที่ 0.1 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 (Ex 0.2) ให้อาหารผสมผลิตภัณฑ์สารสกัดที่ 0.2 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 (Ex 0.3) ให้อาหารผสมผลิตภัณฑ์สารสกัดที่ 0.3 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 5 (Ex 0.4) ให้อาหารผสมผลิตภัณฑ์สารสกัดที่ 0.4 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

การทดลองช่วงที่ 2 เมื่อได้ผลของปริมาณผลิตภัณฑ์สารสกัดที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลานิลจะนำมาผสมกับนาโน-เคอร์ซิติน เพื่อศึกษาผลของสารผสมดังกล่าวต่อการเจริญเติบโต อัตรารอดหลังจากการรับเชื้อ *S. agalactiae* เพื่อศึกษาดูปริมาณการใช้สารผลิตภัณฑ์ที่ผสมเคอร์ซิตินในรูปแบบนาโน โดยมีชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 (Control) ให้อาหารผสมผลิตภัณฑ์สารสกัดที่ 0 มิลลิลิตรและนาโน-เคอร์ซิติน 0 มิลลิกรัม

ชุดการทดลองที่ 2 (Ex+Nano 25) ให้อาหารผสมผลิตภัณฑ์สารสกัดที่เหมาะสมและนาโน-เคอร์ซิติน 25 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 (Ex+Nano 50) ให้อาหารผสมผลิตภัณฑ์สารสกัดที่เหมาะสมและนาโน-เคอร์ซิติน 50 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 (Ex+Nano 75) ให้อาหารผสมผลิตภัณฑ์สารสกัดที่เหมาะสมและนาโน-เคอร์ซิติน 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

สัตว์ทดลอง

นำปลานิลที่ได้รับการแปลงเพศ (เชียงใหม่พัฒนาฟาร์ม) ขนาด 40 กรัม จำนวน 20 ตัวมาปล่อยในกระชังขนาด 1 ตารางเมตร จำนวน 12 กระชัง (ชุดทดลองละ 3 ซ้ำ) ปรับสภาพของปลาเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ให้อาหารปลานิลอัดเม็ดสำเร็จรูปโปรตีนไม่ต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมสารสกัด+นาโน-เคอร์ซิตินตามชุดการทดลองต่าง ๆ ปริมาณ 4-5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง สุ่มวัดอัตราการเจริญเติบโต (น้ำหนัก) ทุก 2 สัปดาห์เลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง

นำอาหารในช่วงการทดลองที่ 2 ทุกชุดการทดลองมาวิเคราะห์ค่า ความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน และเยื่อใยตามวิธีการมาตรฐานของ (AOAC, 1984)

ตารางที่ 1 ปัจจัยและวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารอาหาร

ปัจจัยที่วิเคราะห์	วิธีการ
ความชื้น (moisture)	โดยการอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง
เถ้า (ash)	โดยการเผาใน muffle furnace 600 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง
โปรตีน (protein)	โดย micro-Kjeldahl
ไขมัน (lipid)	โดยวิธี dichloromethane extraction ตาม Soxlhet method
เยื่อใย (fiber)	โดยวิธี fritted glass crucible

ตารางที่ 2 ปริมาณเปอร์เซ็นต์ของความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน และเยื่อใยในอาหารผสมสารสกัดร่วมกับนาโน-เคอร์ซิติน

	Control	Ex+Nano25	Ex+Nano50	Ex+Nano75
ความชื้น	7.98±0.13	8.09±0.05	8.21±0.05	8.35±0.01
เถ้า	9.65±0.04	9.67±0.01	9.69±0.04	9.65±0.04
โปรตีน	32.01±0.23	32.03±0.01	32.08±0.19	32.28±0.20
ไขมัน	6.33±0.08	6.18±0.28	5.91±0.19	5.86±0.20
เยื่อใย	5.05±4.65	4.68±5.62	4.42±3.15	4.32±3.59

การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ

ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำก่อนเริ่มทำการทดลอง และระหว่างการทดลองทุก 2 สัปดาห์จนเสร็จการทดลองเพื่อศึกษาค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปัจจัยและวิธีการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ

ปัจจัยที่วิเคราะห์	วิธีการ/เครื่องมือ
อุณหภูมิ	DO meter (YSI model 59)
ออกซิเจนที่ละลายน้ำ	DO meter (YSI model 59)
ความเป็นกรด-ด่าง	pH meter (HI 9812)
แอมโมเนีย-ไนโตรเจน	วิธีฟีนอล (Phenol Method)

ตารางที่ 4 ค่าคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงปลานิลในกระชัง

พารามิเตอร์	ค่าคุณภาพน้ำ
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	28.2 ถึง 33.6
ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	3.28 ถึง 5.33
ความเป็นกรด-ด่าง	7 ถึง 8
แอมโมเนีย-ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.06 ถึง 0.14

วิเคราะห์ข้อมูลด้านการเจริญเติบโต

สุ่มปลาขึ้นมา 10 ตัวของแต่ละกระชัง ชั่งน้ำหนักปลานิลมีหน่วยเป็นกรัม ทุก 2 สัปดาห์เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการนับจำนวนปลาและชั่งน้ำหนักนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวนค่าต่าง ๆ ดังนี้

น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (weight gain, WG; กรัมต่อตัว)

WG = น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง – น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (average daily gain, ADG; กรัมต่อตัว)

$$ADG = \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง}}$$

น้ำหนักอาหารที่ปลากิน (total feed intake, TFI; กรัมต่อตัว)

$$TFI = \frac{\text{น้ำหนักอาหารทั้งหมดที่ปลากิน}}{\text{จำนวนปลา}}$$

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (food conversion ratio, FCR)

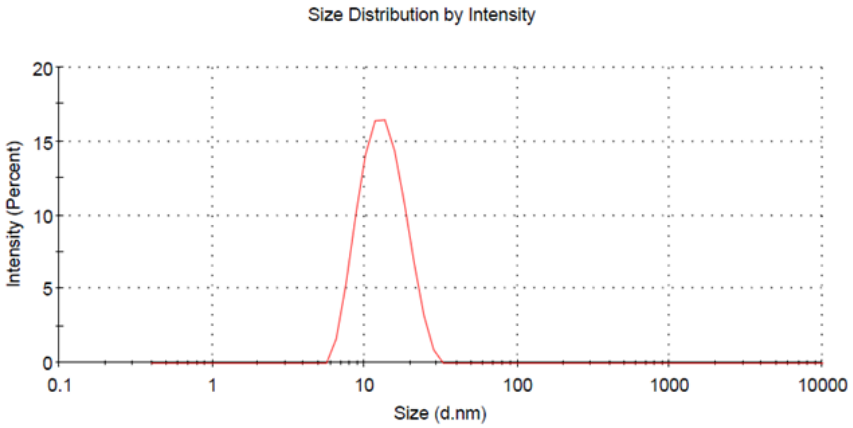
$$FCR = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}$$

อัตรารอด (survival rate, SR; เปอร์เซ็นต์)

$$SR = \left(\frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเริ่มต้น}}\right) \times 100$$

การพัฒนาเคอร์ซิติน

ดัดแปลงการทดลองของ Sassa-deepaeng et al. (2016) โดยนำเคอร์ซิติน (Sigma) ไปละลายในตัวทำละลายเอทานอล (1 mg/mL) แล้วนำไปผสมกับ Pluronic F-127 (Sigma) ที่ละลายด้วยน้ำ DI (1 mg/mL) ในอัตราส่วน 1:3 คนให้สารละลายเข้ากันแล้วเติม Tween 80 20 μL (บริษัทเคมีภัณฑ์ ประเทศไทย) หลังจากนั้นนำสารละลายทั้งหมดไปแช่ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dry นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Malvern (Zetasizer Ver. 7.11) นาโน-เคอร์ซิตินที่วิเคราะห์ได้มีค่าเฉลี่ย 12.27±4.45 นาโนเมตร ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 Size distribution report by intensity ของ นาโน-เคอร์ซิติน วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Malvern

ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย

ในสัปดาห์ที่ 8 สุ่มปลานิลในกระชังละ 10 ตัวมาทดสอบการต้านทานเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส (*S. agalactiae*) โดยนำปลานิลที่มีลักษณะติดเชื้อจากเกษตรอำเภอดอยหล่อ จังหวัดเชียงใหม่ มาแยกเชื้อจากตับ ไต ม้าม และสมอง มาเพาะเชื้อในอาหาร tryptic soy broth (TSB) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไปแยกเชื้อด้วยวิธีการ streak plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่แยกได้ส่งตรวจกับห้องห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น แล้วนำเชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 1 x 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร (LD_{50}) ฉีดเข้าบริเวณช่องท้องปลาตัวละ 0.1 มิลลิลิตร บันทึกการตายของปลาทุกวันเป็นเวลา 10 วัน คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดตาย (จำนวนปลาที่ตาย× 100/จำนวนปลาที่สุ่มมาทดลอง) ในแต่ละวัน

การตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระ

ตรวจสอบ Thio barbituric acid reactive substance: TBARS โดยใช้ชุด TBARS assay kit ของบริษัท Cayman วิธีการทดสอบจะใช้วิธีที่บริษัทแนะนำดังนี้

เริ่มต้นการทดลอง และสิ้นสุดการทดลองเก็บนำปลาทดลองมาแยกเนื้อเยื่อตับลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรเติม RIPA (Cayman) 250 ไมโครลิตร บดเนื้อเยื่อในที่เย็นแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 1600 x g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเก็บส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปวิเคราะห์ในวันถัดไป

ใส่ตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตรแล้วเติม SDS (Cayman) 100 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันหลังจากนั้นเติม Color Reagent (Cayman) 4 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองแล้วนำหลอดทดลองไปใส่ในน้ำเดือด (100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหลังจากนั้นนำหลอดทดลองมาใส่ในน้ำเย็นจัดเพื่อหยุดปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ 1600 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนำมาพักไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนใส 150 ไมโครลิตรใส่ใน 96-black well plate (Cayman) นำไปวัดที่ค่าดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรของบริษัทให้มาแสดงผลเป็นความเข้มข้นของ MDA ต่อไมโครโมล

ตรวจสอบ Glutathione โดยใช้ชุด Glutathione assay kit ของบริษัท Cayman วิธีการทดสอบจะใช้วิธีที่บริษัทแนะนำดังนี้

เริ่มต้นการทดลอง และสิ้นสุดการทดลองสุ่มปลาชุดการทดลองละ 3 ตัวนำส่วนไต 1 กรัมมาบดในบัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร (ฟอตเฟส 50 มิลลิโมล pH 7 และ 1 มิลลิโมล EDTA) บดในที่เย็นแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000x g เป็นเวลา 10 นาทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์ หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ภายหลัง

นำตัวอย่าง 50 ไมโครลิตรใส่ลงไปใน 96-well plate เติมสารวิเคราะห์ 150 ไมโครลิตร (ในสารวิเคราะห์จะมี MES บัฟเฟอร์ 11.25 มิลลิลิตร, Co-factor mixture 0.45 มิลลิลิตร, Enzyme mixture 2.1 มิลลิลิตร, DTNB 0.45 มิลลิลิตร (Cayman) และน้ำกลั่น 2.3 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 25 นาทีแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Glutathione แสดงผลเป็นปริมาณ Glutathione (GSH) ต่อไมโครโมล

ตรวจสอบผลการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลานิล

ทุก 2 สัปดาห์ของการทดลอง จะสุ่มปลาในแต่ละชุดการทดลองมา 10 ตัว เพื่อทดสอบการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยนำปลามาสลบด้วยน้ำมันกานพลู (บริษัท เคมีภัณฑ์ ประเทศไทย) 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร เก็บตัวอย่างเลือดปลาประมาณ 0.7 มิลลิลิตร จากเส้นเลือดตามแนวเส้นข้างลำตัวด้านท้าย (caudal vein) เพื่อนำมาวิเคราะห์

กิจกรรมของซีรัมไลโซไซม์ (lysozyme activity) ดัดแปลงจากวิธีการของ Puangkaew et al. (2004) โดยการแยกซีรัมจากตัวอย่างเลือดชุดการทดลองละ 5 ตัว นำเลือดปลา 0.7 มิลลิลิตรใส่ microcentrifuge tube ทิ้งให้เลือดแข็งตัว 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างเลือดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 × g เป็นเวลา 10 นาที ดูดซีรัมส่วนใสด้านบน เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการทดสอบ การวิเคราะห์กิจกรรมไลโซไซม์จะดูดซีรัม 25 ไมโครลิตรลงใน 96-well plate ตัวอย่างละ 2 ซ้ำแล้วเติมสารละลายแบคทีเรีย *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลลาร์, pH 6.8) จำนวน 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงทุก 5 นาทีที่ความยาวคลื่นแสง 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader หน่วยเป็นยูนิตต่อนาที (หนึ่งยูนิตเท่ากับปริมาณซีรัมที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสง ลดลง 0.001 ต่อนาที)

กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว (phagocytic activity) ใช้วิธีการดัดแปลงของ Doana et al. (2014) และ Yoshida and Kitao (1991) เจาะเลือดปลา 1 มิลลิลิตรใส่ลงใน heparin tube (DK medical service) ผสมกับ RPMI-1640 1 มิลลิลิตรนำเลือดมาค่อย ๆหยดในหลอด polyethylene (conical tube) ที่มีสารแยกชั้น (histopaque, Sigma) 3 มิลลิลิตรปั่นเหวี่ยงที่ 400x g เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แยกเม็ดเลือดขาวที่แยกชั้นอยู่ตรงกลางออกมาใส่ใน conical tube หลอดใหม่เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 มิลลิลิตร pH 7.4 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 200x g เป็นเวลา 15 นาทีเทส่วนใสทิ้งทำซ้ำอีกครั้งเพื่อทำความสะอาดเซลล์ นำเม็ดเลือดขาวที่ได้ปรับความเข้มข้น $2x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นสไลด์ 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ล้างเซลล์เม็ดเลือดขาวออกด้วย RPMI-1640 แล้วเติม latex beads ความเข้มข้น $2x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 200 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง

เพื่อให้เกิดกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว แล้วเทของเหลวที่อยู่ด้านบนสไลด์ออก แล้วล้างด้วย RPMI-1640 2 ครั้งตรึงเซลล์ด้วยเมธานอล แล้วนำไปย้อมด้วยวิธี Diff-quick staining dye เป็นเวลา 10 วินาที แล้วล้างสไลด์ด้วย PBS (pH 7.4)

$$\text{Phagocytic activity} = \left(\frac{\text{จำนวนเซลล์ที่จับกิน beads}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดที่นับได้}} \right) \times 100$$

กระบวนการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (respiratory burst activity)

กระบวนการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (respiratory burst activity) กระบวนการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของปลานิล จะใช้วิธีของ Doan et al. (2014) ที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Secombes (1990) นำเม็ดเลือดขาวจากวิธีการเดียวกับการจับกินสิ่งแปลกปลอม จำนวน 175 ไมโครลิตรปรับความเข้มข้น $6x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ใส่ลงใน 96-well plate เติม Nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 25 ไมโครลิตรแล้วบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนใสด้านบนออก ด้วยไมโครปิเปตออกให้หมด แล้วล้างด้วยเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ปริมาณ 125 ไมโครลิตรต่อหลุม ดูดส่วนใสออกแล้วล้างด้วยเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 125 ไมโครลิตรต่อหลุมทำวิธีการเดิมซ้ำ จำนวน 2 ครั้ง แล้วดูดส่วนใสด้านบนออกให้มากที่สุดแล้วปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาทีหลังจากนั้นเติม 2 นอร์มอลโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (2N KOH) ปริมาณ 125 ไมโครลิตร แล้วเติมไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาณ 150 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 655 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ แบลงค์ น้ำกลั่นแสดงผลเป็นการผลิต O_2^- = (ค่าดูดกลืนแสงของแบลงค์ – ค่าดูดกลืนแสงที่ลดลงของ NBT ในตัวอย่างที่วิเคราะห์)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่วัดได้ นำไปวิเคราะห์ทางสถิติ โดยหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±SD) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน One way ANOVA แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)

ระยะเวลาในการวิจัยและสถานที่ดำเนินการ

ระยะเวลา	ระยะเวลา 3 ปี ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2560 – เดือน กันยายน 2563
สถานที่ดำเนินงาน	คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
	สถาบันตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ลำปาง

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลอง

ผลการทดลองช่วงที่ 1 ระดับของสารสกัดที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลานิล

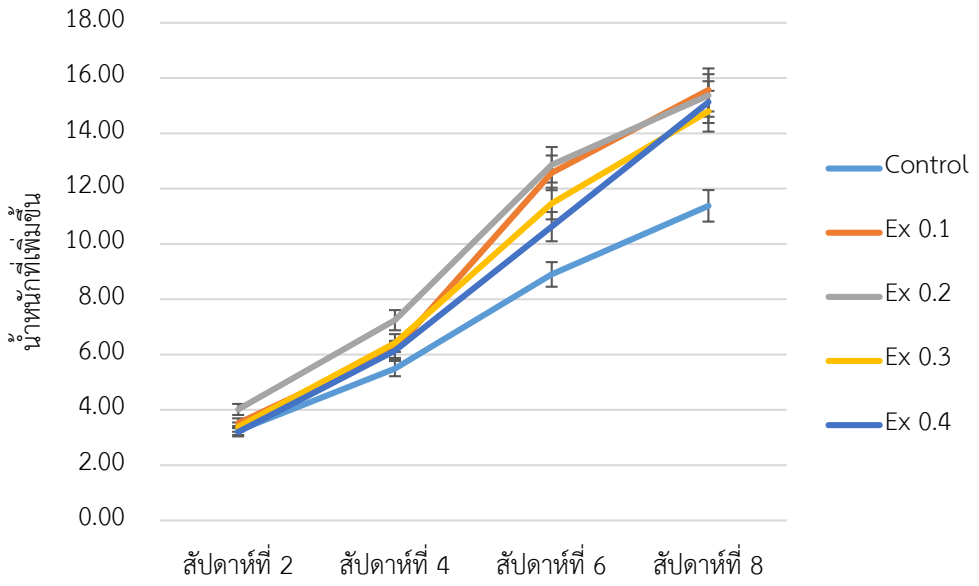
ปลานิลที่เลี้ยงด้วยสารสกัดความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเมื่อเลี้ยงครบระยะเวลา 8 สัปดาห์ ในชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัด ตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.4 มิลลิลิตร มีน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นดีกว่าชุดควบคุมและเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี Duncan's multiple range test นั้นมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ในส่วนของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน อัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ อาหารที่ปลากิน นั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) และอัตราการรอดตายไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่กลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตรารอดตายสูงที่สุด รองลงมาคือ กลุ่มควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 5

เมื่อสิ้นสุดการทดลองได้นำปลานิลชุดการทดลองละ 10 ตัวมาทดสอบกับเชื้อ *S. agalactiae* ปริมาณ 1×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตรต่อตัว หลังจากการทดสอบเชื้อผ่านไป 4 วันพบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.3 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีการตายเกิดขึ้น (16.67% และ 3.33%) ตามลำดับ เมื่อทดสอบเชื้อครบ 10 วันพบว่าอัตราการตายของปลานิลมากที่สุด คือ กลุ่มควบคุม รองลงมาคือกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.1, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (28.88, 20.00 และ 16.67) ตามลำดับ

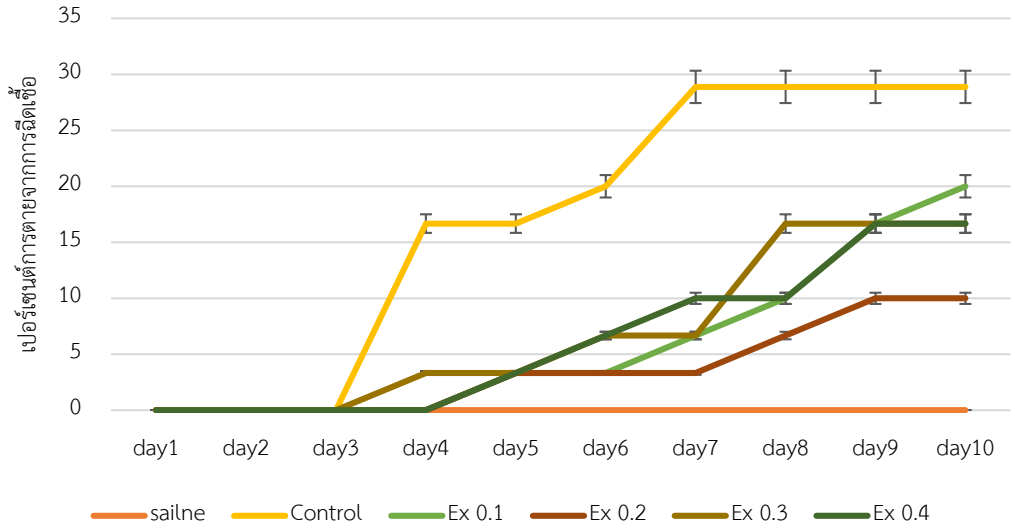
ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของปลานิลที่ได้รับสารสกัดในความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

	control	Ex 0.1	Ex 0.2	Ex 0.3	Ex 0.4
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	11.38±1.07[b]	15.57±0.72[a]	15.37±0.94[a]	14.80±0.98[a]	15.13±2.73[a]
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (กรัม)	0.21±0.02	0.29±0.01	0.28±0.02	0.27±0.02	0.28±0.05
อัตราการแลกเปลี่ยนเนื้อ	2.25±0.21	2.36±0.35	2.32±0.31	2.21±0.19	2.04±0.70
อาหารที่ปลากิน (กรัม/ตัว/วัน)	0.56±0.04	0.60±0.06	0.61±0.52	0.60±0.25	0.55±0.09
อัตรารอด (เปอร์เซ็นต์)	93.33±2.89	95.00±5.00	85.00±10.00	90.00±5.00	88.33±2.89

หมายเหตุ ตัวอักษร a และ b ในแถบเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างกลุ่มทดลอง ทดสอบโดยใช้วิธีของ Duncan's multiple range test



ภาพที่ 2 อัตราการการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเฉลี่ยรายสัปดาห์ของปลานิลที่ได้รับสารสกัดในความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์



ภาพที่ 3 อัตราการตายสะสมของปลานิลที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้นต่างกันเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *S. agalactiae* 1 x 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตรต่อตัว

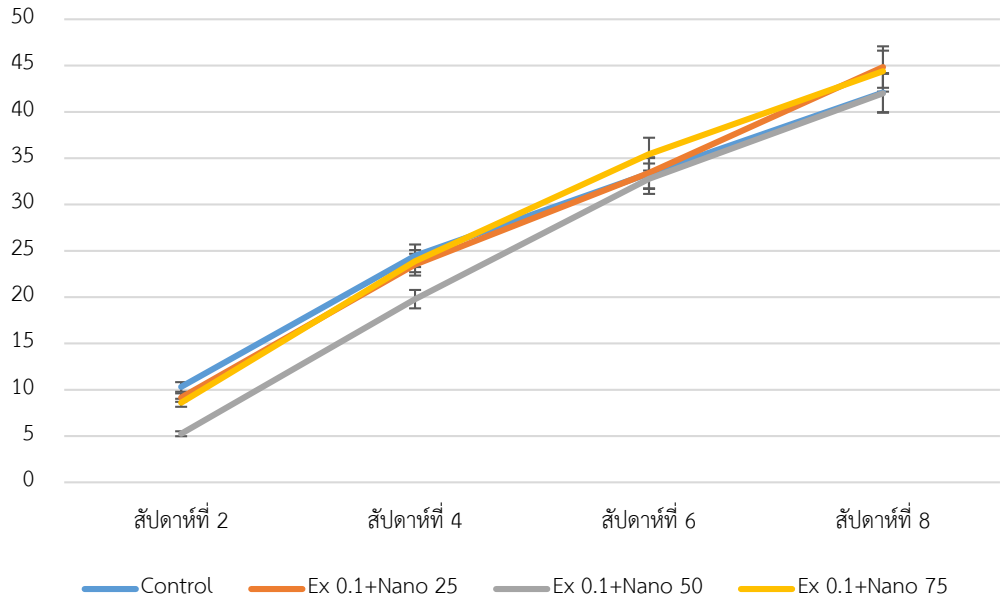
ผลการทดลองช่วงที่ 2 การนำเอาระดับของสารสกัดที่ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มาร่วมกับสารนาโน-เคอร์ซิติน

พบว่าปลานิลที่เลี้ยงด้วยสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เมื่อเลี้ยงครบระยะเวลา 8 สัปดาห์ มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี Duncan's multiple range test แต่ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมนั้นมีแนวโน้มการเจริญเติบโตที่ดีกว่ากลุ่มอื่น ในส่วนของอัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ กลุ่มสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในส่วนของอาหารที่ปลากิน กลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 50 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและมีแนวโน้มการกินอาหารน้อยกว่ากลุ่มอื่น และอัตรารอดตายไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลานิลที่ได้รับสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 8 สัปดาห์

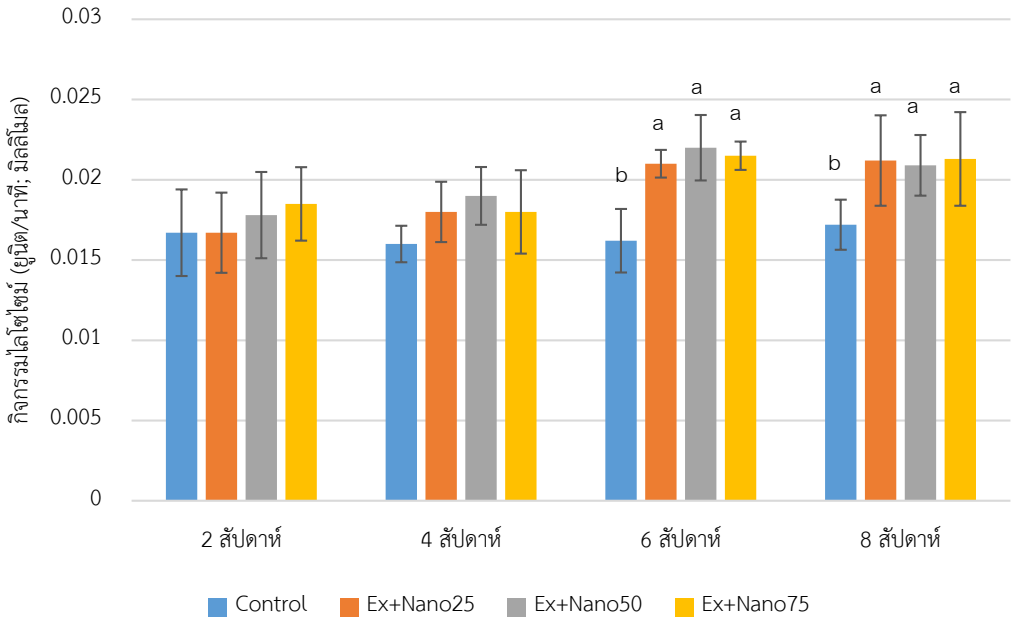
	Control	Ex+Nano25	Ex+Nano50	Ex+Nano75
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	42.09±3.17	44.85±3.94	42.01±7.49	44.40±3.58
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (กรัม)	0.78±0.06	0.83±0.07	0.78±0.14	0.82±0.07
อัตราการแลกเปลี่ยนเนื้อ	2.02 ± 0.14^{a}	1.86 ± 0.45^{b}	1.83 ± 0.28^{b}	1.89 ± 0.67^{b}
อาหารที่ปลากิน (กรัม/ตัว/วัน)	3.10 ± 0.12^{a}	2.94 ± 0.07^{ab}	2.82 ± 0.17^{b}	2.98 ± 0.08^{ab}
อัตรารอด (เปอร์เซ็นต์)	93.33±2.89	88.33±7.64	88.33±2.89	88.33±2.89

หมายเหตุ ตัวอักษร a และ b ในแถบเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ระหว่างกลุ่มทดลอง ทดสอบโดยใช้วิธีของ Duncan's multiple range test

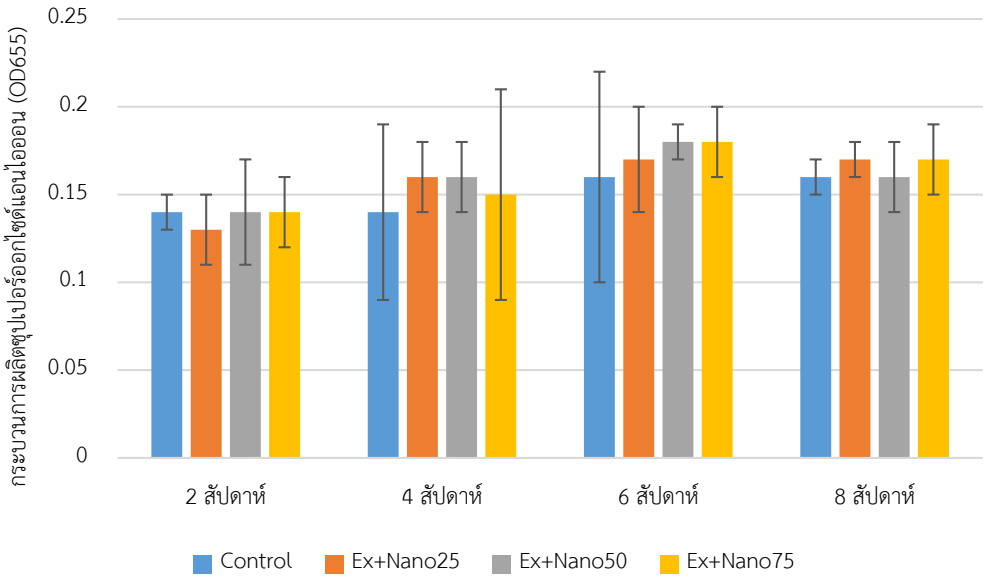


ภาพที่ 4 อัตราการการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเฉลี่ยรายสัปดาห์ของปลานิลที่ได้รับสารสกัดและนาโน-เคอร์ซิตินในความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

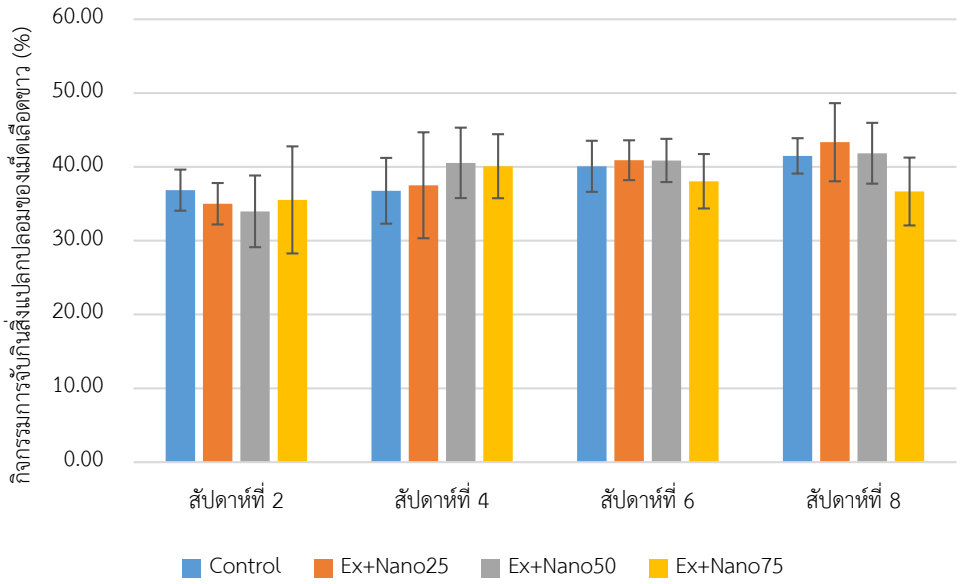
ปลานิลที่เลี้ยงด้วยสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเมื่อเลี้ยงครบระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าค่ากิจกรรมไลโซไซม์ เริ่มมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 ถึง 8 โดยในกลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารเสริมสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นั้นมีความแตกต่างกันเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังในรูปภาพที่ 5 ในส่วนของกิจกรรมกระบวนการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน นั้นเมื่อเปรียบเทียบกันทางสถิติแล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ตลอดการทดลอง แต่แนวโน้มค่ากิจกรรมกระบวนการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดและนาโน-เคอร์ซิตินนั้นมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 6 และในกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมนั้นเมื่อเปรียบเทียบกันทางสถิติแล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ตลอดการทดลอง แต่ในกลุ่มการทดลองที่ได้รับสารสกัดและนาโน-เคอร์ซิตินนั้นมีค่ากิจกรรมที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ค่าแนวโน้มกิจกรรมกลับลดลงเมื่อได้รับปริมาณสารสกัดและนาโน-เคอร์ซิตินที่สูงขึ้นตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 ถึงสัปดาห์ที่ 8 ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 5 กิจกรรมไลโซไซม์ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิติน ที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 8 ตัวอักษร a และ b แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างกลุ่มทดลอง ทดสอบโดยใช้วิธีของ Duncan's multiple range test

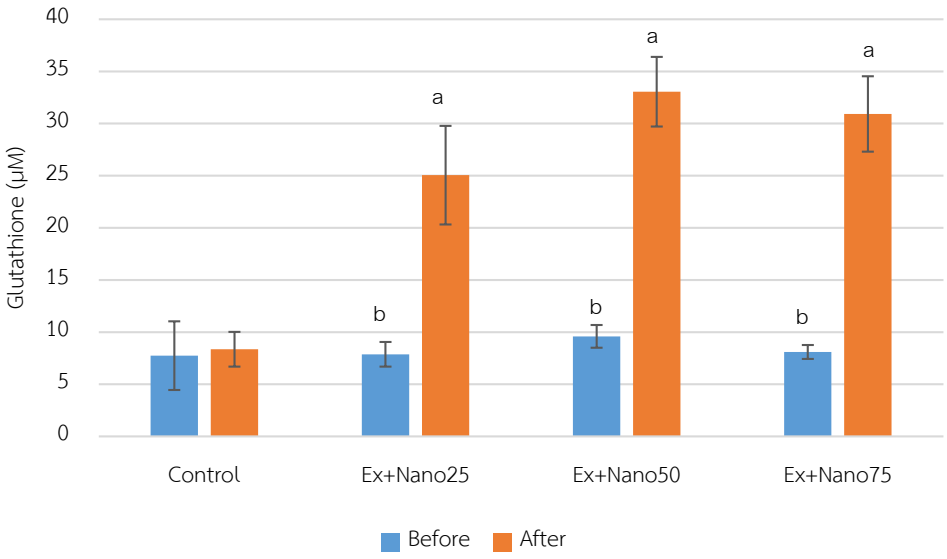


ภาพที่ 6 กิจกรรมกระบวนการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 8

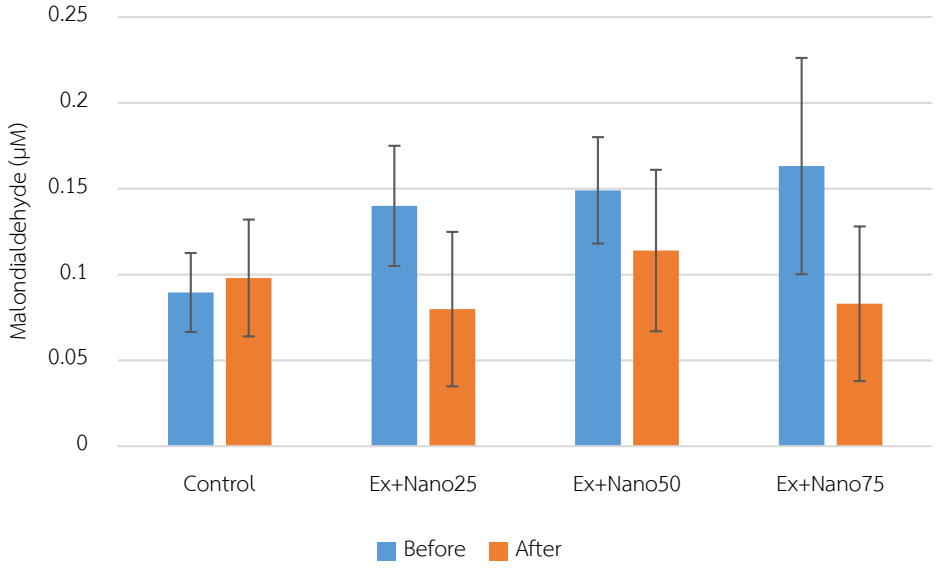


ภาพที่ 7 กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 8

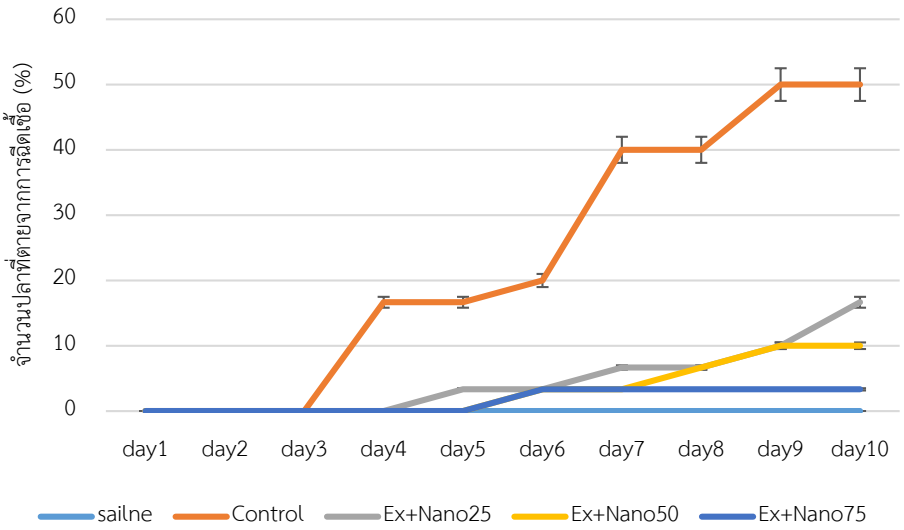
ปลานิลที่เลี้ยงด้วยสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเมื่อเลี้ยงครบระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปริมาณกลูต้าไธโอนได้เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อดูจากก่อนการทดลอง ซึ่งในกลุ่มการทดลองที่ได้รับสารสกัดร่วมกับนาโน-เคอร์ซิตินมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกันกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกันเอง ($P>0.05$) ซึ่งปริมาณกลูต้าไธโอนในชุดการทดลองที่ได้รับสารสกัดร่วมกับนาโน-เคอร์ซิติ 50 มิลลิกรัมนั้นมีปริมาณมากที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 6 และในการทดลองมาลอนไดอัลดีไฮด์พบว่าเมื่อเลี้ยงจนจบการทดลอง ค่าปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในกลุ่มการทดลองที่ได้รับสารสกัดร่วมกับนาโน-เคอร์ซิติ มีค่าการลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันกลับพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 8 และเมื่อสิ้นสุดการทดลองได้นำปลามาทดสอบเชื้อ *S. agalactiae* ปริมาณ 1×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตรต่อตัวพบว่าในวันที่ 3 กลุ่มควบคุมเริ่มมีการตายเกิดขึ้น ในส่วนของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดร่วมกับนาโน-เคอร์ซิติน เริ่มมีการตายตั้งแต่วันที่ 4 และเมื่อครบ 10 วันพบว่ากลุ่มควบคุม ได้มีอัตราการตายสูงที่สุดรองลงมาคือกลุ่มที่ได้รับสารสกัดร่วมกับนาโน-เคอร์ซิติน 25 ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 8 ปริมาณกลูต้าไธโอนของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสารสกัด 0.1 มิลลิลิตร ผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมตั้งแต่เริ่มการทดลองถึงสิ้นสุดการทดลอง



ภาพที่ 9 ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมสารสกัด 0.1 มิลลิลิตร ผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมตั้งแต่เริ่มการทดลองถึงสิ้นสุดการทดลอง



ภาพที่ 10 อัตราการตายสะสมของปลานิลที่ได้รับสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรผสมนาโน-เคอร์ซิตินที่ 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมต่างกันเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ S. agalactiae ปริมาณ 1 x 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตรต่อตัว

วิจารณ์ผลการทดลอง

ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) จัดเป็นสารประกอบในกลุ่ม โพลีฟีนอล (polyphenolic compounds) และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบได้ในพืชมีมากกว่า 9,000 ชนิด รวมถึงพืชสมุนไพรที่ใช้ในตำราแพทย์แผนโบราณ มีงานวิจัยจำนวนมากแสดงให้เห็นว่าฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง เช่น ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ปรับการทำงานระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulation) เป็นต้น วิภพ (2556) ได้มีการใช้สมุนไพรบางชนิดที่ให้ผลดีต่อคนและสัตว์บกโดยไม่ส่งผลข้างเคียง จึงนำมาประยุกต์ใช้กับสัตว์น้ำ การใช้สมุนไพรในการควบคุมโรคปลาและกุ้งประสบผลสำเร็จอย่างดีในเม็กซิโก อินเดีย ญี่ปุ่นและไทย (Chitmanat, 2013) Citarasu et al. (2002) กล่าวว่าสารสกัดจากสมุนไพรที่ใช้ในการเลี้ยงปลาช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต เพิ่มปริมาณน้ำย่อย เพิ่มปริมาณการบริโภคโดยการเปลี่ยนอาหารเพิ่มขึ้น นำไปสู่การสังเคราะห์โปรตีนที่สูงขึ้น ลดความเครียด เพิ่มการใช้กรดไขมันโดยพบว่าไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาที่ต่ำลงและระดับ HDL-CHO ในพลาสมาสูงขึ้น เช่นการได้รับสาร Genistein ที่ระดับต่ำ โดย Genistein จะเข้าไปจับกับตัวรับ estrogen receptor ซึ่งช่วยในการเพิ่มจำนวนเซลล์ในการสังเคราะห์โปรตีน (Cleveland, 2014) และสารสกัดจากสมุนไพรจากธรรมชาติหลายชนิดเช่น sanguinarine, chelerythrine, chelidonine, dioscin, polyphyllin, brucein, palmitic acid, pharnilatin, osthol และ isopimpinellin ได้รับการสกัดออกจากพืชต่าง ๆ พิสูจน์แล้วว่ามีฤทธิ์ในการฆ่าพยาธิที่ดีกว่าการควบคุมด้วยยา mebendazole และยังมีส่วนช่วยในต้านแบคทีเรียแสดงความสามารถในการเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียสูงมากผ่านกระบวนการที่ก่อให้เกิดการตายของเซลล์หลายชนิด (apoptosis-inducing pathways) ที่อาจเกี่ยวข้องกับการกำจัดปรสิต และแบคทีเรีย (Reverter et al., 2014) การในการทดลองครั้งนี้ได้ทดสอบใช้สารสกัดจากสมุนไพรไทยซึ่งมีปริมาณฟลาโวนอยด์ที่สูง เช่น ใบฝรั่ง ใบสะเดา ใบมะกรูด ใบหูกวาง ใบฟ้าทะลายโจร ใบคาวทอง ต้นกวาวเครือ เพื่อมาเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและป้องกันเชื้อก่อโรคในปลานิล เช่น *S. agalactiae* ซึ่งพบว่าการใช้สารสกัดเริ่มต้นเพียง 0.1 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัมพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตให้แก่ปลานิลเช่นเดียวกับการทดลองของ Shib et al. (2015) ได้เสริมสารสกัดจากใบฝรั่งให้ปลายี่สกเทศ (*L. rohita*) 0.5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 60 วัน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ) Jegede (2012) การเสริมกระเทียม (*Allium sativum*) 20 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมในปลาหมอเทศ (*Tilapia zilii*) ให้อัตราการเจริญเติบโตต่อปลาหมอเทศดีที่สุด และการเสริมผักหวานบ้าน (*Sauropus androgynus*) สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตในปลาเก๋า (*Epinephelus coioides*) ได้ (Putra et al., 2013) ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Dügenci et al. (2003) ได้ทดสอบให้สารสกัดจากต้นตำแยกัด (*Urtica dioica*) ในปลา

เทร้าต์ (*Oncorhyncus mykiss*) พบว่าไม่สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตในปลาได้แต่สามารถปรับเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้

ในส่วนการทดลองเสริมสารสกัดสมุนไพรยังสามารถช่วยลดอัตราการตายของปลาเมื่อได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ปริมาณ 1 x 10^8 CFU ซึ่งพบว่าการใช้สารสกัดเริ่มต้นเพียง 0.1 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถลดอัตราการตายได้ เช่นเดียวกับการทดลองของ Shib et al. (2015) ได้เสริมสารสกัดจากใบฝรั่งให้ปลายี่สกเทศ (*L. rohita*) 0.5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 60 วัน สามารถลดตายจากเชื้อ *A. hydrophila* และ Yogeshwari et al. (2015) ทดสอบให้อาหารผสมสารสกัดจาก ต้นระย่อมพินเก้ (*R. tetraphylla*) เพียง 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมสามารถลดอัตราการตายจากเชื้อ *A. invadans* ในปลายี่สกเทศได้ จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากสมุนไพรหลายชนิดสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและบางชนิดยังสามารถเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้

การทดลองครั้งนี้ เมื่อเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารผสมสารสกัดร่วมกับนาโน-เคอร์ซิตินเคอร์ซิตินพบว่าสามารถส่งผลต่อการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับการทดลองของ Jia et al. (2019) ที่ทดลองเลี้ยงปลา Blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) โดยให้อาหารผสมเคอร์ซิติน 8 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ามีอัตราการเจริญเติบโต น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราแลกเนื้อแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Yang et al. (2020) ให้อาหารผสมเคอร์ซิตินในไก่เนื้อ (200, 400 และ 600 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นาน 6 สัปดาห์) พบว่าไม่สามารถเสริมอัตราการเจริญเติบโตได้ การศึกษาของ Pês et al. (2016) พบว่า เคอร์ซิติน 1.5 ถึง 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมไม่มีผลต่อค่าฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต silver catfish (*Rhamdia quelen*) ($P>0.05$) จะเห็นว่าความแตกต่างของเคอร์ซิตินขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์และปริมาณที่ให้ หากปลาได้รับอาหารผสมเคอร์ซิตินในระดับที่สูงขึ้น 5 ถึง 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม อาจจะทำให้การเจริญเติบโตดีขึ้น อย่างไรก็ตามในงานทดลองนี้ ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดและนาโน-เคอร์ซิติน สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตในปลานิลได้ เดิมเคยมีความเชื่อกันว่าฟลาโวนอยด์ถูกดูดซึมในรูปของอไกลโคนเท่านั้น โดยถูกดูดซึมในลำไส้ใหญ่หลังจากถูกเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ที่ผลิตจากแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ ดึงน้ำตาลออก แต่ต่อมาพบว่าฟลาโวนอยด์ที่มีน้ำตาลเป็นกลูโคส เช่น quercetin-4′-glucoside และ quercetin-3,4′- bis-glucoside ซึ่งเป็น hydrophilic glycoside ในหัวหอม สามารถดูดซึมได้โดยตรง โดยอาศัย Na^+-dependent glucose transporter (SGLT1) จากการทดลองพบว่า เมื่ออุ่นน้ำลายกับ quercetin 4′-glucoside จะได้ เคอร์ซิตินอย่างรวดเร็ว แต่ถ้าเป็นน้ำตาลอื่นที่ไม่ใช่กลูโคส เช่น rutin (quercetin 3-rhamnoglucoside) หรือ quercitrin (quercetin 3-rhamnoside) หรือ naringin (naringenin 7-rhamnoglucoside) น้ำลายไม่สามารถไฮโดรไลซ์ได แบคทีเรียยังสามารถเปลี่ยน

เคอร์ซิตินให้เป็นกรดฟีโนลิคชนิดต่างๆ ได้แก่ 3,4- dihydroxyphenylacetic acid, 3-methoxy-4 hydroxyvanillic acid และ 3-hydroxyphenyl acetic acid นอกจากนี้ ยังพบว่าหลังจากที่ให้เคอร์ซีตินอไกลโคนทางหลอดเลือดดำ และโดยการให้ทางปาก เคอร์ซิตินสามารถสลายตัวได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ได้หมด แล้วถูกขับออกทางลมหายใจ (ฉันทนา, 2556) มีการศึกษาพบว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์ไม่ได้ช่วยกระตุ้นต่อมใต้สมองให้ผลิตโกรทฮอร์โมน (growth hormone) จาก pituitary gland แต่สามารถลดระดับจากความเครียด (cortisol) ได้ (Pês et al. 2016) และจากการศึกษาพบว่าการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นของปลานิล มาจากการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ย่อยอาหารของลำไส้ ซึ่งในปัจจุบันกลไกของเคอร์ซิตินต่อการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นก็ยังไม่สามารถสรุปได้เป็นที่แน่ชัด (Zhai and Liu, 2013)

ไลโซไซม์ (lysozyme) เป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากเม็ดเลือดขาวกลุ่มนิวโตรฟิล (neutrophils) และแมคโครฟาจ (macrophages) พบได้ในเมือกและน้ำเลือด เป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immune defense) ของสิ่งมีชีวิต ช่วยในการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย ช่วยจับเชื้อโรคเพื่อให้เกิดฟาโกไซโตซิส (opsonization) และช่วยในการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ (complement system) ในการศึกษาครั้งนี้กลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดร่วมนาโน-เคอร์ซิตินมีค่ากิจกรรมไลโซไซม์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Elham et al. (2013) ศึกษาพบว่ากิจกรรมไลโซไซม์ของปลาเทราต์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มทดลองจากการให้อาหารผสมเคอร์ซิตินเป็นเวลา 14 วัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลาที่ได้รับปริมาณเคอร์ซิตินสูงสุดจะมีค่ากิจกรรมไลโซไซม์ที่สูง ในทำนองเดียวกันการให้อาหารผสมเคอร์ซิตินปลาเทราต์ที่ระดับ 5 ถึง 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ให้ค่ากิจกรรมไลโซไซม์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Bilen et al., 2011) และในการทดลองของ Yang et al. (2020) พบว่าเมื่อให้อาหารผสมเคอร์ซิติน 2 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมในไก่เนื้อทำให้ระบบคอมพลีเม้นต์ (complement) C3 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและเพิ่มคอมพลีเม้นต์ C4 เมื่อผสมเคอร์ซิติน 6 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ($P=0.001$) มีระดับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

กลไกการทำลายแบคทีเรียภายในเซลล์ฟาโกไซต์ เรียกว่า เรสไปราทอรีเบิสท์ (respiratory burst) เป็นกลไกการป้องกันโดยธรรมชาติที่สำคัญของปลาที่มีความเกี่ยวข้องกับเซลล์ภูมิคุ้มกันและมีการใช้กันอย่างแพร่หลายเป็นตัวบ่งชี้การวัดภูมิคุ้มกัน ประจุไฟฟ้าลบที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยานี้สามารถวัดได้ผ่านทางชุดทดสอบการลดไนโตรบลูเตตโซเลียม (NBT) (Sookchaiyaporn et al., 2020) ปฏิกิริยาสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์หลังจากกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) ผ่านการสร้างอนุมูลออกซิเจน (O_2^-) Gottfredsen et al. (2013) ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่ากระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดร่วมกับนาโน-เคอร์ซิติน ไม่มี

ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) และกระบวนการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (P>0.05) อาจจะกล่าวได้ว่าเคอร์ซิตินไม่ได้มีส่วนช่วยกระตุ้นการทำงานของเซลล์ฟาโกไซต์ จึงทำให้ผลที่แสดงออกมามีความไม่แตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์

กลูตาไธโอน เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เซลล์ในร่างกายสัตว์สามารถสังเคราะห์ได้เอง มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ทำหน้าที่ปกป้องเนื้อเยื่อไม่ให้ถูกทำลาย โดยสารอนุมูลอิสระที่สะสมอยู่ตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย โดยใช้หมู่ไธออล (-SH) ในการรีดิวซ์อนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในพืช สัตว์ เห็ดรา และแบคทีเรีย และอาร์เคียบางชนิด ทำหน้าที่ป้องกันองค์ประกอบสำคัญของเซลล์ที่เกิดจากออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยา (reactive oxygen species) เช่น อนุมูลอิสระหรือเปอร์ออกไซด์ (อริน, 2558) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่ากลูตาไธโอนในกลุ่มการทดลองที่ได้รับสารสกัดร่วมกับนาโนเคอร์ซิติน เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกันระหว่างก่อนการทดลองและหลังการทดลอง (P<0.05) ซึ่งต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มีค่ากลูตาไธโอนเพิ่มขึ้นเลย เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Pês et al. (2016) พบว่า เคอร์ซิติน 1.5 ถึง 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมสามารถเพิ่มระดับของกลูต้าไธโอนในปลา silver catfish (*Rhamdia quelen*) (P<0.05) ทั้งในเนื้อเยื่อสมอง ตับ ใต เหงือก และกล้ามเนื้อ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และการทดลองของ Zou et al. (2016) ที่ใช้เคอร์ซิติน 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมนำมาเลี้ยงกับลูกหมูพบว่าค่ากลูต้าไธโอนในเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.01) ทั้งในซีรัม ตับ และกล้ามเนื้อ

สารประกอบมาลอนไดอัลดีไฮด์ เป็นผลิตภัณฑ์ที่สองจากการเกิดปฏิกิริยาลิพิเปอร์ออกซิเดชั่น (lipid peroxidation) ของกรดไขมันอิ่มตัว โดยปริมาณสารประกอบมาลอนไดอลดีไฮด์จะถูกใช้เป็นสารต้นแบบหรือตัวชี้วัดทางชีววิทยา สำหรับการศึกษากระบวนการลิพิดเปอร์ออกซิเดชั่นในสิ่งมีชีวิต ถ้าสารนี้มีปริมาณเพิ่มขึ้นจะสแดงถึงความผิดปกติหรือเสี่ยงต่อการเป็นโรคต่าง ๆ (ณัฐธิดา, 2560) ในการศึกษาครั้งนี้ปลานิลที่ได้รับสารสกัดร่วมกับนาโน-เคอร์ซิตินมีปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ลดลงอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกันแล้วระหว่างก่อนการทดลองและหลังการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Pês et al. (2016) พบว่า เคอร์ซิติน 1.5 ถึง 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมสามารถลดระดับของมาลอนไดอัลดีไฮด์ในปลา silver catfish (*Rhamdia quelen*) (P<0.05) ทั้งในเนื้อเยื่อสมอง ตับ ใต เหงือก และกล้ามเนื้อ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และการทดลองของ (Zou et al., 2016) ที่ใช้เคอร์ซิติน 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมนำมาเลี้ยงกับลูกหมูพบว่าค่าลอนไดอัลดีไฮด์ลดลงอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ (P<0.01) ทั้งในซีรัม ตับ และกล้ามเนื้อ

การฉีดเชื้อก่อโรคเข้าไปในตัวปลาก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ความสามารถของระบบภูมิคุ้มกันหลังจากปลาได้รับอาหารผสมสารสกัดร่วมกับนาโน-เคอร์ซิติน ซึ่งการใช้เชื้อ

Streptococcus agalactiae มาเป็นตัวทดสอบความต้านทานเชื้อก่อโรคเนื่องจากเป็นเชื้อที่สร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกร และมีอัตราการตายของปลาที่รวดเร็วเมื่อมีอุณหภูมิน้ำสูงขึ้น (Mian et al., 2009) การทดลองครั้งชี้ให้เห็นว่าเมื่อปลาได้รับอาหารสารสกัดร่วมกับนาโน-เคอร์ซิติน ทำให้มีอัตราการตายจากเชื้อก่อโรคลดลง เมื่อได้รับปริมาณสารสกัดร่วมกับนาโน-เคอร์ซิตินที่สูงขึ้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Elham et al. (2013) พบว่าเมื่อปลาเทร้าต์ได้รับเคอร์ซิตินที่ระดับ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ทำให้เชื้อ *A. hydrophila* มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn (2007) ได้ใช้สารสกัดจากใบฝรั่งซึ่งมีปริมาณของเคอร์ซิตินที่สูง พบว่าเมื่อทดลองค่า MIC โดยการเติมเคอร์ซิติน 200 ถึง 300 ไมโครกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ *A. hydrophila, A. salmonicida, F. columnare, L. garvieae, S. agalactiae* และ *V.salmonicida* สามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคลงได้ (OD_{600} nm) และมีการทดลองของ Kumar et al. (2016) ยืนยันผลการยับยั้งของเชื้อก่อโรคด้วยการบ่มนาโน-เคอร์ซิตินกับเชื้อ *S. aureus* (7.03 ppm, MIC) เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแล้วนำไปสแกนด้วยกล้อง SEM พบว่าลักษณะของเซลล์ *S. aureus* มีลักษณะฝ่อลง โดยการทำงานของเคอร์ซิตินนั้นคล้ายกับตัวยับยั้งเอนไซม์ DNA gyrase ซึ่งเป็นตัวควบคุมลักษณะรูปร่างของ DNA (Ohemeng et al., 1993) และยับยั้งเอนไซม์ ATPase (Plaper et al., 2003) เคอร์ซิตินยังสามารถซึมผ่านเนื้อเยื่อและยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์แบคทีเรีย (Mirzoeva et al., 1997) จึงสามารถกล่าวได้ว่า เมื่อเคอร์ซิตินซึมเข้าไปสู่เนื้อเยื่อจะทำให้แบคทีเรียไม่สามารถคงรูปร่างและทำลายเซลล์ในที่สุด

ในส่วนของต้นทุนการผลิตนั้น ทางผู้วิจัยได้ใช้สารเคอร์ซิติน >98% (sigma) Pluronic F-127 (Sigma) และ tween80 (บริษัทเคมีภัณฑ์ ประเทศไทย) ต้นทุนการผลิตนาโน-เคอร์ซิตินต่อกรัมนั้นอยู่ที่ 390 บาทและต้นทุนของสารสกัดสมุนไพรอยู่ที่ 0.6 บาทต่อ 0.1 มิลลิลิตร ซึ่งจะเป็นการเพิ่มต้นทุนอาหารที่ 20.1 บาทต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และในการทดลองครั้งนี้กลุ่มทดลองที่มีอัตราการแลกเปลี่ยนเนื้อต่ำที่สุดอยู่ที่ 1.8 ซึ่งเมื่อคิดต้นทุนแล้วเมื่อปลาน้ำหนัก 1,000 กรัมจะใช้ต้นทุนการผลิตทั้งหมด 99.2 บาทโดยต้นทุนหลักจะอยู่ที่ค่าสารเคอร์ซิตินซึ่งหากจะมีการนำไปใช้เชิงพานิชย์ควรจะมีการใช้สารสกัดเคอร์ซิตินจากสมุนไพร หรือจากโรงงานที่รับผลิตสารเคอร์ซิตินเพื่อเป็นการลดต้นทุน หรือการใช้ในเชิงยารักษาโรคและอาหารเสริม

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษา

การเสริมสารสกัด 0.1 มิลลิลิตรร่วมกับนาโน-เคอร์ซิตินที่ระดับ 25 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในอัตราการให้อาหาร 4 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน พบว่า ปลานิลมีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด และการเสริมสารสกัดร่วมกับนาโน-เคอร์ซิตินทำให้เพิ่มค่ากิจกรรมไลโซไซม์ ค่ากลูตาไธโอน ค่ามาลอนไดอัลดีไฮด์ และอัตรารอดหลังจากทดสอบเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เพิ่มขึ้น

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาผลของสารสกัดครั้งนี้ควรที่จะมีการทดลองระบบภูมิคุ้มกันไม่จำเพาะของปลานิลควบคู่ด้วย เนื่องจากจะได้สามารถนำไปเปรียบเทียบกันระหว่างว่าระหว่างการเสริมสารสกัด และการเสริมนาโน-เคอร์ซิตินเข้าไปจะสามารถให้ผลได้ดีกว่าเดิมหรือไม่ หรือผลที่ได้นั้นจะหักล้างกัน

ระยะเวลาทดลอง 8 สัปดาห์ซึ่งมีระยะเวลาที่น้อยเมื่อเทียบกับการเลี้ยงปลานิลเชิงพานิชย์ จึงควรต้องมีการศึกษาผลในระยะยาวเพิ่มขึ้น และควรที่จะมีการทดลองสารทั้งสองชนิดในการเลี้ยงเชิงพานิชย์ภายในฟาร์มเลี้ยงปลา ซึ่งการทดลองกับการเลี้ยงปลาจริงนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมาก ทั้งเรื่องระบบน้ำ สภาพอากาศ และสภาวะที่หนาแน่นของปลา

การนำไปใช้เลี้ยงจริงเชิงพานิชย์ควรจะใช้สารสกัดร่วมกับนาโน-เคอร์ซิติน ในลักษณะเป็นยาหรืออาหารเสริมเนื่องจากต้นทุนของ สารสกัด และนาโน-เคอร์ซิตินยังมีต้นทุนที่สูง ซึ่งในอนาคตการผลิตสารนาโน-เคอร์ซิตินอาจจะเป็นเรื่องง่ายขึ้นและมีต้นทุนที่ถูกลงเนื่องจากปัจจุบันได้มีการใช้สารดังกล่าวในลักษณะยาของคนและสัตว์บกแล้ว

บรรณานุกรม

กรมประมง. ม.ป.ป.-ก. **ชีวะวิทยาของปลานิล**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.fisheries.go.th/genetic/index.php/2013-11-15-01-35-24/85-2013-11-25-08-28-46/101-2014-02-06-01-52-39?showall=1&limitstart=. (15 ตุลาคม 2561).

กรมประมง. ม.ป.ป.-ข. **ปลานิล**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.fisheries.go.th/genetic/index.php/2013-11-15-01-35-24/85-2013-11-25-08-28-46/101-2014-02-06-01-52-39?showall=1&limitstart=. (15 สิงหาคม).

เกวลิน หนูฤทธิ์. 2563. **สถานการณ์การผลิตและการค้าปลานิลและผลิตภัณฑ์ในช่วง 3 เดือนแรก ปี 2563**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา https://www4.fisheries.go.th/local/pic_activities/202005190832332 (15 ธันวาคม 2563).

คีรี กออนันตกุล. 2542. **การเลี้ยงปลานิลแปลงเพศ**. กองประมงน้ำจืด กรมประมง.

เจนจิรา จิรัมย์ และ ประสงค์ สีหานาม. 2554. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ : แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. **วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์**, 1(1), 59-70.

ฉันทนา อารมณ์ดี. 2556. เภสัชจลนศาสตร์ของฟลาโวนอยด์. **วารสารอาหารและยา**, 20(2), 4-10.

ชนกันต์ จิตมนัส. 2545. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลา. **ว. สงขลานครินทร์ วทท.**, 24(4), 739-747.

ชนกันต์ จิตมนัส. 2556. โรคปลานิล. **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร**, 11(1), 75-86.

ฐิศิรักษ์ วรพัฒน์ผดุง และ ประณีต โอปณะโสภิต. 2557. พอลิเมอริกไมเซลล์เพื่อการนำส่งยา: การบรรจุยาด้วยวิธีทางกายภาพและปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพ. **ไทยไภษัชยนิพนธ์**, 9(2), 62-73.

ณยา วงษ์พูน, ใจพร พุ่มคำ และ ศิรศักดิ์ เทพาคำ. 2557. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับนาโนเทคโนโลยี General Information of Nanotechnology. **วารสารอาหารและยา**, 21(2), 10-13.

ณัฐธิดา ช่วยเมือง. 2560. **การหาปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์ในซากไก่เพื่อประโยชน์ทางนิติวิทยาศาสตร์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยศิลปากร.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์, ไมตรี สุทธจิตต์ และ สุพักตร์ พ่วงบางโพ. 2553. **ฤทธิ์ต้านอนุมูล อิสระของกะทกรก ทองพันชั่ง ผักหวานป่า เพกา และมะระขี้นก ในพื้นที่มหาวิทยาลัย นเรศวรพะเยา**. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา.

ปาริชาด พะกะยะ. 2545. **การจัดการการผลิตและผลผลิตของผู้เลี้ยงปลานิลในกระชัง ในจังหวัดขอนแก่น ปี 2544.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วิน เชยชมศรี. 2549. วิทยาภูมิคุ้มกันเปรียบเทียบ. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://pirun.ku.ac.th/fsciwcc/immune2.pdf (10 สิงหาคม 2560).

วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์. 2537. **เซลล์วิทยา กายภาพศาสตร์และพัฒนาการของระบบภูมิคุ้มกัน**. กรุงเทพฯ: บริษัท เค.พี. พริ้นติ้ง จำกัด.

วิภพ สุทธนะ. 2556. ฤทธิ์ต้านมะเร็งของฟลาโวนอยด์: กลไกการออกฤทธิ์. **ศรีนครินทร์เวชสาร**, 28(4), 568-582.

โสมทัต วงศ์สว่าง. 2538. **วิทยาภูมิคุ้มกันทางสัตวแพทย์**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อริน วิกูล. 2558. กลูตาไธโอน. **วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม**, 22(2), 23-26.

Amal, M. N. A. & Zamri-Saad, M. 2011. Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A Review. **Pertanika J. Trop. Agric. Sci.**, 34(2), 195 - 206.

Ames, B. N., Shigenaga, M. K. & Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 90(17), 7915–7922.

AOAC. 1984. **Official Method of Analysis of the Association of Official Analatical Chemists.**

Bhadoriya, S. S., Mangal, A., Madoriya, N. & Dixit, P. 2011. Bioavailability and bioactivity enhancement of herbal drugs by “Nanotechnology”: A review, J. Curr. Pharm. Res. 8: 1-7. **Journal of Current Pharmaceutical Research**, 8(1), 1-7.

Bilen, S., Bulut, M. & Bilen, A. M. 2011. Immunostimulant effects of Cotinus coggyria on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, 30(2), 451-455.

Buchweitz, M., Kroon, P. A., Rich, G. T. & Wilde, P. J. 2016. Quercetin solubilisation in bile salts: A comparison with sodium dodecyl sulphate. **Food Chemistry**, 211(1), 356-364.

Chakraborty, S., Stalin, S., Das, N., Choudhury, S. T., Ghosh, S. & Swarnakar, S. 2012. The use of nano-quercetin to arrest mitochondrial damage and MMP-9 upregulation during prevention of gastric inflammation induced by ethanol in rat. **Biomaterials**, 33(10), 2991-3001.

Chitmanat, C. 2013. Effects of herbal products on fish immunity. **KKU Res. J.**, 18(2), 257-268.

Citarasu, T., Babu, M., Sekar, R. & Marian, M. 2002. Developing artemia enriched herbal diet for producing quality larvae in penaeus monodon, Fabricius. **Asian fisheries science**, 15(21-32.

Cleveland, B. M. 2014. *In vitro* and *in vivo* effects of phytoestrogens on protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) white muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 165, 9-16.

Darwish, A. M. & Griffin, B. R. 2002. Study shows oxyetracycline controls Streptococcus in tilapia. **Global Aquaculture Advocate**, 5, 34-35.

Dügenci, S. K., Arda, N. & Candan, A. 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. **Journal of Ethnopharmacology**, 88(1), 99-106.

Elham, A., Dawn, A. & Alastair, R. L. 2013. Effect of black cumin seed oil (*Nigella sativa*) and nettle extract (Quercetin) on enhancement of immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture**, 388–391(1), 193–197.

Evans, J. J., Klesius, P. H., Gilbert, P. M., Shoemaker, C. A., Al Sarawi, M. A., Landsberg, J., Duremdez, R., Al Marzouk, A. & Al Zenki, S. 2002. Characterization of β-haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, Liza klunzingeri (Day), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, 25(9), 505-513.

FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). **Food and Agriculture Organization of the United Nation**, 23-24.

Ghiraldelli, L., Laterca Martins, M., Barros Adamante, W. & Yamashita, M. 2006. First Record of Trichodinacompacta Van As and Basson, 1989 (Protozoa: Ciliophora) from Cultured Nile Tilapia in the State of Santa Catarina, Brazil. **International Journal of Zoological Research**, 2(4), 369–375.

Gottfredsen, R. H., Larsen, U. G., Enghild, J. J. & Petersen, S. V. 2013. Hydrogen peroxide induce modifications of human extracellular superoxide dismutase that results in enzyme inhibition. **Redox Biology**, 1(1), 24-31.

Jegede, T. 2012. Effect of garlic (*Allium sativum*) on growth, nutrient utilization, resistance and survival of *Tilapia zillii* (Gervais 1852) fingerlings. **Journal of Agricultural Science**, 4(2), 269–274.

Jia, E., Yan, Y., Zhou, M., Li, X., Jiang, G., Liu, W. & Zhang, D. 2019. Combined effects of dietary quercetin and resveratrol on growth performance, antioxidant capability and innate immunity of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). **Animal Feed Science and Technology**, 256, 114268.

Kim, J., Liu, L., Guo, W. & M.Meydani. 2006. Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 17(3), 165-176.

Klesius, P. H., Shoemaker, C. A. & Evans, J. J. 2000. Vaccination: A health management practice for preventing diseases caused by streptococcus in tilapia and other cultured fish. p. 558-564. In **Tilapia Aquaculture in the 21st Century, Fifth International Symposium on Tilapia Aquaculture**

Klesius, P. H., Shoemaker, C. A. & Evans, J. J.. 2008. Streptococcus: A worldwide fish health problem. p. 83-107. In **8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture**.

Mian, G. F., Godoy, D. T., Leal, C. A. G., Yuhara, T. Y., Costa, G. M. & Figueiredo, H. C. P. 2009. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, 136(1), 180-183.

Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N. & Calder, P. C. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiological Research**, 152(3), 239-246.

Murray, C. K. & Fletcher, T. C. 1976. The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. **Journal of Fish Biology**, 9(4), 329-334.

Ohemeng, K. A., Schwender, C. F., Fu, K. P. & Barrett, J. F. 1993. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones(1). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 3(2), 225-230.

P. Rattanachaikunsopon & P. Phumkhachorn. 2007. Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of *Psidium guajava* on fish pathogens. **Fitoterapia**, 78(6), 434-436.

P. Rattanachaikunsopon & P. Phumkhachorn. 2010. Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of *Psidium guajava*. **Journal of Medicinal Plants Research.**, 4(5), 393-396.

Palle, S. & Neerati, P. 2017. Quercetin nanoparticles attenuates scopolamine induced spatial memory deficits and pathological damages in rats. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University.**, 55(1), 101–106.

Pês, T. S., Saccol, E. M. H., Ourique, G. M., Londero, É. P., Gressler, L. T., Golombieski, J. I., Glanzner, W. G., Llesuy, S. F., Gonçalves, P. B. D., Neto, J. R., Baldisserotto, B. & Pavanato, M. A. 2016. Quercetin in the diet of silver catfish: Effects on antioxidant status, blood parameters and pituitary hormone expression. **Aquaculture**, 458, 100-106.

Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Šolmajer, T. & Jerala, R. 2003. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 306(2), 530-536.

Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T. & Watanabe, T. 2004. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. **Fish & Shellfish Immunology**, 16(1), 25-39.

Putra, A., Santoso, U., Lee, M.-C. & Nan, F.-H. 2013. Effects of dietary katuk leaf extract on growth performance, feeding behavior and water quality of grouper *Epinephelus coioides*. **Aceh Int. J. Sci. Technol.**, 2(1), 17–25.

Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B. & Sasal, P. 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. **Aquaculture**, 433, 50-61.

Robinson, J. A. & Meyer, F. P. 1966. Streptococcal fish pathogen. **Journal of Bacteriology**, 92(2), 512.

Salvador, R., Muller, E. E., Freitas, J. C. d., Leonhadt, J. H., Pretto-Giordano, L. G. & Dias, J. A. 2005. Isolation and characterization of *Streptococcus spp*. group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, 35, 1374-1378.

Sassa-deepaeng, T., Pikulkaew, S. & Okonogi., S. 2016. Development of chrysin loaded poloxamer micelles and toxicity evaluation in fish embryos. **Drug Discoveries & Therapeutics.,** 10(3), 150-155.

Secombes, C. J. 1990. Isolation of salmoid macrophages and analysis of their killing activity. **Techniques in Fish Immunology**, 1, 137-155.

Sen, S. S., Sukumaran, V., Giri, S. S. & Park, S. C. 2015. Flavonoid fraction of guava leaf extract attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response via blocking of NF-**K**B signalling pathway in *Labeo rohita* macrophages. **Fish & Shellfish Immunology**, 47(1), 85-92.

Sookchaiyaporn, N., Srisapoome, P., Unajak, S. & Areechon, N. 2020. Efficacy of Bacillus spp. isolated from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linn. on its growth and immunity, and control of pathogenic bacteria. **Fisheries Science**, 86(2), 353-365.

Vadstein, O. 1998. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. **Aquaculture**, 155(1), 401-417.

Van Doan, H., Doolgindachbaporn, S. & Suksri, A. 2014. Effects of low molecular weight agar and Lactobacillus plantarum on growth performance, immunity, and disease resistance of basa fish (*Pangasius bocourti*, Sauvage 1880). **Fish & Shellfish Immunology**, 41(2), 340-345.

Verlhac, V., Gaudan, J. O. A., Schuep, W. & Hole, R. 1996. Influence of dietary Glucan and vitamin c on non-specific and specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) **Aquaculture**, 143(1), 123-133.

Wang, Y., Yu, J., Zhang, C., Li, P., Zhao, Y., Zhang, M. & Zhou, P. 2012. Influence of flavonoids from *Phellinus igniarius* on sturgeon caviar: Antioxidant effects and sensory characteristics. **Food Chemistry.,** 131(1), 206–210.

Yang, J. X., Maria, T. C., Zhou, B., Xiao, F. L., Wang, M., Mao, Y. J. & Li, Y. 2020. Quercetin improves immune function in Arbor Acre broilers through activation of NF-**K**B signaling pathway. **Poultry Science**, 99(2), 906-913.

Yogeshwari, G., Jagruthi, C., Anbazahan, S. M., Mari, L. S. S., Selvanathan, J., Arockiaraj, J., Dhayanithi, N. B., Ajithkumar, T. T., Balasundaram, C. & Ramasamy, H. 2015.

Herbal supplementation diet on immune response in *Labeo rohita* against *Aphanomyces invadans*. **Aquaculture**, 437, 351-359.

Yoshida, T. & Kitao, T. 1991. The opsonic effect of specific immune serum on the phagocytic and chemiluminescent response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* phagocytes. **Fish Pathology**, 26(1), 29-33.

Youdim, K. A., Shukitt-Hale, B. & Joseph, J. A. 2004. Flavonoids and the brain: Interaction at blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. **Free Rad Biol & Med.**, 37(11), 1683–1693.

Zhai, S.-W. & Liu, S.-L. 2013. Effects of Dietary Quercetin on Growth Performance, Serum Lipids Level and Body Composition of Tilapia (*Oreochromis Niloticus*). **Italian Journal of Animal Science**, 12(4), e85.

Zou, Y., Wei, H. K., Xiang, Q.-H., Wang, J., Zhou, Y.-F. & Peng, J. 2016. Protective effect of quercetin on pig intestinal integrity after transport stress is associated with regulation oxidative status and inflammation. **The Journal of veterinary medical science**, 78(9), 1487-1494.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การตรวจสอบผลการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันไม่จำเพาะของปลา

การวิเคราะห์ไลโซไซม์

การเตรียมสาร PBS (sodium phosphate buffer saline) 1 M

NaCl	8 g
KCl	200 mg
Na_2HPO_4	1.44 g
KH_2PO_4	240 mg

น้ำ DI เติมจนได้ปริมาตร 100 mL

ปรับ pH โดยใช้กรด HCl 0.1N หรือด่าง NaOH 0.1N

การคำนวณค่ากิจกรรมไลโซไซม์

1 ยูนิต (หน่วย) ของกิจกรรมไลโซไซม์ คือค่าความขุ่นของสารละลายที่ลดลง 0.001 ภายใน 1 นาที

ตัวอย่างการคำนวณ เมื่อทราบค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงที่ลดลงใน 1 นาทีเท่ากับ 0.005 คำนวณเป็นยูนิต จะได้ดังนี้

ค่า OD ที่ลดลง 0.001 ต่อ 1 นาที เท่ากับ 1 ยูนิต

ค่า OD ที่ลดลง 0.005 ต่อ 1 นาที เท่ากับ (1 × 0.005)/ 0.001 ยูนิต

ดังนั้นค่ากิจกรรมของไลโซไซม์จะเท่ากับ 5 ยูนิตต่อนาที

การวิเคราะห์การจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว

การเตรียมสาร

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ ใช้ RPMI 1640 900 มิลลิลิตร เติม pen/strep solution 100X 1 มิลลิลิตร
2. เตรียม Latex beads ผสมกับน้ำ DI ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปรับความเข้มข้นให้ได้ 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่ง Latex beads ใช้เป็นตัวแทนของสิ่งแปลกปลอมเพื่อให้เม็ดเลือดขาวจับกิน
3. เตรียม PBS pH 7.4 โดยนำ PBS 10X 100 มิลลิลิตรมาเติมกับน้ำ DI 900 มิลลิลิตรแล้วปรับ pH โดยใช้กรด HCl 0.1N หรือด่าง NaOH 0.1N

การคำนวณ เปอร์เซนต์การจับกินของเม็ดเลือดขาว

$$\text{Phagocytic activity} = \left(\frac{\text{จำนวนเซลล์ที่จับกิน beads}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดที่นับได้}}\right)\times100$$

การวิเคราะห์กระบวนการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (respiratory burst activity)

การเตรียมสาร

1. Nitro Blue Tetrazolium นำไปผสมกับน้ำ DI 1 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร
2. 2N KOH เตรียม KOH จำนวน 112.2 กรัมไปละลายกับน้ำ DI จนเต็ม 1,000 มิลลิลิตร

การคำนวณกระบวนการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน

การผลิต O_2^- = (ค่าเฉลี่ยที่วัดได้จากตัวอย่าง – ค่าเฉลี่ยของแบลงค์)

ทดสอบความต้านทานเชื้อก่อโรค *S. agalactiae*

การเตรียมเชื้อทดสอบการยับยั้งเชื้อโรค

นำปลานิลที่มีลักษณะติดเชื้อ *S. agalactiae* จากเกษตรอำเภอดอยหล่อ จังหวัดเชียงใหม่ มาแยกเชื้อจากตับ ไต ม้าม และสมอง มาเพาะเชื้อในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไปแยกเชื้อด้วยวิธีการ Streak plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อได้เชื้อแล้วนำมาปรับความเข้มข้น 10^8 CFU/ml โดยใช้คลื่น $OD_{610\ nm}$

การฉีดเชื้อ *S. agalactiae*

ฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อปลา 1 ตัวเข้าที่บริเวณช่องท้อง

การวิเคราะห์ผลหลังจากการฉีดเชื้อ

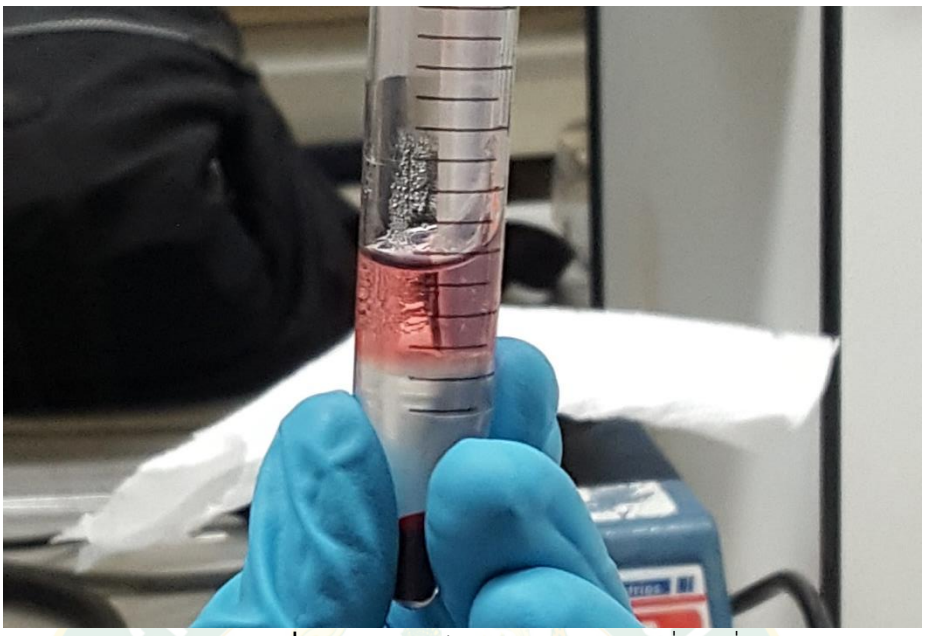
นับจำนวนการตายของปลาทุกวันเป็นระยะเวลา 10 วัน หรือถ้าหากปลาไม่มีการตายเกิดขึ้น สามารถนำปลามาทดสอบไลโซไซม์เพื่อวัดการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้

ภาคผนวก ข

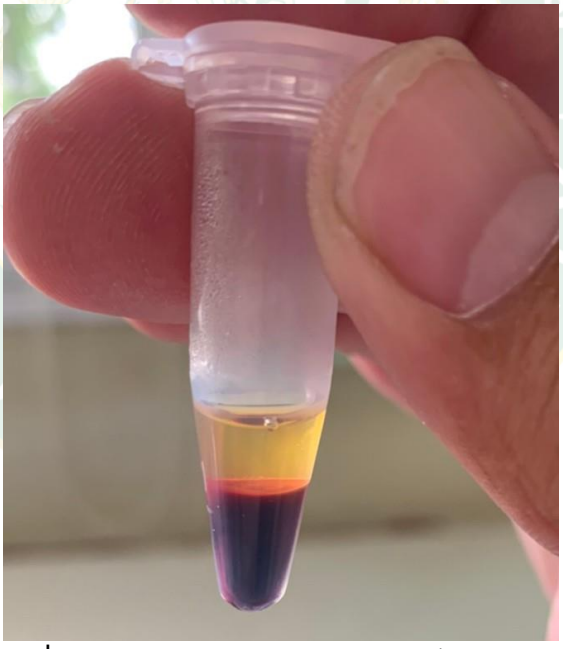
ประมวลภาพการดำเนินงานวิจัย

ภาพผนวกที่ 1 การเตรียมอุปกรณ์ชั่งวัดและเตรียมเจาะเลือดปลา

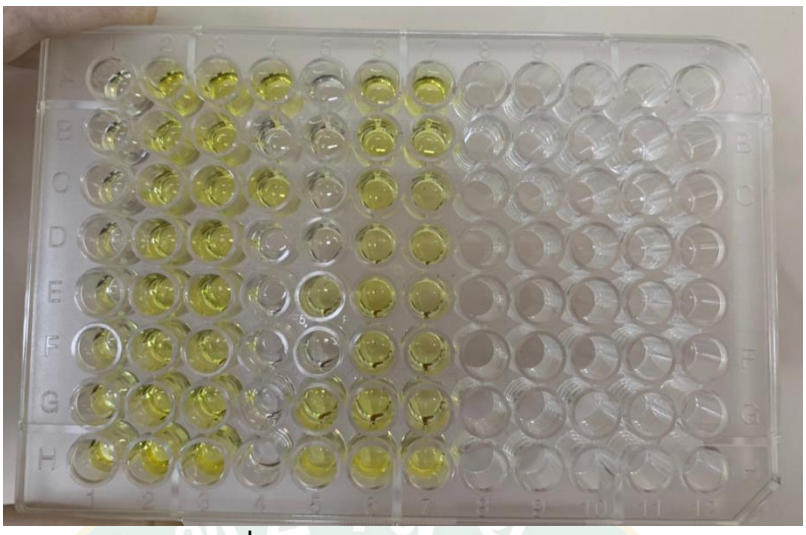
ภาพผนวกที่ 2 การเจาะเลือดปลาเพื่อตรวจวัดสารภูมิคุ้มกัน



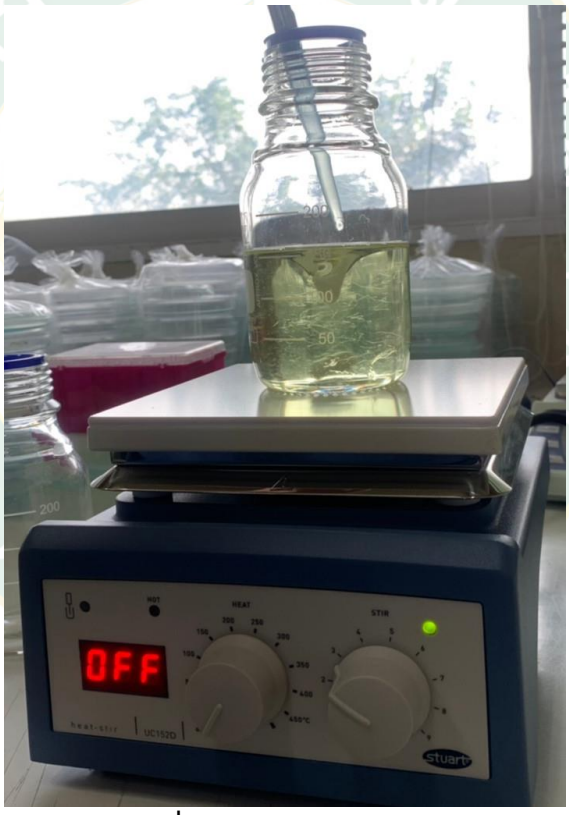
ภาพผนวกที่ 3 การแยกเม็ดเลือดขาวหลังจากปั่นเหวี่ยง



ภาพผนวกที่ 4 ซีรัมของปลานิลหลังจากเลือดแข็งตัวแล้ว 24 ชั่วโมง



ภาพผนวกที่ 5 วิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ



ภาพผนวกที่ 6 การผลิตสารนาโน-เคอร์ซิติน

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นายพงศกร น้อยมูล

เกิดเมื่อ 30 กันยายน 2535

ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2550 มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนปรินส์รอยแยลวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่

พ.ศ. 2554 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนกาวิละวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่

พ.ศ. 2558 ปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิตการประมง (การประมง) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ลำปาง จังหวัดลำปาง

ประวัติการทำงาน เข้ารับราชการในตำแหน่ง เจ้าพนักงานประมงปฏิบัติงาน ตั้งแต่วันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2561 ถึงปัจจุบัน ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยา สังกัด กองวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

โฉมอนันต์ โพธิวงค์, ชาญวิทย์ สุวรรณ์, พงศกร น้อยมูล, ภัคธีมา ยาวิชัย, สายสุนีย์ จิตมโนวรรณ์ และ ชนกันต์ จิตมนัส. 2563. ผลของพืชสมุนไพรต่อภูมิคุ้มกันและการเจริญเติบโตของปลา. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา, 25(2), 595-616.

พงศกร น้อยมูล, สุดาพร ตงศิริ และ ชนกันต์ จิตมนัส. 2564. ผลของการใช้นาโน-เคอร์ซิตินผสมในอาหารต่อการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ Streptococcus agalactiae ในปลานิล (Oreochromis niloticus). วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 26(3). (In press)