นิพนธ์ต้นฉบับ

คุณสมบัติของสารสกัดหยาบใบฝรั่งในการต่อต้านเชื้อแอโรโมนาส ไฮโดรฟิลล่า ในปลาคาร์พ

นันทริกา ชันซื่อ[1] สถิตย์ อรุณแสง[2] นงนุช อัศววงศ์เกษม[2] และ จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์[1]

Abstract

Chansue, N., Aroonseang, S., Assawawongkasem, N. and Tangtongpirot, J.
Antimicrobial effects of guava leaf (*Psidium guajava* Linn.) extract against *Aeromonas hydrophila* in fancy carp (*Cyprinus carpio*)
Songklanakarin J. Sci. Technol., March 2007, 29(Suppl. 1) : 69-81

The objective of this study was to determine the effects of guava leaves in treatment or prevention of bacterial infection using methanol extracted guava leaves. Three hundred and eighty four fancy carps (*Cyprinus carpio*) with average weight of 25.5 g. were acclimated for 14 days before the experiment. Fish were divided into 32 groups of two replicates each with 6 fish. All experiments were done in replicate. Guava leaves were macerated and extracted by methanol distillation and evaporation to produce 12.99% of dried leave weight. The exposures were divided into oral route using 5% (MIC) and 10 % (2xMIC). And 1000 ppm (MIC) and 2000 ppm (2xMIC) for dip and bath methods. MIC by agar dilution method was 1000 ppm. At the 1000 ppm concentration dipped for 5 minutes, fish lost consciousness but this was reversible when returned to freshwater, which may due to the antinociceptive effect. All fish died when dipped at 2000 ppm concentration. The relative percent survival (RPS) of 5% feed mix group was significantly higher than the 10% feed mix group and higher when fed for longer time. All groups receiving guava leaf extract had significantly

Department of Medicine, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand.

[1]Ph.D.(Veterinary Science), รองศาสตราจารย์ [2]นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
Corresponing e-mail: cnantari@gmail.com

higher percent phagocytosis and percent chemotaxis than the controls (P<0.05). The results indicated that guava leaf extract can stimulate the non-specific immune responses and decrease the mortality rate of the bacterial infected carp. The effects were enhanced by the longer period of exposure.

Key words : fancy carps, extracted guava leaves, *A. hydrophila*

บทคัดย่อ

นันทริกา ชันซื่อ สถิต อรุณแสง นงนุช อัศววงศ์เกษม และ จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์

คุณสมบัติของสารสกัดใบฝรั่งหยาบในการต่อต้านเชื้อแอโรโมนาส ไฮโดรฟิลล่า ในปลาคาร์พ

ว. สงขลานครินทร์ วทท. มีนาคม 2550 29(ฉบับพิเศษ 1) : 69-81

การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดใบฝรั่งในเอทานอลนอกตัวสัตว์ (*In vitro*) ด้วยวิธี MIC ของเชื้อ *A. hydrophila* (VMARCAh004) ก่อนนำมาทดลองในปลาคาร์พ (*In vivo*) จำนวน 384 ตัว ซึ่งแบ่งเป็น 32 กลุ่ม กลุ่มละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 6 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มที่ให้สารสกัดผสมในอาหาร 5% และ 10% โดยการกิน และกลุ่มที่ให้สารสกัดโดยการจุ่ม 5 นาที และแช่ตลอด 24 ชม. ที่ 1000 ppm และ 2000 ppm และแบ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับสารสกัดทั้ง 3 วิธีเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ก่อนทำการฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ที่ LD_{50} เข้าช่องท้อง และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหลังการฉีดเชื้อ 1 สัปดาห์ เปรียบเทียบผลจากเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ในการรอดตาย และความสามารถในการกลืนทำลายของเม็ดเลือดขาว โดยการวัดเปอร์เซนต์ฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) และเปอร์เซนต์เคโมเทกซิส (Chemotaxis) ร่วมกับการตรวจวัดค่าทางโลหิตวิทยา และค่าทางเคมีในโลหิต จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สารสกัดใบฝรั่งมีแนวโน้มในการเพิ่มภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immune) โดยลดอัตราการตายของปลาคาร์พที่ถูกฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดก่อนการฉีดเชื้อ มากกว่าการให้สารสกัดหลังจากที่ฉีดเชื้อแล้ว (P<0.05) และให้ผลดีเพิ่มขึ้นเมื่อทำการเพิ่มระยะเวลาในการให้ (P<0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งนี้การได้รับสารสกัดในความเข้มข้นสูงจะลดความอยากกินอาหาร และเป็นพิษต่อปลาคาร์พ

ฝรั่ง (Guava) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Psidium guajava* Linn. อยู่ในวงศ์ Myrtaceae เป็นไม้สูง ยืนต้น เปลือกต้นเรียบ ใบฝรั่ง เป็นแบบใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปวงรีหรือรูปวงรีแกมขอบขนานกว้าง 3-8 ซม. ยาว 6-14 ซม. (นันทวันและอรนุช, 2542) ถูกนำมาใช้รักษาโรคในทางการแพทย์แผนโบราณมากมาย เช่น การใช้ใบฝรั่งเคี่ยวเพื่อบรรเทาอาการปวดฟัน (Lewis and Elwin-Lewis, 1977) ใช้ลดไข้ เป็นยาบำรุงประสาท (Iwu, 1993) การใช้ใบฝรั่งต้มเพื่อลดการอักเสบ ห้ามเลือด (Hong-Ning, 1988) รักษาอาการท้องเสีย อาเจียนจากอหิวาตโรค (cholera) และอาการท้องเสีย ในวัว แกะ และแพะ (Lozoya *et al.*, 1994) และในสุนัข (Lans *et al.*, 2000) รักษาอาการท้องเสียเฉียบพลัน ท้องอืด และปวดท้อง (Lozoya *et al.*, 2002) ใบกับเปลือกฝรั่งต้มใช้อาบรักษาแผลกดทับ (sore) และแผลหลุม (Morton, 1980) ใบฝรั่งในสารละลายแอลกอฮอล์ สามารถใช้นวดหลังเพื่อลดอาการชัก (convulsion) จากลมบ้าหมู (epilepsy) ในเด็ก และอาการกล้ามเนื้อกระตุก (chorea) (Bhutani *et al.*, 1969) และยังมีรายงานทางวิทยาศาสตร์ในการออกฤทธิ์ในแง่ต่างๆ เช่น ใบฝรั่งที่สกัดด้วยน้ำมัน มีฤทธิ์ในการลดการเพิ่มจำนวน (anti-proliferative activity) ของมะเร็งผิวหนัง (epidermal carcinoma) ในช่องปากมนุษย์มากกว่าการรักษาด้วย Vincristine 4.37 เท่า (Manosroi *et al.*, 2005) สารสกัดด้วยเอทานอล สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลในเลือด (Maruyama *et al.*, 1985) และปรับระดับน้ำตาลของภาวะเบาหวานชนิด type II ให้เข้าสู่ภาวะปกติได้ในหนู (Oh *et al.*, 2005) เป็นต้น

สารออกฤทธิ์ส่วนใหญ่ของใบฝรั่ง คือ สารกลุ่ม Flavonoids, Terpenoid และ Tannin (Meckes *et al.*, 1996; Akihisa *et al.*, 1987) ซึ่งไม่มีสารกลุ่ม alkaloid

และ Anthraguinones ดังที่มักพบในพืชส่วนใหญ่ (Tona *et al.*, 1998) โดยสารที่อยู่ในกลุ่ม Flavonoids พวก Quercetin และ Quercetin-3 arabinoside มีสมบัติในการยับยั้งการหลั่งของ Acetylcholine ทำให้ลดการบีบตัว (spasmolytic effect) ของลำไส้ (Lutterodt, 1989) ยับยั้งเอนไซน์ Cyclo-oxygenase และรบกวนการสังเคราะห์ของ Postaglandin ซึ่งทำให้ลดอาการอักเสบ และไข้ (Lin *et al.*, 2002) รวมทั้งยังลดการเหนี่ยวนำในการทำลายดีเอนเอ (DNA damage) จากการใช้ Mitomycin C ในการรักษามะเร็งในคน (Undeger *et al.*, 2004) ซึ่งต่อมาพบว่า Quercetin ยังมีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Jacobasch *et al.*, 2001) ลดการอักเสบ และต้านมะเร็ง (Day *et al.*, 2000) ส่วนการศึกษาสารออกฤทธิ์ที่ใช้ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเกิดจากฤทธิ์ของ Quercetin (3,3',4',5'7-pentahydroxyflavone) avicularin (3-L-4-4-arabinofuranoside) และ guajavarin (3-L-4-pyranoside) (Oliver-Bever, 1986) และได้มีการพิสูจน์ว่ามีฤทธิ์ในการต้านและทำลายเชื้อ *Escherichia coli* (Voravuthikunchi *et al.*,2004) *Staphylococus aureus, Staphylococus epidermis, Bacillus subtitis* (Rabe and Staden, 1997) *Salmonella enteritidis* และ *Bacillus cereus, Salmonella typhi, Proteus mirabilis* และ *Shigella dysenteria* (Iwu, 1993) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการติดเชื้อ Rotavirus (Goncalves *et al.*, 2005) และเชื้ออะมีบา (antiamoebic) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียได้อีกด้วย (Lozoya *et al.*, 1994)

จากสมบัติของใบฝรั่งดังกล่าว ทำให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำใบฝรั่งมาใช้ในรักษาหรือป้องกันการติดเชื้อ *A. hydrophila* ซึ่งจัดเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Hazen *et al.*,1978) ที่ก่อให้เกิดปัญหาในการเลี้ยงสัตว์น้ำและธุรกิจอุตสาหกรรมปลาสวยงามเป็นจำนวนมาก อีกทั้งในปัจจุบันพบว่า เชื้อ *Aeromonas* spp. มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะจำนวนมากขึ้น การใช้สมุนไพรอาจช่วยลดปัญหานี้ลงด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

คัดเลือกปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio*) ที่ได้จากครอกเดียวกัน จากร้านขายปลาสวยงาม ตลาดจตุจักร กรุงเทพฯ คละเพศ ที่มีความยาวระหว่าง 6-8 ซม. น้ำหนักเฉลี่ย 25.5 กรัม จำนวน 384 ตัว นำมาเลี้ยงปรับสภาพก่อนทำการทดลอง 14 วัน โดยเลี้ยงในสภาพแวดล้อมเดียวกันคือ ที่อุณหภูมิ 28±2°C ในตู้กระจกขนาด 50 ลิตร จำนวนปลา 6 ตัว/ตู้ ให้อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำ 3% ของน้ำหนักตัวต่อวัน แบ่งให้ 3 มื้อ คือ 8.00, 12.00 และ 16.00 น. ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 20% ทุกวัน และตรวจคุณภาพน้ำในแต่ละตู้การทดลองทุก 7 วัน ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 27-28°C ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8-8.4 มก./ลิตร ออกซิเจนละลายน้ำ 6-8 มก./ลิตร แอมโมเนีย 0-1 มก./ลิตร และไนไตรท์ 0-1.6 มก./ลิตร ตลอดการทดลอง

2. การเตรียมสารสกัดใบฝรั่ง

ใช้วิธีการแช่ยุ่ย (maceration) ดัดแปลงจาก Olajide และคณะ (1999) โดยซื้อใบฝรั่งตากแห้งที่ถูกป่นละเอียดจำนวน 10 กก. แช่ในถังที่มี 90% เอทานอล (EtOH) ปริมาตร 50 ลิตรปิดฝา เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเก็บสารที่ได้มาปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที (rpm) เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่เป็นสารละลายกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 เพื่อแยกตะกอนออก ส่วนที่เป็นของเหลวนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศที่อุณหภูมิ 50°C จนได้สารสกัดที่มีลักษณะเหนียวข้น ชั่งน้ำหนักได้ 1.29 กก. คิดเป็น 12.99% ของใบแห้ง แล้วจึงใส่ขวดแก้วมีฝาที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปิดกันแสงด้วยกระดาษอะลูมิเนียม แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำมาใช้

3. การหา MIC (Minimum inhibitory concentrations)

จากการทดสอบเบื้องต้น พบว่า เมื่อละลายสารสกัดใบฝรั่งโดยใช้วิธี Macrobroth dilution จะให้สีน้ำตาลเข้มตามระดับความเข้มข้น ทำให้ไม่สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน จึงเลือกใช้วิธี Agar dilution ดัดแปลงจาก Christofilogiannis (2001) โดยทำการละลายสารสกัดใบฝรั่งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar (MHA) เริ่มที่ความเข้มข้น 40,000 ppm และเจือจางลงทีละ 100 ppm ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อผสม 90% เอทานอลเป็นตัวควบคุม อ่านผลที่ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ แล้วนำค่า MIC ที่ได้ใช้ในการศึกษาการ

ยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยผสมสารสกัดในอาหาร และในน้ำของแต่ละกลุ่มการทดลอง

4. วิธีการให้สารสกัดใบฝรั่ง

4.1 การกิน (Oral route): นำอาหารเม็ดสำเร็จรูปลอยน้ำมาผสมกับสารสกัดใบฝรั่ง โดยผสมสารสกัดใบฝรั่งที่ 5% (1 เท่าของ MIC) และ 10% (2 เท่าของ MIC) แบ่งให้กินในกลุ่มควบคุมที่ไม่ฉีดเชื้อ และกลุ่มทดลองที่กินอาหารก่อนฉีดเชื้อ 1 และ 2 สัปดาห์ รวมทั้งหลังฉีดเชื้อ 1 สัปดาห์ โดยในกลุ่มอื่นให้กินอาหารชนิดเดียวกันโดยไม่ผสมสารสกัดใบฝรั่ง ทุกกลุ่มให้อาหาร 3% ของน้ำหนักตัวต่อวัน แบ่งให้ 2 มื้อ (เช้า-เย็น)

4.2 การจุ่ม (Dip route): นำสารสกัดใบฝรั่งที่มีลักษณะเหนียวละลายกับเอทานอลประมาณ 10 มล. ก่อนใส่ลงในน้ำ ผสมสารสกัดใบฝรั่งในถังจุ่มในปริมาณ 1000 ppm (1 เท่าของ MIC) และ 2000 ppm (2 เท่าของ MIC) ทำการจุ่มปลาเป็นเวลา 5 นาที โดยจุ่มสารสกัดในปลากลุ่มควบคุม (ไม่ฉีดเชื้อ) และกลุ่มที่ทดลองก่อนฉีดเชื้อ *A. hydrophila* 1 และ 2 สัปดาห์ และหลังฉีดเชื้อ 1 สัปดาห์

4.3 การแช่ (Bathing route): ผสมสารสกัดใบฝรั่งในตู้ปลาในปริมาณ 1000 ppm (1 เท่าของ MIC) และ 2000 ppm (2 เท่าของ MIC) โดยนำสารสกัดใบฝรั่งที่มีลักษณะเหนียวละลายกับเอทานอลประมาณ 10 มล. ก่อนใส่ลงในน้ำ ทำเช่นเดียวกันในกลุ่มควบคุมที่ไม่ฉีดเชื้อ และกลุ่มทดลองที่แช่ในสารสกัดก่อนฉีดเชื้อ 1 และ 2 สัปดาห์ รวมทั้งหลังฉีดเชื้อ 1 สัปดาห์ โดยแช่ตลอดเวลา

5. การเตรียมเชื้อ *A. hydrophila* ที่ LD_{50}

นำเชื้อ *A. hydrophila* (VMARCAh004) ที่ได้จากการแยกเชื้อในปลาคาร์พ และพิสูจน์เชื้อด้วยชุดตรวจ API-20E test strip (bioMerieux® SA France) แล้วจึงนำมาหาค่า LD_{50} / 0.1 มล. ที่ 48 ชั่วโมง ตามวิธีของ Reed และ Muench (1983) เพื่อนำมาใช้ในการทดลองฉีดเชื้อ

6. การทดลองฉีดเชื้อ (challenge study)

ฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ที่ความเข้มข้นเท่ากับ LD_{50} ของเชื้อเข้าช่องท้องปลาคาร์พในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด และได้รับสารสกัดก่อนการฉีดเชื้อโดยการกิน จุ่ม และแช่ ที่ 1 และ 2 สัปดาห์ รวมทั้งกลุ่มที่ได้รับสารหลังติดเชื้อ 1 สัปดาห์ โดยนับอัตราการตายจนถึงวันที่ 14 หลังฉีดเชื้อในทุกกลุ่มการทดลอง เพื่อนำมาคำนวนเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ในการรอดตาย (Relative percent survival: RPS) (Baulny *et al.*, 1996)

RPS (%) = [% อัตราการตายของกลุ่มฉีดเชื้อที่ไม่ได้รับสารสกัด - กลุ่มฉีดเชื้อที่ได้รับสารสกัดแต่ละกลุ่ม] / กลุ่มฉีดเชื้อที่ไม่ได้รับสารสกัด

7. การแบ่งกลุ่มการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) โดยนำปลาคาร์พทั้งหมดจำนวน 384 ตัว แบ่งออกเป็น 32 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว แบ่งทำ 2 ซ้ำ โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็นชุดควบคุม ชุดที่ได้รับสารสกัดก่อนฉีดเชื้อ 1 และ 2 สัปดาห์ และหลังฉีดเชื้อ 1 สัปดาห์ในแต่ละกลุ่มการทดลอง ดังนี้

7.1 กลุ่มควบคุม
- กลุ่มที่ 1 ไม่ได้รับสารสกัด (Neg.C)
- กลุ่มที่ 2 ไม่ได้รับสารสกัด ฉีดเชื้อ (Pos.C)

7.2 กลุ่มการผสมอาหาร
- กลุ่มที่ 3 กินสารสกัด 5% 1 สัปดาห์ (O.MIC_1wk)
- กลุ่มที่ 4 กินสารสกัด 10% 1 สัปดาห์ (O.2MIC_1wk)
- กลุ่มที่ 5 กินสารสกัด 5% 2 สัปดาห์ (O.MIC_2wk)
- กลุ่มที่ 6 กินสารสกัด 10% 2 สัปดาห์ (O.2MIC_2wk)
- กลุ่มที่ 7 กินสารสกัด 5% 1 สัปดาห์ ก่อนก่อนฉีดเชื้อ (O.MIC_Pre1wk)
- กลุ่มที่ 8 กินสารสกัด 10% 1 สัปดาห์ ก่อนฉีดเชื้อ (O.2MIC_Pre1wk)
- กลุ่มที่ 9 กินสารสกัด 5% 2 สัปดาห์ ก่อนฉีดเชื้อ (O.MIC_Pre2wk)
- กลุ่มที่ 10 กินสารสกัด 10% 2 สัปดาห์ ก่อนฉีดเชื้อ (O.2MIC_Pre2wk)

กลุ่มที่ 11 กินสารสกัด 5% 1 สัปดาห์ หลังฉีดเชื้อ (O.MIC_Post1wk)

กลุ่มที่ 12 กินสารสกัด 10% 1 สัปดาห์ หลังฉีดเชื้อ (O.2MIC_Post1wk)

7.3 กลุ่มการจุ่ม

กลุ่มที่ 13 จุ่ม 5 นาที 1,000 ppm 1 สัปดาห์ (D.MIC_1wk)

กลุ่มที่ 14 จุ่ม 5 นาที 2,000 ppm 1 สัปดาห์ (D.2MIC_1wk)

กลุ่มที่ 15 จุ่ม 5 นาที 1,000 ppm 2 สัปดาห์ (D.MIC_2wk)

กลุ่มที่ 16 จุ่ม 5 นาที 2,000 ppm 2 สัปดาห์ (D.2MIC_2wk)

กลุ่มที่ 17 จุ่ม 5 นาที 1,000 ppm ก่อน 1 สัปดาห์แล้วฉีดเชื้อ (D.MIC_Pre1wk)

กลุ่มที่ 18 จุ่ม 5 นาที 2,000 ppm ก่อน 1 สัปดาห์แล้วฉีดเชื้อ (D.2MIC_Pre1wk)

กลุ่มที่ 19 จุ่ม 5 นาที 1,000 ppm ก่อน 2 สัปดาห์แล้วฉีดเชื้อ (D.MIC_Pre2wk)

กลุ่มที่ 20 จุ่ม 5 นาที 2,000 ppm ก่อน 2 สัปดาห์แล้วฉีดเชื้อ (D.2MIC_Pre2wk)

กลุ่มที่ 21 จุ่ม 5 นาที 1,000 ppm 1 สัปดาห์ หลังฉีดเชื้อ (D.MIC_Post1wk)

กลุ่มที่ 22 จุ่ม 5 นาที 2,000 ppm 1 สัปดาห์ หลังฉีดเชื้อ (D.2MIC_Post1wk)

7.4 กลุ่มการแช่

กลุ่มที่ 23 แช่ตลอด 24 ชม. 1,000 ppm 1 สัปดาห์ (B.MIC_1wk)

กลุ่มที่ 24 แช่ตลอด 24 ชม. 2,000 ppm 1 สัปดาห์ (B.2MIC_1wk)

กลุ่มที่ 25 แช่ตลอด 24 ชม. 1,000 ppm 2 สัปดาห์ (B.MIC_2wk)

กลุ่มที่ 26 แช่ตลอด 24 ชม. 2,000 ppm 2 สัปดาห์ (B.2MIC_2wk)

กลุ่มที่ 27 แช่ตลอด 24 ชม. 1,000 ppm ก่อน 1 สัปดาห์แล้วฉีดเชื้อ (B.MIC_Pre1wk)

กลุ่มที่ 28 แช่ตลอด 24 ชม. 2,000 ppm ก่อน 1 สัปดาห์แล้วฉีดเชื้อ (B.2MIC_Pre1wk)

กลุ่มที่ 29 แช่ตลอด 24 ชม. 1,000 ppm ก่อน 2 สัปดาห์แล้วฉีดเชื้อ (B.MIC_Pre2wk)

กลุ่มที่ 30 แช่ตลอด 24 ชม. 2,000 ppm ก่อน 2 สัปดาห์แล้วฉีดเชื้อ (B.2MIC_Pre2wk)

กลุ่มที่ 31 แช่ตลอด 24 ชม. 1,000 ppm 1 สัปดาห์ หลังฉีดเชื้อ (B.MIC_Post1wk)

กลุ่มที่ 32 แช่ตลอด 24 ชม. 2,000 ppm 1 สัปดาห์ หลังฉีดเชื้อ (B.2MIC_Post1wk)

8. การเก็บและตรวจเลือด

ทำการเจาะเลือดปลาในกลุ่มทดลองที่ 1 สัปดาห์ทั้งหมดที่ไม่ตายในเช้าวันที่ 8 และปลาในกลุ่มทดลองที่ 2 สัปดาห์ในเช้าวันที่ 15 ของการทดลอง โดยทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำส่วนท้าย (caudal vein) ด้วยไซริงค์ที่เคลือบด้วยเฮปาริน ทำการตรวจค่าทางโลหิตวิทยา ค่าชีวเคมีโลหิต และความสามารถในการกลืนทำลายของเม็ดเลือดขาว (phagocytic ability) และ chemotatic activity

9. การตรวจวัดค่าทางโลหิตวิทยา ค่าทางชีวเคมีในโลหิต และความสามารถในการกลืนทำลายของเม็ดเลือดขาว

ทำการนับค่าจำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC: cell/µl) และค่าจำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC: cell/ml) โดยใช้ hemocytometer (Thrall *et al.*, 2004) การวัดค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hct หรือ PVC: %) ตามวิธีของ Larsen และ Snieszko (1971)

นำเลือดที่เหลืออยู่มาแยกพลาสม่า (Hrubec and Smith, 1999) หยดพลาสม่าจำนวน 30 ไมโครลิตร ลงบนชุดตรวจสอบสำเร็จรูป (Reflotron® test; Roche;

Germany) สำหรับ blood Urea nitrogen (BUN), creatinine, alanine aminotransferase (ALT), aspatate aminotransferase (AST) และ glucose (GLU) แล้วนำมาอ่านผลด้วยเครื่องตรวจวัดค่าทางเคมีของเลือด (Reflotron® Plus; Roche; Germany) ส่วน total protein ในพลาสม่าอ่านด้วยเครื่องมือ total solid (TS) refractometer แล้วบันทึกข้อมูล

ทำการวัดความสามารถในการจับกินเชื้อแบคทีเรียของเม็ดเลือดขาว คือ phagocytosis ตามวิธีของ Mathews และคณะ (1990) และ chemotaxis activity ตามวิธีของ Weeks-Perkins และคณะ (1995) ดังนี้

% phagocytosis = [จำนวนเซลล์ที่กินแบคทีเรียใน 1 field x 100] / จำนวนเซลล์ทั้งหมดใน 1 field

% Chemotaxis = [จำนวนเซลล์ที่อยู่ด้านล่างของ membrane 1 field x 100] / จำนวนเซลล์ทั้งหมดใน 1 field

10. การตรวจคุณภาพน้ำ

โดยทำการตรวจคุณภาพน้ำในแต่ละตู้การทดลองในวันที่ 0, 7 และ 14 ทำการตรวจน้ำก่อนและหลังการละลายสารสกัดใบฝรั่งที่ความเข้มข้น 1000 ppm และ 2000 ppm ซึ่งทำการตรวจอุณหภูมิ และค่าออกซิเจนละลายในน้ำด้วยเครื่องตรวจวัดค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Oxygen meter; YSI MODEL 57) ค่าพีเอช ความเป็นด่าง คลอรีน ไนไตรท์ ซัลไฟด์ ความกระด้าง แอมโมเนีย และทำการตรวจค่าฟอตเฟต ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer; Haeh®DR/800)

11. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลอง โดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance: ANOVA) โดยใช้ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($P \leq 0.05$)

ผลการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อ *A. hydrophila* ที่ LD_{50} และค่า MIC

พบว่าค่า LD_{50} / 0.1 มล. ที่ 48 ชั่วโมง ของเชื้อมีค่าเท่ากับ $6x10^5$ เซลล์/มล. และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดใบฝรั่งที่ 1000 ppm เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อขึ้น จึงทำการผสมสารสกัดใบฝรั่งในอาหารที่ 5% และที่ 10% และผสมสารสกัดใบฝรั่งลงในน้ำแช่และจุ่ม 1000 ppm และ 2000 ppm

2. เปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ในการรอดตาย

จากการศึกษาสมบัติของสารสกัดใบฝรั่งในการต่อต้านเชื้อ *A. hydrophila* ในปลาคาร์พ โดยนับอัตราการตายหลังฉีดเชื้อ พบว่าปลาจะแสดงอาการติดเชื้อ ซึ่งมีจุดเลือดออกตามตัว และครีบท้อง บางตัวพบอาการท้องบวม และเริ่มมีการตายเกิดขึ้นที่ 8 ชั่วโมงหลังฉีดเชื้อ และมีอัตราการตายสูงสุด (Maximum mortality) ที่ 12-24 ชั่วโมง โดยมีเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ในการรอดตายต่ำสุดในกลุ่มควบคุมที่กินสารสกัดใบฝรั่ง 10 % หลังฉีดเชื้อ 1 สัปดาห์ (19.93%) และสูงสุดในกลุ่มที่กินสารสกัดใบฝรั่ง 5% ก่อนฉีดเชื้อ 2 สัปดาห์ กลุ่มจุ่มสารสกัด 1,000 ppm 5 นาที ก่อนฉีดเชื้อ 1 และ 2 สัปดาห์ (100%) และพบว่าในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่งโดยการแช่ที่ 1,000 และ 2,000 ppm รวมทั้งในกลุ่มที่จุ่มสาร 2,000 ppm 5 นาที ปลาตายหมดภายในเวลา 5-10 นาที (Table 1)

3. ค่าทางโลหิตวิทยา ชีวเคมีในโลหิต และค่าความสามารถในการกลืนทำลายของเม็ดเลือดขาว

กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดและถูกฉีดเชื้อ (Pos.C) จะมีค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงกว่าทุกกลุ่มการทดลอง รองลงมาเป็นกลุ่มที่กินอาหารผสมสารสกัด 10% หลังฉีดเชื้อ (O.2MIC_Post1wk) กลุ่มจุ่มสารสกัดหลังฉีดเชื้อ (D.MIC_Post1wk) กินอาหารผสม 5% หลังฉีดเชื้อ (O.MIC_Post1wk) และกลุ่มที่กินอาหารผสม 10% ก่อนฉีดเชื้อ 1 สัปดาห์ (O.2MIC_Pre1wk) ตามลำดับ และมีค่าแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) รวมทั้งมีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่ำกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นกลุ่มที่กินอาหารผสมสารสกัด 10% หลังฉีดเชื้อ

Table 1. Effect of dried guava leaves extract on relative percent survival (%RPS)

	Group	%RPS		Group	%RPS		Group	%RPS
1	Neg.C	N	12	O.2MIC_Post1wk	19.93	23	B.MIC_1wk	0
2	Pos.C	*	13	D.MIC_1wk	N	24	B.2MIC_1wk	0
3	O.MIC_1wk	N	14	D.2MIC_1wk	0	25	B.MIC_2wk	0
4	O.2MIC_1wk	N	15	D.MIC_2wk	N	26	B.2MIC_2wk	0
5	O.MIC_2wk	N	16	D.2MIC_2wk	0	27	B.MIC_Pre1wk	0
6	O.2MIC_2wk	N	17	D.MIC_Pre1wk	100	28	B.2MIC_Pre1wk	0
7	O.MIC_Pre1wk	60.02	18	D.2MIC_Pre1wk	0	29	B.MIC_Pre2wk	0
8	O.2MIC_Pre1wk	0	19	D.MIC_Pre2wk	100	30	B.2MIC_Pre2wk	0
9	O.MIC_Pre2wk	100	20	D.2MIC_Pre2wk	0	31	B.MIC_Post1wk	0
10	O.2MIC_Pre2wk	79.95	21	D.MIC_Post1wk	79.95	32	B.2MIC_Post1wk	0
11	O.MIC_Post1wk	20.77	22	D.2MIC_Post1wk	0			

N = Non infected *A. hydrophila* group * = only infected *A. hydrophila* but no treat

(O.2MIC_Post1wk) กลุ่มจุ่มสารสกัดหลังฉีดเชื้อ (D.MIC_Post1wk) และกลุ่มที่กินอาหารผสม 10% ก่อนฉีดเชื้อ 1 สัปดาห์ (O.2MIC_Pre1wk) ทั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ของความแตกต่างของค่าชีวเคมี (ค่าเอนไซม์ AST ALT และค่าน้ำตาลในเลือด) และโปรตีนในพลาสม่า ระหว่างกลุ่มการทดลอง โดยค่าที่ต่ำกว่าความสามารถของเครื่องตรวจวัดค่าทางเคมีของเลือด (Reflovet® Plus) คือ blood urea nitrogen (< 20.0 mg/dl) และ creatinine (< 0.5 mg/dl) (Figure 1 และ Table 2) จึงไม่สามารถรายงานผลของค่าดังกล่าวได้

4. เปรียบเทียบคุณภาพน้ำปกติที่เลี้ยงปลา และหลังจากให้สารสกัดใบฝรั่ง

หลังจากใส่สารสกัดลงในน้ำและให้ออกซิเจน จะเกิดฟองจำนวนมาก พบว่าค่าคุณภาพน้ำที่เปลี่ยนแปลง คือ ค่าความเป็นด่างลดลง พีเอชต่ำลง ซัลไฟด์สูงขึ้น ความกระด้างลดลง แอมโมเนียสูงขึ้น และค่าฟอตเฟตเพิ่มขึ้น (Table 3) ค่าที่ไม่มีความเปลี่ยนแปลง คือ อุณหภูมิ ค่าออกซิเจนละลายในน้ำ คลอรีน และไนไตรท์

สรุปและวิจารณ์

ปริมาณของสารสกัดใบฝรั่งที่ได้จากใบฝรั่งแห้งที่ป่นละเอียด เมื่อสกัดด้วยเอทานอลคิดเป็น 12.99% เมื่อเทียบกับน้ำหนักใบฝรั่งแห้งป่นตั้งต้น ซึ่งใกล้เคียงจากผลการศึกษาของ Olajide และคณะ (1999) ที่ได้สารสกัดจากการใช้เอทานอล คิดเป็น 13.2% แต่ต่างจากผลของ สกลกิจ (2545) ที่ได้เพียง 7.26% ใน 75% เอทานอล โดยสารที่สกัดได้ในรายงานของสกลกิจมีค่า MIC ของเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *P. multicida* เท่ากับ 156 ppm *E. coli* และ *S. typhimurium* เท่ากับ 5,000 ppm ตามลำดับ ซึ่งอาจเกิดจากคุณภาพของวัตถุดิบที่แตกต่างกัน และเทคนิคในขั้นตอนและเวลาในการสกัด ซึ่งทำให้สกัดสารออกมาได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้แตกต่างกัน (สุรีย์, 2529) และความแตกต่างของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

จากการทดสอบเบื้องต้นในการแช่ จุ่ม และกินสารสกัดใบฝรั่ง พบว่าปลาสามารถกินอาหารที่ผสมสารสกัดใบฝรั่งที่ 5% ที่ให้ปริมาณ 3% ของน้ำหนักตัว/วันได้หมด แต่กินอาหารที่ผสมสารสกัด 10% ลดลง คือเพียง 60-80% ของปริมาณอาหารที่ให้ทั้งหมด (1.8-2.4% ของน้ำหนักตัว/วัน) ซึ่งแสดงว่าการผสมสารสกัดใบฝรั่งที่ 10% ทำให้ความอยากอาหาร (palatability) ลดลง ส่วนการจุ่มที่ 1000 ppm เป็นเวลา 5 นาที พบว่าหลังจากใส่สารสกัดลงในน้ำและให้ออกซิเจน จะเกิดฟองจำนวนมาก เนื่องจากการใส่สารสกัดใบฝรั่งทำให้สภาพอินทรีย์สารที่สามารถละลายน้ำมากขึ้นและความกระด้างลดลงจึงทำให้เกิดฟองได้ง่าย (Huguenin and Colt, 1989) หลังจุ่มปลาประมาณ 3 นาที

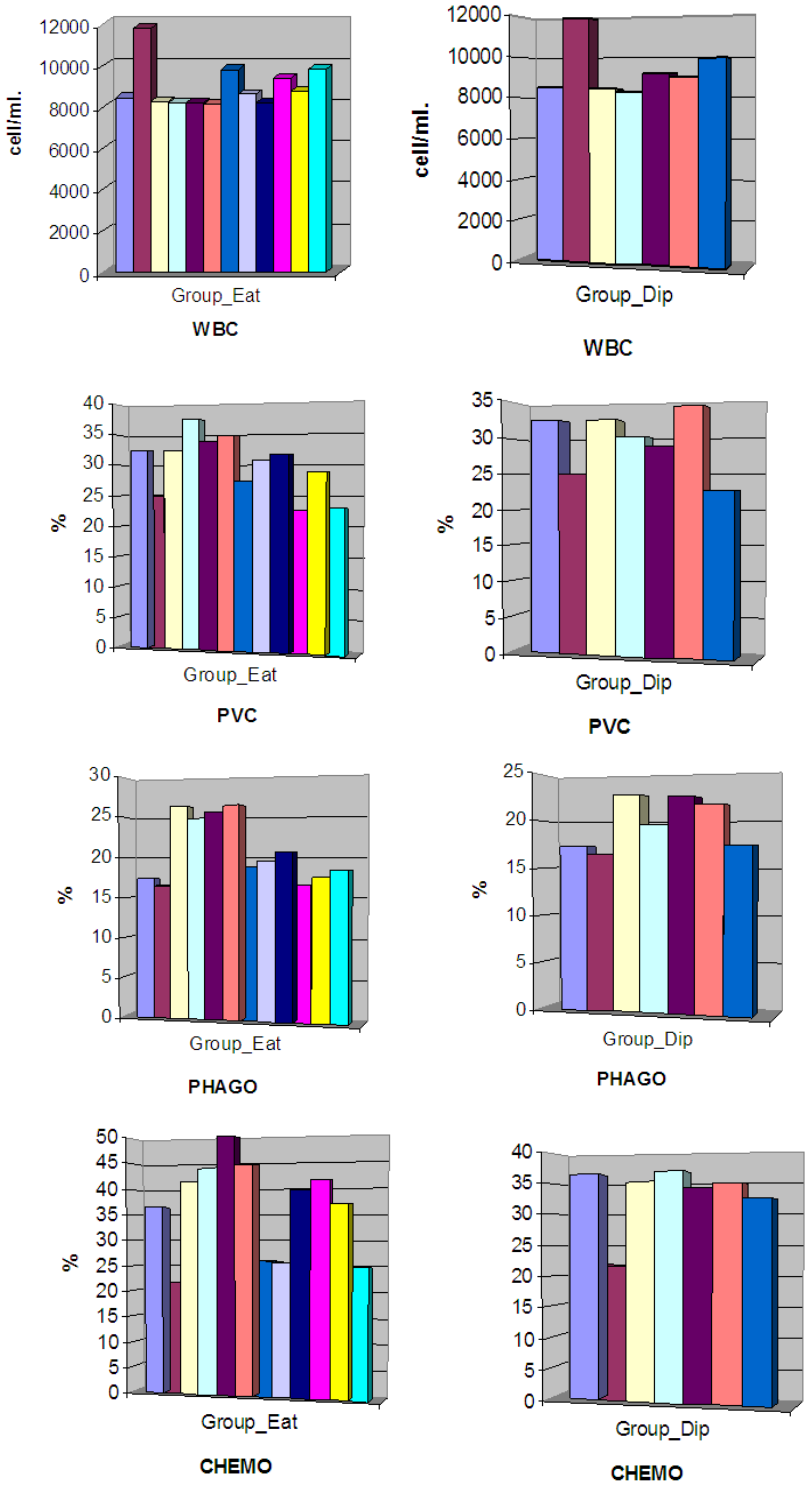

Figure 1. Means of hematology affected by oral and immersion route of extractions and control group

[Color figure can be viewed in the electronic version]

Table 2. Effect of dried guava leaves extract on blood hematology, %phagocytosis, %chemotaxis and blood biochemistry

Group	Code	WBC	PVC	RBC	PHAGO	CHEMO	AST	ALT	TP	GLU
1	Negative (Neg.C)	8480.00±43.59 [a]	32.33±3.22 [a]	1.32±0.05 [a]	17.33±0.15 [a]	36.43±3.86 [a]	174.33±9.71 [a]	93.83±5.26 [a]	4.60±0.87 [a]	224.33±29.02 [a]
2	Positive (Pos.C)	11843.33±568.89 [b]	25.00±5.00 [b]	0.7±0.15 [b]	16.47±0.06 [a]	21.73±4.96 [b]	573.33±47.26 [b]	143.50±17.80 [a]	5.03±0.55 [a]	54.00±4.00 [b]
3	O.MIC_1wk.	8330.00±130.00 [a]	32.33±1.53 [a]	1.61±0.02 [a]	26.30±0.10 [b]	41.27±3.25 [a]	171.33±12.10 [a]	13.43±3.10 [b]	4.47±0.99 [a]	56.30±3.12 [b]
4	O.2MIC_1wk.	8646.67±5.77 [a]	30.67±3.06 [a]	1.35±0.01 [a]	19.50±0.10 [b]	25.73±1.50 [b]	337.33±23.86 [a]	26.90±2.14 [b]	2.77±0.15 [a]	261.67±24.58 [a]
5	O.MIC_2wk.	8243.33±15.28 [a]	37.33±3.06 [a]	1.55±0.03 [a]	24.77±0.15 [b]	43.90±3.06 [a]	157.67±23.59 [a]	11.09±1.05 [b]	5.03±0.25 [a]	176.67±15.50 [a]
6	O.2MIC_2wk.	8250.00±10.00 [a]	31.67±1.53 [a]	1.42±0.02 [a]	20.70±0.10 [b]	39.63 ±0.71 [a]	350.00±26.46 [a]	18.83±0.70 [b]	4.53±0.31 [a]	81.37±2.81 [b]
7	O.MIC_Pre1wk.	8230.00±20.00 a	33.67±5.51 [a]	1.42±0.02 [a]	25.57±0.15 [b]	49.93±2.73 [a]	330.33±26.08 [a]	81.73±2.50 [a]	5.17±1.04	244.67±26.86 [a]
8	O.2MIC_Pre1wk.	9453.33±50.33 b	22.67±1.16 [b]	1.17±0.15 [a]	16.70±0.27 [a]	41.47±1.89 [a]	470.00±10.00 [b]	123.33±4.51 [a]	4.13±1.01 [a]	94.67±4.93 [a]
9	O.MIC_Pre2wk.	8140.00±10.00 a	34.67±5.03 [a]	1.52±0.02 [a]	26.33±0.21 [b]	44.60±4.09 [a]	175.67±8.02 [a]	52.43±3.16 [a]	5.60±0.53 [a]	42.83±15.81 [b]
10	O.2MIC_Pre2wk.	8830±157.16 a	28.67±1.16 [a]	1.24±0.03 [a]	17.63±0.25 [a]	36.97±2.83	573.67±24.38 [b]	42.63±1.26 [a]	4.47±0.31 [a]	79.97±4.68 [b]

Table 3. Average water quality of the control tank, 1,000 ppm and 2,000 dried guava leaves extract

parameter	control tank	1,000 ppm extraction	2,000 ppm extraction
Alkalinity (ppm)	100	80	70
pH	7.6	7.4	7.0
Sulfide (ppm)	0.025	0.025	0.05
Hardness (ppm)	800	600	300
Ammonia (ppm)	0.25	0.25	0.5
Phosphate (ppm)	0.73	1.34	2.75
Temperature (C ^{o})	27.5	27.5	27.5
D.O. (ppm)	5	5	5
Chlorine (ppm)	0	0	0
Nitrite (ppm)	0	0	0

สัปดาห์ (O.2MIC_Pre2wk) มีอัตราการตายลดลง น่าจะเป็นผลเนื่องจากปลามีการปรับสภาพให้คุ้นเคยกับอาหารผสมและกินอาหารมากขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว

การจุ่มสารสกัดที่ 1,000 ppm ที่ก่อนการฉีดเชื้อ 1 สัปดาห์ (D.MIC_Pre1wk) และหลังการฉีดเชื้อ 1 สัปดาห์ (D.MIC_Post1wk) มีอัตรารอดดีขึ้น และมีประสิทธิภาพดีกว่ากลุ่มที่กิน เนื่องจากหลังทำการฉีดเชื้อปลาทุกกลุ่มกินอาหารได้น้อยลง การจุ่มจึงเป็นวิธีที่ทำให้ปลาได้รับสารที่แน่นอนกว่าเมื่อเวลาปลาป่วย (Noga, 1996)

จากผลของการวัดการตอบสนองทางระบบคุ้มกันในปลาคาร์พ ซึ่งสามารถเป็นตัวบ่งบอกถึงความต้านทานในตัวสัตว์ โดยการตอบสนองทางระบบคุ้มกันในการต่อสู้กับเชื้อแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นในปลาที่มีภูมิต้านทานดี (Sahoo *et al.*, 2004) จะพบว่าทุกกลุ่มการทดลองที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่งมีค่าเปอร์เซ็นต์ของ phagocytosis สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารและไม่ฉีดเชื้อ (Neg.C) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ยกเว้นกลุ่มจุ่มหลังฉีดเชื้อ (D.MIC_Post1wk) กลุ่มที่กิน 10% ก่อนฉีดเชื้อ 1 สัปดาห์ (O.2MIC_Pre1wk) และ 2 สัปดาห์ (O.2MIC_Pre2wk) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบฝรั่งสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองโดยกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมได้มากขึ้น โดยการเพิ่มการทำงานของนิวโตรฟิลส์ และแมคโครฟาจ (Roed *et al.*, 2002)

ค่าเปอร์เซ็นต์ Chemotaxis ของกลุ่มที่กินสารสกัดโดยไม่ฉีดเชื้อ มีค่าสูงว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดและไม่ถูกฉีดเชื้อ (Neg.C) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และทุกกลุ่มการทดลองที่ได้รับสารสกัด โดยการกินและจุ่ม และถูกฉีดเชื้อ มีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดและถูกฉีดเชื้อ (Pos.C) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบฝรั่งมีผลต่อความสามารถในการเคลื่อนตัวของเม็ดเลือดขาวในการเข้าหา ยึดเกาะ และทำลายเชื้อโรคได้ดีขึ้น (Bradley *et al.*, 1994)

จากการวิเคราะห์ค่าทางเคมีและโลหิตวิทยาในแต่ละกลุ่มการทดลอง พบว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดและถูกฉีดเชื้อ (Pos.C) จะมีค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงกว่าทุกกลุ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ร่วมกับมีภาวะ Hemorrhagic anemia อย่างรุนแรง แต่ไม่พบความแตกต่างของของค่าโปรตีนในเลือดทั้งหมด ค่าเอนไซม์ AST ALT และค่าน้ำตาลในเลือด ระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลของการวัดการตอบสนองทางระบบคุ้มกัน คือ ปลาที่มีค่าการตอบสนองโดยกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูง หรือมีความต้านทานที่ดีกว่า จะมีเปอร์เซนต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น ค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงสูงและมีค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำกว่าปลาที่ติดเชื้อ หรือมีความต้านทานต่ำ (Thrall *et al.*, 2004)

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการให้สารสกัดใบฝรั่งสามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Non-specific immune) และลดอัตราการตายของปลาคาร์พที่ถูกฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคได้ ซึ่งผลในการป้องกันและลดความรุนแรงของโรคได้ดีในกลุ่มที่ได้รับสาร

สกัดก่อนการฉีดเชื้อมากกว่าการให้สารสกัดหลังจากที่ฉีดเชื้อแล้ว รวมทั้งให้ผลดีเพิ่มขึ้นเมื่อทำการเพิ่มระยะเวลาในการให้ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า สารสกัดใบฝรั่งมีแนวโน้มออกฤทธิ์เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เนื่องจากเป็นสารที่สามารถเพิ่มสมบัติในการต่อต้านและทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Rao *et al.*, 2006) และยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ อย่างไรก็ตาม การให้สารสกัดในความเข้มข้นที่สูงสามารถทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตัวปลาอันเกิดจากสารอื่นๆ ที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบที่นำมาใช้ อีกทั้งลดความอยากอาหารของปลา ดังในการทดลองนี้พบว่าสารสกัดที่ 5% หรือที่ 1,000 ppm ให้ผลในการศึกษาที่ดีกว่าการให้สารสกัดที่ 10% หรือที่ 2,000 ppm ดังนั้นการนำสารสกัดใบฝรั่งมาใช้ควรพิจารณาถึงความเหมาะสมของเวลาในการให้ ขนาด วิธีการให้ และชนิดของปลา เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการวิจัยเงินทุนคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2548 ที่สนับสนุนเงินทุนในการวิจัยในครั้งนี้ ขอบคุณ นักวิทยาศาสตร์ และนักวิจัย ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้การช่วยเหลืออย่างดีในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

สกลกิจ พันธะวงศ์. 2545. ผลของสารสกัดจากผรั่ง (*Psidium guajava* Linn.) ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดที่ก่อโรคในสุกร (ปัญหาพิเศษ). คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุรีย์ ประเสริฐสุข. 2529. ผลของสมุนไพรบางชนิดที่มีต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคบิด (วิทยานิพนธ์). คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 54-57.

นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. 2542. สมุนไพร.ไม้พื้นบ้าน (3). กรุงเทพฯ: ประชาชน, 143.

Akihisa, M., Chikao, N., Nobuyasu, E. and Shinkichi, T. 1987. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus valgaris* and *Staphylococcus aureus*. Phytochemistry 26, 2331-2234.

Baulay, M.O.D., Quentel, C., Fournier, V., Lamour, F. and Gouvello, R.L. 1996. Effect of long-term oral administration of β glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. Dis Aquat Org 26, 139-147.

Bhutani, S.P., Chibber, S.S. and Seshadri, T.R. 1969. Components of the roots of *Pueraria tuberose*: Isolation of a new isoflavone C-glycoside (di-0-acetylpuerarin). Ind. J. Chem. 7, 210-215.

Boyd, C.E. 1990. Water Quality in ponds for Aquaculture. Shrimp Mart (Thai) Co. Ltd. Songkhla. Thailand.

Bradley, E.B., Jonathan, S., Serody, D. and Myron, S.S. 1994. The role of as antiinflamatory molecule, Structure and function 5, 143-151.

Christofilogiannis, P. 2001. Current inoculation methods in MIC determination. Aquaculture 196, 297-302.

Day, A.J., Bao, Y., Morgan, M.R.A. and Williamson, G. 2000. Free Rad. Bio. & Med. 29, 1234.

Goncalves, J.L.S., Lopes, R.C., Oliveira, D.B., Costa, S.S., Miranda, M.M.F.S., Romanos, M.T.V., Santos, N.S.O. and Wigg, M.D. 2005. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. J. Ethnopharmacology 99, 403-407.

Hazen, T.C., Flierman, C.B., Hirsch, R.P. and Esch, G.W. 1978. Prevalence and distributuion of *Aeromonas hydrophila* in the United States. App. Env. Microbiol. 36, 731-738

Hrubec T.C. and Smith S.A. 1999. Differences between plasma and serum sample for the evaluation of blood chemistry values in rainbow trout, channel catfish, hybrid tilapias and hybrid striped bass. J. Aquat. Anim. Health.11, 116-122.

Hon-Ning, L. 1988. Chinese Medicinal Herbs of Hong Kong. Vol.2. Hang Chiewing Sa Kwang, Hong Kong, 104-105.

Huguenin, J.E. and Colt, J. 1989. Water Recycling. Design and Operating Guide for aquaculture seawater system. 167-173.

Iwu, M.M. 1993. Handbook of African Medicinal Plants. CRC Press, 42-44.

Jacobasch, G., Riethling, A.K., Veit, M., Wittig, J., Mueller, S., Pforte, H., Derendort, H., Uehleke, B. and Drewelow, B. 2001. Pharmacokinetic and bioavalibility of querectin glycosides in humans. J. Clin. Pharm. 41, 492-499.

Laird, L. and Needham, T. 1988. Salmon and Trout Farming. Harwood. New York. p.24.

Lans, C., Herper, T., Georges, K. and Bridgewater, E. 2000. Medicinal plants used for dog in Trinidad and Tobago. Prevent. Vet. Med. 45, 201-220.

Larsen, H.N. and Snieszko, S.F. 1971. Modification of the microhematocrit technique with trout blood. Trans. Am. Fish. Soc. 90, 139-142

Lewis, W.H. and Elwin-Lewis, M.P.F. 1977. Medical Botany: Plants Affecting Manís Health. John Wiley and Sons, New York, p. 254.

Lin, J., Puckree, T. and Mvelase, T.P. 2002. Anti-diarrhoeal evaluation of some medicinal plants used by Zulu traditional healers. J. Ethno-pharmacology 79, 53-56.

Lozoya X., Meckes M., Abou-Zaid M., Tortoriello J. Nozzolillo C. and Arnason J.T. 1994. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. Arch. Med. Research 25(1), 11-15.

Lozoya, X., Reyes-Morales, H., Chavez-soto, M.A., Martinez-Garcia, M.C., Soto-Gonzalez, Y. and Doubova, S.V. 2002. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava folia* in the treatment of acute diarrheic disease. J. Ethnopharmacology 83, 19-24.

Lutterodt, G.D. 1989. Inhibition of gastrointestinal release of acetylcholine by quercetin as a possible mode of *Psidium guajava* leaf eaxtracts in the treatment of acute diarrheal disease. J. Ethnopharmacology 24, 234-247.

Manosroi, J., Dhumtanom, P. and Manosroi, A. 2005. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P338 cell lines. Cancer Letters, 1-7.

Maruyama, Y., Matsuda, H., Matsuda, R., Kubo, M., Hatano, T. and Okauda, T. 1985. Study on *Psidium Guajava* L. (I). Anti-Diabetic effect and effective components of the leaf of *Psidium Guajava* L. (Part I). Shoy-akugaku Zasshi 39, 261-269.

Mathews, E.S., Warinner, J.E. and Weeks, B.A. 1990. Assays of immune function in fish macrophages. Techniques in fish immunology. Fair Haven: Sos. 155-163.

Meckes, M., Calzada, F., Tortoriello, J., Gonzales, J.L. and Martinez, M. 1996. Terpenoids isolated from *Psidium guajava* hexane extract with depressant activity on central nervous system. Phytotherapy Research 10, 600-603.

Morton, J.F. 1980. Atlas of Medicinal Plants of Middle America (Bahama to Yucatan), Charles, C. Thomas, Springfield, Illinois, pp. 623-631.

Noga, E.J. 1996. Method for Treatment Fish Disease. Fish disease; Diagnosis and treatment. Mosby, St. Louis. 253-270.

Oh, W.K., Lee, C.H., Lee, M.S., Bae, E.Y., Sohn, C.B., Oh, H., Kim, B.Y. and Ahn, J.S. 2005. Anti-diabetic effects of extracts from *Psidium guajava*. J. Ethnopharmacology 96, 411-415.

Olajide, O.A., Awe, S.O. and Makinde, J.M. 1999. Pharmacological studies on the leaf of *Psidium guajava*. Fitoterapia 70, 25-31.

Oliver-Bever, B. 1986. Medicinal Plants in tropical West Africa. Cambridge University Press, Cambridge.

Otte, E. 1963. Die heutigen Ansichten uber die Atiologie der Infektiosen Bauchwassersucht der Karpfen. Cited by Post G.W. Textbook of Fish Health. T.F.H. Bublications Inc., Nepture City, New Jersey, 256.

Rao, Y.V., Das, B.K., Jyotyrmayee, P. and Chakrabarti, R. 2006. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology 20, 263-273.

Rabe, T. and Staden, J.V. 1997. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. J. Ethnopharmacology 56, 81-87.

Reed, L.J. and Muench, H. 1983. A simple method od estimating fifty percent endpoints. Am. J. hyg. 27: 493-497.

Roed, K.H., Fevolden, S.E. and Fjalestad, K.T. 2002. Disease resistance and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for lysozyme activity. Aquaculture 209, 91-101.

Sahoo, P.K., Meher, P.K., Kanta, D.M., Saha, J.N., Jana, R.K. and Reddy, V.G.K. 2004. Immune responses in different fullsib families of Indian major carp, *Labeo rohita*, exhibiting differential resistance to *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture 238, 115-125.

Shaheen, H.M., Ali, B.H., Alqarawi, A.A. and Bashir, A.K. 2000. Effect of *Psidium guajava* leaves on some aspects of the central nervous system in mice. Phytotherapy Research 14(2), 107-111.

Thrall, M.A., Balcer, D.C., Campbell, T.W., Denicola, D., Fettman, M.J., Lassen, E.D., Rebar, A. and Weiser, G. 2004. Clinical Chemistry of Fish and Amphibians. Veterinary Hemotology and Clinical chemistry. USA. 499-503.

Tona, L., Kambu, K., Ngimbi, N., Cimange, K. and Vlietinck, A.J. 1998. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. J. Ethnopharmacology 61, 57-65.

Treves-Brown, K.M. 2000. Applied fish Pharmacology. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 309 page.

Undeger, U., Aydin, S., Basaran, A. and Basaran, N. 2004. The modulating effect of quercetin and rutin on the mitomycin C induced DNA damage. Toxiology Letters 151, 143-149.

Voravuthikunchai, S., Lortheeranuwat, A., JeeJu, W., Sririrak, T., Phongpaichit, S. and Supawita, T. 2004. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichua coli* O157:H7. J. Ethnopharmacology 94, 49-54.

Weeks-Perkins, B.A., Chansue, N. and Wong-Verelle, D. 1995. Assays of Immune Function in Shrimp Phagocytes: Techniques Used As Indicators of Pesticide Exposure.Techniques in Fish Immunology. Fish Immnunology Technical Communication 4. (J.S. Stolen, T.C. Fletcher, S.A. Smith, J.T. Zelikoff, S.L. Kaattari, R.S. Anderson, K. Soderhall, and B.A. Weeks-Perkin, editors). SOS Publications, Fair Haven, USA, 223-232.