รายงานการวิจัย

การพัฒนาสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันเพื่อเป็นสารเสริมสุขภาพปลานิล

Development of Curcumin Premix for the Use to Promote Health in Farmed Tilapia

โดย

รศ.สพ.ญ.ดร. เจนนุช ว่องธวัชชัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ.ภก.ดร. พรชัย โรจนสิทธิศักดิ์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สพ.ญ. มินตรา ลักขณา สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

กิตติกรรมประกาศ

โครงการ “การพัฒนาสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันเพื่อเป็นสารเสริมสุขภาพปลานิล” ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย จากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2552

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สพ.ญ.หทัยรัตน์ ไม้สัก ภก. ณัฐพล จงอรุณงามแสง และป.เจริญฟาร์ม สำหรับสถานที่ทำการศึกษาและคำแนะนำต่างๆ ซึ่งทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญเรื่อง
การพัฒนาสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันเพื่อเป็นสารเสริมสุขภาพปลานิล

หน้า

บทคัดย่อ i

Abstract ii

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 การทดสอบความไวรับของเชื้อแอโรโมนาสที่แยกจากปลานิลป่วยต่อขมิ้นชัน 5

- การแยกเชื้อแอโรโมนาสจากปลานิลป่วย........ 5
- การทดสอบความไวรับของเชื้อแอโรโมนาสต่อขมิ้นชัน........ 11
- ผลการศึกษา........ 13

บทที่ 3 พัฒนาสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันสำหรับผสมอาหารเลี้ยงปลานิล 16

- การทดสอบการละลายของขมิ้นชัน........ 16
- การเตรียมสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันสำหรับผสมอาหาร........ 16
- ผลการศึกษา........ 18

บทที่ 4 พัฒนาวิธีการควบคุมคุณภาพของสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชัน 22

- การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชัน........ 22
- การศึกษาความคงตัวของสารสกัดขมิ้นชันที่ผสมในอาหาร........ 23
- ผลการศึกษา........ 23

บทที่ 5 ประเมินสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันที่เหมาะสมสำหรับการใช้ผสมอาหารปลานิล 27

- การทดสอบประสิทธิผลของพรีมิกซ์ขมิ้นชันผสมอาหารสำหรับปลานิล........ 27
- ผลการศึกษา........ 30

อภิปรายผลและวิจารณ์ 37

สรุปและเสนอแนะ........ 40

บรรณานุกรม 41

ภาคผนวก 45

สารบัญตาราง
การพัฒนาสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันเพื่อเป็นสารเสริมสุขภาพปลานิล

หน้า

บทที่ 2 การทดสอบความไวรับของเชื้อแอโรโมนาสที่แยกจากปลานิลป่วยต่อขมิ้นชัน

ตารางที่ 2.1 การจำแนกชนิดของเชื้อแอโรโมนาสตามคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี........... 7

ตารางที่ 2.2 Minimum Inhibitory Concentrations ของขมิ้นชันที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแอโรโมนาสที่แยกจากปลานิลป่วย.. 14

ตารางที่ 2.3 ค่า MIC$_{50}$, MIC$_{90}$ และ Average MIC ของขมิ้นชันที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแอโรโมนาส 15

บทที่ 3 พัฒนาสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันสำหรับผสมอาหารเลี้ยงปลานิล

ตารางที่ 3.1 สูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันสำหรับผสมอาหาร.. 17

ตารางที่ 3.2 การทดสอบตัวทำละลายขมิ้นชัน 19

บทที่ 4 พัฒนาวิธีการควบคุมคุณภาพของสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชัน

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันในเม็ดอาหาร... 25

บทที่ 5 ประเมินสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันที่เหมาะสมสำหรับการใช้ผสมอาหารปลานิล

ตารางที่ 5.1 อัตรารอดและอัตราตายของปลานิลทดลอง.. 31

ตารางที่ 5.2 การเจริญเติบโตของปลานิลทดลอง.. 32

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 Certificate of analysis: curcuminoids………………………………………… 46

ภาคผนวกที่ 2 การเจือจางขมิ้นชันสำหรับ Antimicrobial Agar Dilution Susceptibility Test........ 47

ภาคผนวกที่ 3 ปริมาณอาหารที่ให้ต่อวัน (kg) ในแต่ละกลุ่มทดลอง.. 48

ภาคผนวกที่ 4 ลักษณะทั่วไปของลูกปลาเมื่อทดลองให้อาหาร.. 49

ภาคผนวกที่ 5 ข้อมูลการเจริญเติบโตของปลานิล อาหารและอัตรารอด..................................... 50

ภาคผนวกที่ 6 คุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง.. 51

ภาคผนวกที่ 7 การวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี Oneway ANOVA โดยเปรียบเทียบน้ำหนักปลานิลเมื่อเริ่มการทดลองของกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 1 และกลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 2... 52

ภาคผนวกที่ 8 การวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี Oneway ANOVA โดยเปรียบเทียบน้ำหนักปลานิลเมื่อสิ้นสุดการทดลองของกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 1 และกลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 2... 53

ภาคผนวกที่ 9 การวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี Oneway ANOVA โดยเปรียบเทียบน้ำหนักปลานิลที่เพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลองของกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 1 และกลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 2…………………… 54

สารบัญตาราง
การพัฒนาสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันเพื่อเป็นสารเสริมสุขภาพปลานิล (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวกที่ 10 การวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี Oneway ANOVA โดยเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average Daily Gain, ADG) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ของกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 1 และกลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 2 55

ภาคผนวกที่ 11 การวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี Oneway ANOVA โดยเปรียบเทียบอัตราแลกเนื้อ (Feed Conversion Ration, FCR) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ของกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 1 และกลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 2........ 56

ภาคผนวกที่ 12 การวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี Oneway ANOVA โดยเปรียบเทียบร้อยละของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (%weight gain) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ของกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 1 และกลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 2... 57

ภาคผนวกที่ 13 การวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี Oneway ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าประสิทธิภาพของอาหาร (Feed efficiency) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ของกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 1 และกลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 2 …… 58

สารบัญภาพ
การพัฒนาสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันเพื่อเป็นสารเสริมสุขภาพปลานิล

หน้า

บทที่ 1 บทนำ

ภาพที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin.......... 3

บทที่ 2 การทดสอบความไวรับของเชื้อแอโรโมนาสที่แยกจากปลานิลป่วยต่อขมิ้นชัน

ภาพที่ 2.1 การเลือกใช้ชุดทดสอบ API (BioMerieux®) สำหรับจำแนกเชื้อแอโรโมนาส………….. 9

ภาพที่ 2.2 เขตการเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยและเขตการเก็บตัวอย่างปลานิลป่วยที่นำมาแยกเชื้อแอโรโมนาส เพื่อทำการศึกษาความไวรับของเชื้อต่อขมิ้นชัน.............................. 10

ภาพที่ 2.3 การกระจายของค่า MIC ของขมิ้นชัน ทดสอบกับเชื้อแอโรโมนาส จำนวน 43 isolates.......... 15

บทที่ 3 พัฒนาสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันสำหรับผสมอาหารเลี้ยงปลานิล

ภาพที่ 3.1 ลักษณะของบรรจุภัณฑ์ของสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ทดสอบ.. 21

ภาพที่ 3.2 ลักษณะของสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ทดสอบ... 21

ภาพที่ 3.3 ลักษณะการละลายของสารสกัดขมิ้นชันใน DMSO 95% เอทานอล และ 0.1M NaOH… 21

บทที่ 4 พัฒนาวิธีการควบคุมคุณภาพของสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชัน

ภาพที่ 4.1 HPLC chromatograms ของสารละลายมาตรฐานและสารสกัดขมิ้นชัน.................. 24

ภาพที่ 4.2 สารสกัดขมิ้นชันที่คงเหลือในเม็ดอาหารหลังจากเม็ดอาหารสัมผัสน้ำ..................... 26

บทที่ 5 ประเมินสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันที่เหมาะสมสำหรับการใช้ผสมอาหารปลานิล

ภาพที่ 5.1 อาหารที่ใช้ในการทดลอง.. 29

ภาพที่ 5.2 แผนภูมิแสดงน้ำหนักปลานิลเมื่อเริ่มการทดลองและสิ้นสุดการทดลอง (14 วัน)......... 33

ภาพที่ 5.3 บ่อดินที่ใช้ในการทดลองเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารสูตรต่างๆ...................................... 35

ภาพที่ 5.4 ลูกปลานิลแปลงเพศอายุ 23 วัน น้ำหนักประมาณ 0.08 – 0.1 กรัมต่อตัว................. 35

ภาพที่ 5.5 การคัดขนาดปลานิล ใช้ถังตักลูกปลาในบ่อที่มีขนาดคละกันใส่ลงในตะแกรงร่อนปลา 35

ภาพที่ 5.6 การคัดขนาดปลานิล ลูกปลาตัวเล็กจะว่ายออกจากตะแกรงร่อน.............................. 35

ภาพที่ 5.7 การคัดขนาดปลานิล ได้ลูกปลาตัวใหญ่กว่าขนาดตะแกรงร่อน................................ 35

ภาพที่ 5.8 ตะแกรงร่อนปลา.. 35

ภาพที่ 5.9 ลูกปลานิลป่วยแสดงลักษณะอาการภายนอก ได้แก่ ปาก ครีบและหางเปื่อย กร่อน ขาว 36

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย
การพัฒนาสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันเพื่อเป็นสารเสริมสุขภาพปลานิล

คำอธิบาย	สัญลักษณ์/คำย่อ
กรัม (gram)	g
มิลลิกรัม (milligram)	mg
กิโลกรัม (kilogram)	kg
มิลลิลิตร (milliliter)	ml
ไมโครลิตร (microliter)	µl
ไมโครเมตร (micrometer)	µm
นาโนเมตร (nanometer)	nm
นาที (minute)	min
องศาเซลเซียส (degree Celsius)	^{o}C
โมลาร์ (molar)	M
มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (milligram per milliliter)	mg/ml
ไมโครกรัม /มิลลิลิตร (microgram per milliliter)	µg/ml
ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ	DO
ความเป็นกรดด่าง	pH
อุณหภูมิ	Temp
แอมโมเนีย	NH_3
มีความไวรับ (susceptible)	S
มีความต้านทาน (resistant)	R
part per million	ppm
American Type Cultured Collection	ATCC
Clinical Laboratory Standard Institute	CLSI
Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives	JECFA
World Health Organization	WHO
Tryptic Soy Agar	TSA
Mueller-Hinton Agar	MHA
Sodium Chloride	NaCl
sodium hydroxide	NaOH
Minimum Inhibitory Concentration	MIC
Minimum Inhibitory 50%	MIC_{50}
Minimum Inhibitory 90%	MIC_{90}
no data	nd
Colony Forming Unit	CFU

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย การพัฒนาสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันเพื่อเป็นสารเสริมสุขภาพปลานิล (ต่อ)

คำอธิบาย	สัญลักษณ์/คำย่อ
O-nitro-beta-D-galactopyranoside hydrolysis by beta-galactisidase	ONPG
Dimethylsulfoxide	DMSO
weight in weight	w/w
volume in volume	v/v
High performance liquid chromatography	HPLC
Average Daily Gain	ADG
Feed Conversion Ratio	FCR

การพัฒนาสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันเพื่อเป็นสารเสริมสุขภาพปลานิล

บทคัดย่อ

สารสกัดจากขมิ้นชัน *Curcuma longa* L. (curcuminoids) มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านจุลชีพ เป็นต้น การศึกษานี้เป็นการพัฒนาสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันเพื่อเป็นสารเสริมสุขภาพปลานิล (*Oreochromis nilotica*) เนื่องจากปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน สารสกัดขมิ้นชันสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแอโรโมนาส (*Aeromonas hydrophila*) จากการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดขมิ้นชัน (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแอโรโมนาส จำนวน 43 isolates ที่แยกจากปลานิลป่วย ความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ คือ <50 – 800 ppm โดยแสดงค่า MIC_{50} เท่ากับ 500 ppm และค่า MIC_{90} เท่ากับ 800 ppm จากประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในห้องปฏิบัติการแสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแอโรโมนาสที่แยกได้จากปลานิลป่วย จึงพัฒนาสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันขนาด 500 ppm และ 1,000 ppm เพื่อเลี้ยงปลานิล การวิเคราะห์ปริมาณของสารสกัดขมิ้นชันและสารสำคัญ ได้แก่ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin ในสารสกัดขมิ้นชันที่เตรียมเป็นสูตรพรีมิกซ์ ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่ามีปริมาณ curcuminoids รวม 99.42% และสารสำคัญเท่ากับ 72.29%, 23.50% และ 3.63% ตามลำดับ นอกจากนี้การทดสอบความคงตัวของพรีมิกซ์ขมิ้นชันที่ผสมอาหารด้วยวิธี HPLC พบปริมาณของสารสกัดขมิ้นชันในเม็ดอาหารหลังจากที่เม็ดอาหารปลาสัมผัสกับน้ำเป็นเวลา 60 นาทีลดลงเหลือ 60% การทดสอบประสิทธิภาพของพรีมิกซ์ขมิ้นชันผสมอาหารเพื่อเป็นสารเสริมสุขภาพปลานิล ทำการทดลองในลูกปลานิลน้ำหนักประมาณ 0.08 – 0.1g ได้รับอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันขนาด 500 ppm หรือ 1,000 ppm ต่อปริมาณอาหาร เป็นเวลา 14 วัน กลุ่มที่ได้รับอาหารผสมขมิ้นชันขนาด 500 ppm หรือ 1,000 ppm มีอัตราการแลกเนื้อ (Feed Conversion Ratio) และประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed Efficiency) สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้พบว่าลูกปลานิลที่ได้รับอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น อัตรารอดและอัตราการเจริญเติบโตต่อวันโดยเฉลี่ยดีกว่ากลุ่มควบคุม ผลการศึกษาแสดงว่าพรีมิกซ์ขมิ้นชันมีประสิทธิภาพเป็นสารเสริมสุขภาพปลานิล อย่างไรก็ตามการพัฒนาสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันสำหรับโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ขนาดใหญ่ควรมีการประเมินด้านความคงตัวของพรีมิกซ์ขมิ้นชันในอาหารและความเหมาะสมทางด้านเศรษฐกิจ

Development of Curcumin Premix for the Use to Promote Health in Farmed Tilapia

Abstract

The extract of turmeric (*Curcuma longa* L.), curcumin, has been shown to have a broad spectrum of biological actions such as anti-inflammatory, antioxidant and antibacterial. Tilapias (*Oreochromis nilotica*) are the fresh water fish that have increasing economic values. This project was aimed to develop the curcumin premix for the use to promote health in farmed tilapia. The *in vitro* Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of curcumin determined against 43 strains of pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased Tilapia indicated the MIC range <50 – 800 ppm, MIC_{50} 500 ppm and MIC_{90} 800 ppm. Following the laboratory inhibitory activities of curcumin against the tilapia pathogen, *A. hydrophila*, the field application of curcumin premix was experimented on 500 ppm and 1,000 ppm concentration in feed. Turmeric powder, the active ingredient of premix, was analyzed for total curcuminoid content, including curcumin, bisdemethoxycurcumin, and demethoxycurcumin using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). A total percentage of curcuminoid in turmeric powder was 99.42%; while each component was 72.29% for curcumin, 23.50% for demethoxycurcumin, and 3.63% for bisdemethoxycurcumin. The amount of curcumin in diet was assessed using HPLC to determine the leaching effect when the mixed pellet was immersed in water. The HPLC chromatogram revealed that the amount of curcumin in pellet decreased to 60% following a 60 min immersion. The health promoting effect of curcumin was evaluated in tilapia fingerings (0.08 – 0.1 g body weight). Fish were fed basal diet (control), basal diet supplemented with curcumin 500 ppm or 1,000 ppm daily for 14 consecutive days. Fish fed with curcumin-supplemented diet significantly improved their Feed Conversion Ratio and Feed Efficiency ($P<0.05$). In addition, the groups receiving supplemented feed generally showed better weight gain, survival rates, and Average Daily Gain. Based on the statistical and clinical observations of this study, supplementation of curcumin premix in tilapia feed is a possible management to enhance the fish health. However, for the industrialized a large-scale fish feed manufacturer the stability and cost effectiveness of the curcumin premix should be further assessed.

บทที่ 1

บทนำ

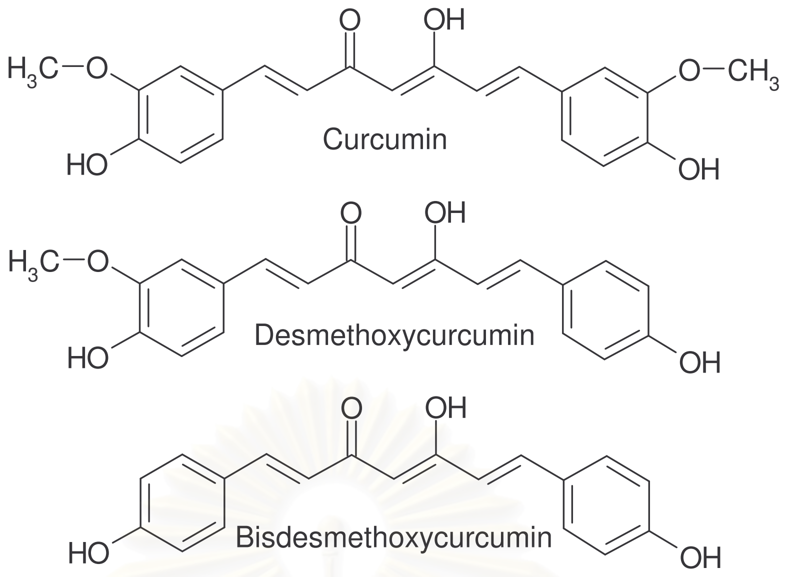
ปลานิล *Oreochromis nilotica* เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งอยู่ในตระกูล Cichlidae มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกา พบทั่วไปตามหนอง บึง และทะเลสาบในประเทศซูดาน ยูกันดา แทนแกนยีกา (ยุพินท์ และพันธ์ศักดิ์, 2547) ปลานิลเป็นที่นิยมเพาะเลี้ยงทั่วไปทั้งในภาคพื้นเอเชียและประเทศสหรัฐอเมริกาเนื่องจากเจริญเติบโตเร็ว เลี้ยงง่าย เหมาะสมที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในบ่อได้เป็นอย่างดี และเนื้อปลานิลเป็นที่นิยมบริโภค ผลผลิตปลานิลทั่วโลกมีมากเป็นอันดับ 9 ของผลผลิตสัตว์น้ำทั่วโลกที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยง และมีมากกว่าปลาแซลมอน กุ้งทะเล และหอยแมลงภู่ ปี ค.ศ. 2005 มีผลผลิตปลานิลทั่วโลกประมาณ 2.2 ล้านตัน ซึ่งผลผลิตส่วนใหญ่มาจากการเพาะเลี้ยง โดยในทวีปเอเชียประเทศจีนมีผลผลิตปลานิลสูงสุด รองลงมาได้แก่ อินโดนีเซีย ไทย ฟิลิปปินส์ และไต้หวัน (World aquaculture, 2004) สำหรับประเทศไทย ปลานิลจัดว่าเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจเพราะสามารถเลี้ยงได้ทุกสภาพในภูมิภาคต่างๆ ของไทย และเป็นปลาที่ประชาชนนิยมเลี้ยงกันมาก ทั้งในรูปแบบอุตสาหกรรมการค้าและการเลี้ยงเพื่อบริโภคในครัวเรือน (ฝ่ายเผยแพร่กองส่งเสริมการประมง, 2544) ประเทศไทยสามารถผลิตปลานิลได้ปริมาณ 100,000 ตันต่อปี พบว่าปริมาณการผลิตเพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศและสามารถเพิ่มศักยภาพในการผลิตเพื่อตลาดส่งออก ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และทวีปยุโรป (กรมสินค้าส่งออก, 2548) โดยประเทศไทยจัดอยู่ในลำดับ 5 หรือ 6 ของโลกในการผลิตปลานิลสูงสุด (World aquaculture, 2004) มูลค่าการส่งออกปลานิลปัจจุบันประมาณ 600 ล้านบาท ซึ่งจัดว่าเป็นผลผลิตที่มีมูลค่าสูงสุดของสัตว์น้ำจืด

การพัฒนาระบบการเลี้ยงปลานิลให้เป็นระบบอุตสาหกรรม ผู้เลี้ยงส่วนใหญ่จึงเร่งเพิ่มกำลังการผลิตโดยการปล่อยปลาในอัตราที่หนาแน่นมากขึ้นเป็นเหตุให้สิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงมีสภาวะไม่เหมาะสม ประกอบกับการจัดการภายในฟาร์มและระบบป้องกันโรคทำได้ยากขึ้นจึงนำไปสู่ความเสี่ยงต่อการเกิดโรค เชื้อแบคทีเรียแอโรโมนาส เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่สำคัญที่สุดเชื้อหนึ่งที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิล เชื้อแอโรโมนาสสามารถพบได้ทั่วไปในพื้นดินและในน้ำ มีขนาดประมาณ 0.4 - 1.0 µm สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้ monotrichous flagellum เมื่อนำไปเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) โคโลนีมีลักษณะกลมขอบเรียบ โคโลนีมีสีขาวจนถึงสีครีม เป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ catalase และเอนไซม์ oxidase เชื้อแอโรโมนาสสามารถก่อโรคต่างๆ ในปลานิล เช่น motile aeromonas septicemia, bacteria haemorrhagic septicemia, redsore disease, tail rot และ fin rot ปลาที่ติดเชื้อแอโรโมนาสแสดงอาการเสียการทรงตัว ว่ายน้ำช้าลง

อ้าปากหายใจบริเวณผิวน้ำ ครีบเปื่อย มีการตกเลือดตามตัว เกล็ดหลุด มีแผลหลุมตามตัว ท้องบวม มีน้ำคั่งในช่องท้อง ลำไส้อักเสบและบาง ตับมีจุดเลือดออก (Farmer III *et al.*, 2006)

การใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อควบคุมโรคติดเชื้อ เป็นวิธีที่ปฏิบัติในฟาร์มเลี้ยงปลา ยาต้านจุลชีพที่ใช้ในสัตว์น้ำส่วนใหญ่มักผสมกับอาหารซึ่งอาจมีการปนเปื้อนสิ่งแวดล้อมจากการละลายของยา นอกจากนี้การใช้ยาต้านจุลชีพในบ่อเลี้ยงปลาอาจทำให้เกิดการตกค้างของยาต้านจุลชีพในเนื้อปลา หรือผลกระทบอื่น ๆ ต่อสุขภาพของผู้บริโภค (Angulo, 1999; WHO Technical Report Series, 1999) จากข้อจำกัดในการใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อป้องกันหรือควบคุมโรคติดเชื้อในอุตสาหกรรมการผลิตปลานิลของประเทศไทย ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการพัฒนาเศรษฐกิจการส่งออกเนื้อปลานิลและยังเป็นอุปสรรคต่อการพัฒนาทางสังคมของไทยอีกด้วยเนื่องจากการเลี้ยงปลาเป็นอาชีพที่สามารถทำได้ในทุกภูมิภาคของประเทศไทยที่มีแหล่งน้ำจืดหรือแหล่งน้ำกร่อยและปลานิลเป็นอาหารโปรตีนที่สามารถได้ผลผลิตรวดเร็วและเพียงพอต่อการบริโภคภายในประเทศ จึงนับว่าอุตสาหกรรมการผลิตปลานิลสามารถจุนเจือเศรษฐกิจและสังคมของประเทศไทย ดังนั้นการศึกษาวิจัยชนิดของสารเสริมสุขภาพเพื่อทำให้ปลาแข็งแรง มีความต้านทานต่อโรค เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถทดแทนการใช้ยาต้านจุลชีพ **ขมิ้นชัน**เป็นสมุนไพรที่ทางวิทยาศาสตร์ยอมรับว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านจุลชีพและสารเสริมสุขภาพ โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีความปลอดภัยต่อการบริโภค ดังนั้นการศึกษานี้จึงนำคุณสมบัติของขมิ้นชันมาประยุกต์เป็นพรีมิกซ์ผสมอาหารปลานิลเพื่อเสริมสุขภาพปลานิล ป้องกันการติดโรคและทดแทนการใช้ยาต้านจุลชีพในบ่อเลี้ยง

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) เป็นพืชล้มลุกมีเหง้าอยู่ใต้ดิน เนื้อในของเหง้าขมิ้นชันมีสีเหลืองเข้มจนสีแสดจัด มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ใบรูปเรียวยาว ปลายแหลมคล้ายใบพุทธรักษา ดอกออกเป็นช่อ มีก้านช่อแทงจากเหง้าโดยตรง ออกตรงกลางระหว่างใบคู่ในสุด ดอกสีขาว มีแถบสีเหลืองคาด มีกลีบประดับสีขาวหรือเขียว สำหรับส่วนหัวและเหง้า (rhizome) ถูกนำมาใช้เป็นประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ใช้เป็นสารแต่งสีเหลือง เป็นเครื่องเทศ ปรุงแต่งกลิ่นและรสในอาหาร และนิยมใช้ในเครื่องสำอาง สบู่ ครีมนวดผิว แชมพูสระผม และโลชั่นต่างๆ ส่วนเหง้าทั้งแบบสดและแห้งสามารถนำมาทำเป็นยา โดยเหง้าของขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ลดการอักเสบ และมีฤทธิ์ในการขับน้ำดี น้ำมันหอมระเหยในขมิ้นชันมีสรรพคุณบรรเทาอาการปวดท้อง ท้องอืด แน่นจุกเสียด (องค์การเภสัชกรรม, 2548) สารสำคัญที่พบในเหง้าของขมิ้นชันประกอบด้วยสารหลัก 2 ประเภท คือ 1) น้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีสารประกอบหลัก ได้แก่ aromatic turmerone, α-turmerone และ β-turmerone และ 2) curcuminoids ซึ่งเป็นสารสีส้ม ประกอบด้วย curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin (Jayaprakasha *et al.*, 2002) (ภาพที่ 1.1)



ภาพที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin

curcuminoids มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial) (Mishra *et al*., 2005) ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) (Bonte *et al*., 1997; Das and Das, 2002; Grinberg *et al*., 1996) ต้านอักเสบ (anti-inflammatory) (Ammon and Wahl, 1991; Brouet and Oshima, 1995; Joe and Lokesh, 1997; Rajakrishnan *et al*., 2000) ต้านปรสิต (antiparasite) (Heng *et al*., 2000) ต้านการกลายพันธุ์ (antimuta-genic) (Polasa *et al*., 2004) ต้านและป้องกันมะเร็ง (chemoprotective และ anticancer) (Inano *et al*., 2000; Khafif *et al*., 1998; Limtrakul *et al*., 1997; Perkins *et al*., 2002) และ ฤทธิ์ป้องกันความเป็นพิษต่อตับ (hepatoprotective) (Song *et al*., 2001) จากการทดสอบความเป็นพิษของ curcuminoids นั้น ไม่พบความเป็นพิษเมื่อใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน (Sharma *et al*., 2001) จากข้อมูลด้านเภสัชวิทยาและพิษวิทยาข้างต้น มีความเป็นไปได้อย่างสูงว่า curcuminoids จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล นอกจากนี้ ความเป็นพิษที่ต่ำมากทำให้ curcuminoids มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้เป็นส่วนผสมในอาหารปลา เพื่อการป้องกันหรือรักษาโรคติดเชื้อ

เนื่องจากสารสกัดจากสมุนไพรมักประกอบไปด้วยสารเคมีหลายชนิด โดยสารแต่ละชนิดอาจมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และความเป็นพิษที่ไม่เท่ากันหรือแตกต่างกัน ทั้งนี้ หากสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดมีปริมาณไม่สม่ำเสมอในแต่ละครั้งของการผลิต เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาใช้เป็นยาหรืออาหารเสริมย่อมทำให้เกิดปัญหาด้านความไม่แน่นอนในการออกฤทธิ์ ด้วยเหตุนี้ การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดสมุนไพร จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทราบปริมาณที่แน่นอนของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดที่นำมาศึกษา โดยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่พบในสารสกัดหนึ่ง ๆ ก็จะ

เป็นฤทธิ์ของสารสกัดที่ประกอบไปด้วยสารสำคัญแต่ละชนิดในอัตราส่วนที่คงที่ ดังนั้น ข้อมูลด้านเคมีขององค์ประกอบในสารสกัดที่ศึกษาจึงมีความจำเป็นและมีประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัด การนำสารสกัดที่มีมาตรฐาน (standardized extract) ไปใช้จึงสามารถลดปัญหาด้านความไม่แน่นอนของการออกฤทธิ์ และสามารถใช้เป็นมาตรฐานอ้างอิงในการนำไปศึกษาและพัฒนาต่อไป

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแอโรโมนาส (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในปลานิล โดยมีการควบคุมคุณภาพของสารสกัดก่อนนำมาศึกษา สารสกัดขมิ้นชันที่นำมาใช้ศึกษาเป็นสารสกัดที่มีจำหน่ายอยู่ในท้องตลาด และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ curcuminoids 3 ชนิด ได้แก่ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin เพื่อให้สารสกัดที่นำมาใช้เป็นสารสกัดที่มีมาตรฐาน การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเพื่อผสมอาหารปลาเป็นสารเสริมสุขภาพ และเนื่องจากสารสกัดขมิ้นชันได้จากสมุนไพรธรรมชาติที่มีความปลอดภัยสูง จึงสามารถหลีกเลี่ยงจากปัญหาการตกค้างของยาในเนื้อปลา นอกจากนี้ยังเป็นการส่งเสริมการใช้ทรัพยากรของประเทศไทย

บทที่ 2

การทดสอบความไวรับของเชื้อแอโรโมนาสที่แยกจากปลานิลป่วยต่อขมิ้นชัน

ทดสอบการออกฤทธิ์ของขมิ้นชันในห้องปฏิบัติการโดยศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของขมิ้นชันที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแอโรโมนาส (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ที่แยกจากปลานิลป่วย (pathogenic aeromonas) ด้วยวิธี Antimicrobial Agar Dilution Susceptibility Tests (Clinical and Laboratory Standard Institute, 2002)

การแยกเชื้อแอโรโมนาสจากปลานิลป่วย

เชื้อแอโรโมนาสที่ใช้ในการศึกษา

1. เก็บตัวอย่างปลานิลป่วยจากฟาร์มเลี้ยงปลานิลที่มีปลานิลแสดงอาการป่วย เช่น กินอาหารลดลง มีแผลตามลำตัว ท้องบวม
2. แยกเชื้อแอโรโมนาสจากไต และ/หรือสมองของปลานิลป่วย โดยเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar; TSA (OXOID®, England) บ่มที่อุณหภูมิ 30ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. สังเกตลักษณะโคโลนีและเลือกเฉพาะเชื้อที่ขึ้นได้โคโลนีเป็นสีครีมหรือสีเหลืองมาพิสูจน์เชื้อโดยการย้อมแกรม และตรวจคุณสมบัติทางชีวเคมี (ตารางที่ 2.1) โดยวิธี Catalase test, Oxidase test O/F test (Oxidase/Fermentation test)
4. จำแนกชนิดของเชื้อแอโรโมนาสโดยวิธีชีวเคมี ด้วยชุดทดสอบ API® 20 E และ API® 20 NE (Biomerieux®) ตามขั้นตอนดังภาพที่ 2.1

API® 20 E เป็นชุดตรวจคุณสมบัติทางเคมีของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ beta-galactosidase, arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, citrate utilization, H_2S production, urease, tryptophane deaminase, indole production, acetoin production, gelatinase, glucose fermentation/oxidation, mannitol fermentation/oxidation, inositol fermentation/oxidation, sorbitol fermentation/oxidation, rhamnose fermentation/oxidation, sucrose fermentation/oxidation, melibiose fermentation/oxidation, amygdalin fermentation/oxidation, arabinose fermentation/ oxidation และ cytochrome oxidase

API® 20 NE เป็นชุดตรวจคุณสมบัติทางเคมีของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ nitrate reductase, indole production, glucose fermentation, urease, beta-glucosidase, protease, beta-galactosidase, glucose assimilation, arabinose assimilation, mannose assimilation, mannitol assimilation, N-acetyl-glucosamine, maltose assimilation, potassium gluconate assimilation, capric acid assimilation, adipic acid assimilation, malic acid assimilation, trisodium citrate assimilation, phenylacetic acid assimilation และ cytochrome oxidase

ตารางที่ 2.1 การจำแนกชนิดของเชื้อแอโรโมนาสตามคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี*

	A. hydrophila	*A. hydrophila gr. 1*	*A. hydrophila gr. 2*	*A. salmonicida spp salmonicida*	*A. caviae*	*A. media*	*A. eucrenophila*	*A. sobria*	*A. veronii boit. sobria*	*A. veronii boit. veronii*	*A. jandaei*	*A. schubertii*
Growth in KCN broth	+[3]	nd	nd	nd	+[3]	nd	nd	-[3]	nd	-[3]	nd	-[3]
Growth at 42ºC	d	nd	nd	nd	d	-(d)	-	-	+	+	d	+
Gram stain	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Cell morphology	rods	rods	rods	rods	rods	rods	rods	rods	rods	rods	rods	rods
Esculin	+	nd	nd	nd	+	+	+	-	-	+	-	-
Gas from glucose	+	nd	nd	nd	-	-	-	+	+	+	+	-
Catalase	+[1]	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Decarboxylation of												
- arginine	+[2, 3]	+	+	d	+[2, 3]	nd	nd	-[2, 3]	nd	nd	nd	nd
- lysine	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
- ornithine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
- histidine	+[2, 3]	nd	nd	nd	+[2, 3]	nd	nd	-[2, 3]	nd	nd	nd	nd
Elastin	d	nd	nd	nd	-	-	+	-	-	-	-	+
Citrate utilization	+[1]	-	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
H_2S production	+	-	-	-	+[2]/-[3]	nd	nd	-[2]/+[3]	nd	nd	+[3]	nd
Voges-Proskauer	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	nd	+	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acid production from												
- glucose	nd	+	+	d	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
- inositol	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+/-[3]
- mannitol	d/+[1]	+	+	d	+	+	+	-	-	+	-	-
- salicin	+/-[1]	nd	nd	nd	+	+	+	-	-	-	-	-
- arabinose	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
- saccharose	d	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	-	-	-
- sorbitol	+[3]	-	-	-	+[3]	nd	nd	+[3]	nd	nd	-[3]	-[3]
- rhamnose	nd	+	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
- sucrose	nd	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
- melibiose	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
- amygdalin	nd	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Synthesis indole	+[1]	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Synthesis gelatinase	+[1]	+	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Synthesis urease	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ONPG	+[1]	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Susceptible to												
- Choramphenical 30 µg	S[1]	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
- Oxolinic acid 2 µg	S[1]	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
- Ampicillin 10 µg	R[1]	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

ตารางที่ 2.1 การจำแนกชนิดของเชื้อแอโรโมนาสตามคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี*

---

*รวบรวมจาก Hanninen *et a*l. (1997), API® 20 E และ API® 20 NE (BioMerieux®)

+ = ส่วนใหญ่ให้ผลบวก

- = ส่วนใหญ่ให้ผลลบ

d = +/-

1 = อ้างจาก Yambot (1998)

2 = อ้างจาก Farmer III *et al*. (2006)

3 = อ้างจาก Ogden *et al*. (1994)

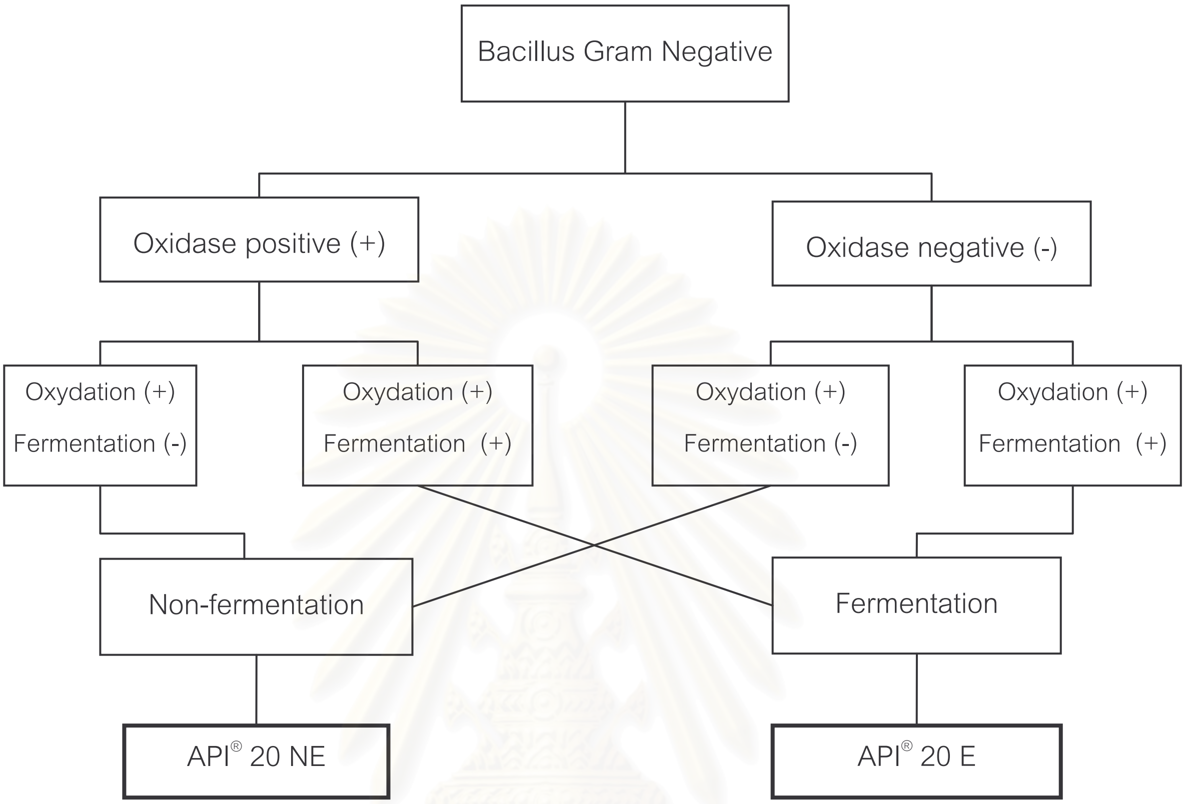
S = มีความไวรับ

R = มีความต้านทาน

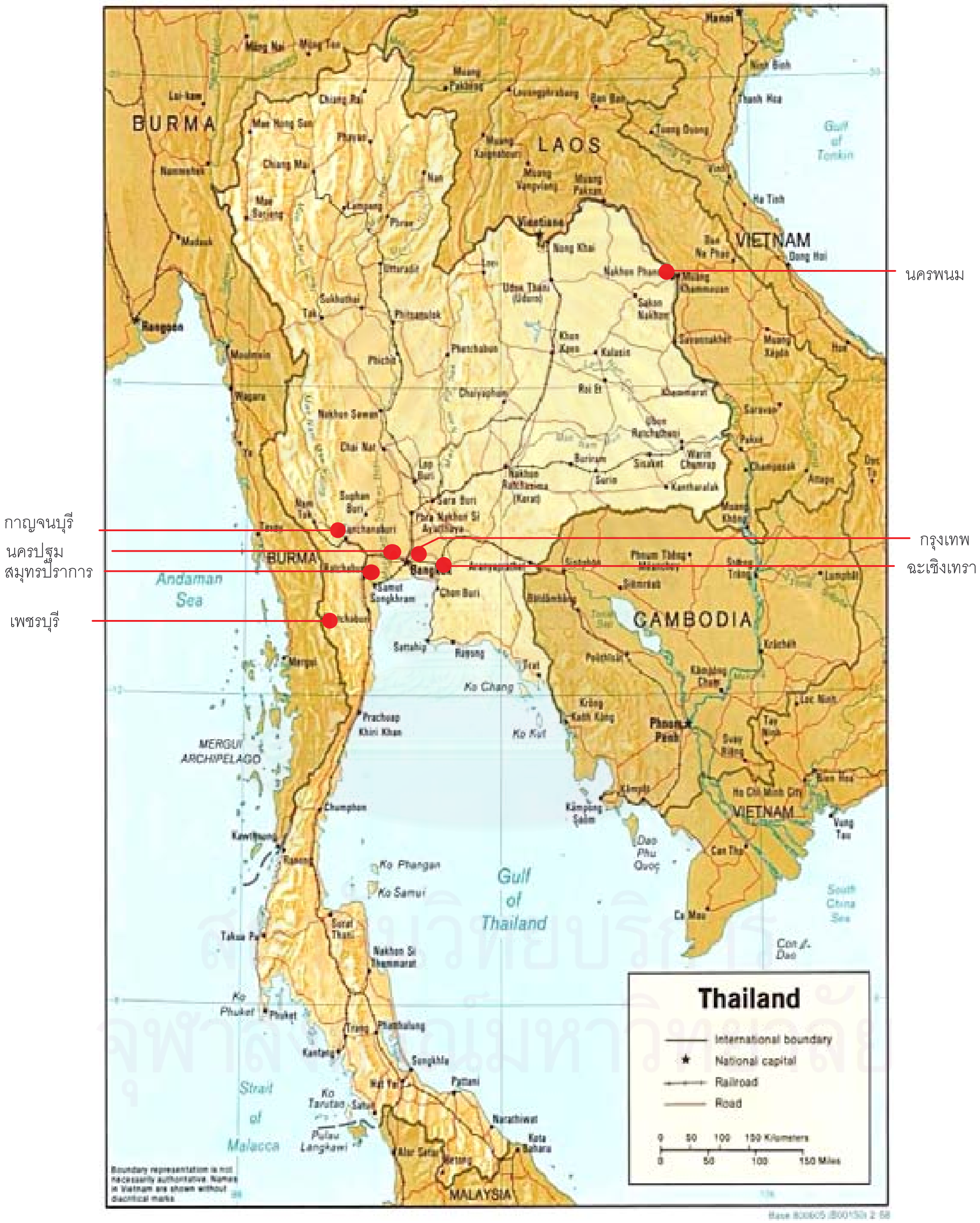
nd = no data

ONPG = O-nitro-beta-D-galactopyranoside hydrolysis by beta-galactisidase

ภาพที่ 2.1 การเลือกใช้ชุดทดสอบ API (BioMerieux®) สำหรับจำแนกเชื้อแอโรโมนาส


Bacillus Gram Negative
Oxidase positive (+)
Oxidase negative (-)
Oxydation (+)
Fermentation (-)
Oxydation (+)
Fermentation (+)
Oxydation (+)
Fermentation (-)
Oxydation (+)
Fermentation (+)
Non-fermentation
Fermentation
API® 20 NE
API® 20 E

เชื้อแอโรโมนาส (*Aeromonas hydrophila*) ที่ใช้ในการศึกษารวมทั้งหมด 43 isolates จากพื้นที่การเลี้ยงปลานิลในจังหวัดเพชรบุรี (12 isolates) นครพนม (4 isolates) กรุงเทพ (1 isolate) ฉะเชิงเทรา (23 isolates) นครปฐม (1 isolate) สมุทรปราการ (1 isolate) กาญจนบุรี (1 isolate) (ภาพที่ 2.2)


นครพนม
กาญจนบุรี
นครปฐม
สมุทรปราการ
กรุงเทพ
ฉะเชิงเทรา
เพชรบุรี
BURMA
LAOS
VIETNAM
CAMBODIA
MALAYSIA
Andaman Sea
Gulf of Thailand
Thailand
International boundary
National capital
Railroad
Road

ภาพที่ 2.2 เขตการเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยและเขตการเก็บตัวอย่างปลานิลป่วยที่นำมาแยกเชื้อแอโรโมนาสเพื่อทำการศึกษาความไวรับของเชื้อต่อขมิ้นชัน ●

การทดสอบความไวรับของเชื้อแอโรโมนาสต่อขมิ้นชัน

ทดสอบหาค่า MIC ของเชื้อแอโรโมนาสต่อขมิ้นชัน โดยวิธี Antimicrobial Agar Dilution Susceptibility Tests (CLSI, 2002)

1. การเตรียมขมิ้นชันในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวกที่ 1 – 2)
    1.1. สารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ทดสอบ (องค์การเภสัชกรรม) คือ curcuminoids (81.34%w/w) ประกอบด้วยสารบริสุทธิ์ curcumin: demethoxycurcumin: bisdemethoxycurcumin ในอัตราส่วน 1:0.47:0.12
    1.2. ละลายสารสกัดขมิ้นชันด้วย Dimethylsulfoxide (DMSO) ปริมาณ 1 ml และเติม Absolute ethanol จนครบปริมาณที่ต้องการทดสอบ โดยมีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 12,000 µg/ml และ 10,000 µg/ml (สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20°C เป็นระยะเวลาไม่เกิน 6 เดือน)
    1.3. ทำ two-fold dilution และ ten-fold dilution ในขั้นตอนสุดท้ายให้ได้ความเข้มข้นของขมิ้นชันเท่ากับ 8,000 – 500 µg/ml
    1.4. ผสมยาที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงใน Mueller-Hinton Agar (MHA) (OXOID®, England) ด้วยอัตราส่วน 1:10 โดยดูดสารละลายขมิ้นชันมา 2 ml ใส่ลงใน MHA 18 ml เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จะได้ MHA ที่มีขมิ้นชันความเข้มข้น 1,000 - 50 µg/ml
2. เตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ
    2.1. เตรียมเชื้อมาตรฐาน 3 ชนิดในการ inoculate แต่ละครั้งเพื่อควบคุมคุณภาพของงาน เชื้อมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC® (American Type Cultured Collection) 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 และ *Aeromonas hydrophila* ATCC® 35654 โดยเพาะ ลงใน TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 18-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่ได้มาใส่ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ปรับให้ได้ความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland ซึ่งจะมีเชื้ออยู่ประมาณ 10^{8} CFU/ml เจือจางในน้ำเกลือลงอีก 10 เท่า ได้ปริมาณเชื้อประมาณ 10^{7} CFU/ml (CLSI, 2002)
    2.2. เพาะเชื้อแอโรโมนาสที่แยกจากปลานิลป่วยจำนวน 43 isolates ลงใน TSA และนำโคโลนีที่ได้จากการบ่มมาเตรียมให้ได้ปริมาณเชื้อตามขั้นตอนเดียวกับการเตรียมเชื้อมาตรฐาน ข้อ 2.1

3. การทดสอบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมขมิ้นชัน
    - 3.1. ใส่เชื้อที่เตรียมในหลุม multipoint inoculator ซึ่งใส่เชื้อได้ 25 isolates โดยแบ่ง 3 หลุมใส่เชื้อมาตรฐาน 3 isolates และหลุมที่เหลือ 22 หลุม ใส่เชื้อแอโรโมนาสที่ทดสอบ
    - 3.2. ถ่ายเชื้อจากหลุมลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ผสมขมิ้นชันแล้ว จะได้จุดเชื้อซึ่งมีเชื้อประมาณ 10^4 CFU/spot
    - 3.3. เมื่อใช้ multipoint inoculator ถ่ายเชื้อลงใน MHA ที่ผสมขมิ้นชันไว้แล้ว ทิ้งไว้จนจุดที่ถ่ายเชื้อแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้
    - 3.4. วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม WHONET5 (WHO, 2000) อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ 50% (MIC_{50}) ของปริมาณเชื้อที่ใช้ทดสอบ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ 90% (MIC_{90}) ของปริมาณเชื้อที่ใช้ทดสอบ

ผลการศึกษา

การทดสอบความไวรับของเชื้อแอโรโมนาสที่แยกจากปลานิลป่วยต่อขมิ้นชัน

ทดสอบระดับความไวรับของเชื้อแอโรโมนาสที่แยกได้จากไต และ/หรือสมองของปลานิลป่วยต่อขมิ้นชัน โดยการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Agar ที่ละลายด้วยน้ำกลั่น ผลการทดสอบความไวรับของเชื้อแอโรโมนาสจากไต และ/หรือสมองของปลานิลป่วย แสดงความเข้มข้นของขมิ้นชันที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแอโรโมนาสจำนวน 43 isolates เท่ากับ <50 – 800 µg/ml (ตารางที่ 2.2) โดยแสดงค่า MIC_{50} เท่ากับ 500 µg/ml และค่า MIC_{90} เท่ากับ 800 µg/ml (ตารางที่ 2.3 และภาพที่ 2.3)

การทดสอบความไวรับของเชื้อแอโรโมนาสจากปลานิล หรือสัตว์น้ำชนิดอื่นต่อขมิ้นชันยังไม่ปรากฏรายงาน จึงไม่สามารถเปรียบเทียบกับผลการศึกษาครั้งนี้ การศึกษาผลของขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่น *E. coli*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* มีค่าแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ศึกษา (Chattopadhyay *et al*., 2004, Mahady *et al*., 2002) การเลือกใช้ตัวทำละลายสารสกัดขมิ้นชัน (Mishra *et al*., 2005; Dubey *et al*., 2008) และกระบวนการสกัดวัตถุดิบที่นำมาศึกษาที่แตกต่างกันจึงได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ไม่เท่ากัน (Lutomski *et al*., 1974) อย่างไรก็ตามยังพบว่าสารสกัดขมิ้นชันมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด

การศึกษานี้แสดงว่าขมิ้นชันมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแอโรโมนาสที่เป็นสาเหตุของปลานิลป่วยจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการให้ขมิ้นชันผสมอาหารในลักษณะของ feed additives อาจมีผลต่อการควบคุมปริมาณของเชื้อแอโรโมนาสในปลานิล ลดโอกาสการเกิดโรคติดเชื้อแอโรโมนาส โดยเฉพาะในปลานิลอนุบาลซึ่งมีความไวต่อการแพร่กระจายของเชื้อแอโรโมนาส

ตารางที่ 2.2 Minimum Inhibitory Concentrations ของขมิ้นชันที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแอโรโมนาสที่แยกจากปลานิลป่วย

ID	แหล่งที่มา	MIC (µg/ml)
7	เพชรบุรี	500
12	เพชรบุรี	500
13	เพชรบุรี	800
14	เพชรบุรี	250
15	นครพนม	800
18	สมุทรปราการ	500
20	กรุงเทพ	500
23	ฉะเชิงเทรา	800
28	ฉะเชิงเทรา	62.5
30	ฉะเชิงเทรา	800
31	ฉะเชิงเทรา	800
32	ฉะเชิงเทรา	800
34	เพชรบุรี	250
35	เพชรบุรี	500
41	นครปฐม	62.5
42	ฉะเชิงเทรา	500
43	ฉะเชิงเทรา	<50
47	นครพนม	500
49	ฉะเชิงเทรา	500
50	ฉะเชิงเทรา	500
66	นครพนม	800
80	เพชรบุรี	500
85	ฉะเชิงเทรา	500
91	ฉะเชิงเทรา	500
92	เพชรบุรี	800
98	เพชรบุรี	500
102	ฉะเชิงเทรา	500
109	กาญจนบุรี	500
114	เพชรบุรี	500
119	ฉะเชิงเทรา	500
127	เพชรบุรี	500
129	เพชรบุรี	500
133	ฉะเชิงเทรา	500
137	ฉะเชิงเทรา	500
143	ฉะเชิงเทรา	800
146	ฉะเชิงเทรา	800
150	ฉะเชิงเทรา	800
151	ฉะเชิงเทรา	500
152	ฉะเชิงเทรา	800
154	ฉะเชิงเทรา	800
155	ฉะเชิงเทรา	800
156	ไม่ระบุ	500
166	ฉะเชิงเทรา	500

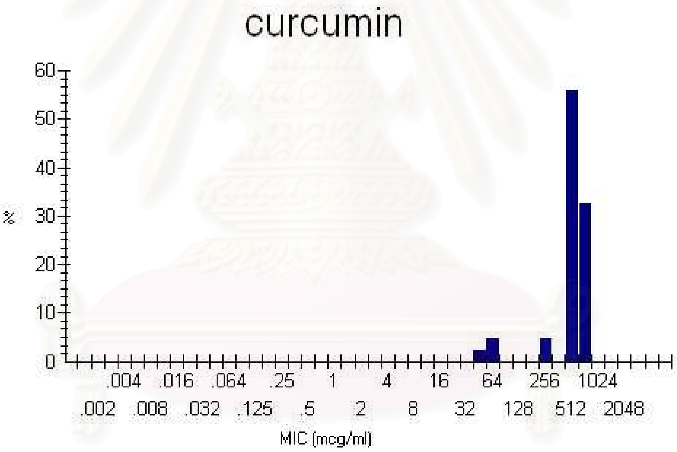
ตารางที่ 2.3 ค่า MIC_{50}, MIC_{90} และ Average MIC ของขมิ้นชันที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแอโรโมนาส

	MIC (µg/ml)		
	MIC_{50} [1]	MIC_{90} [2]	MIC range
Curcumin extract	500	800	<50 – 800

[1] Minimum Inhibitory 50%

[2] Minimum Inhibitory 90%

[3] Range of MIC observed in 43 pathogenic aeromonas isolates



ภาพที่ 2.3 การกระจายของค่า MIC ของขมิ้นชันทดสอบกับเชื้อแอโรโมนาส จำนวน 43 isolates

บทที่ 3

พัฒนาสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันสำหรับผสมอาหารเลี้ยงปลานิล

การเตรียมสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันเพื่อผสมอาหารเลี้ยงปลานิล โดยการทำละลายสารสกัดขมิ้นชันกับตัวทำละลายชนิดต่างๆ และใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันกับอาหารปลาเพื่อทดสอบการปฏิบัติงานจริงในฟาร์ม

การทดสอบการละลายของขมิ้นชัน

1. สารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ทดสอบ คือ curcuminoids (81.34%w/w) ประกอบด้วยสารบริสุทธิ์ curcumin: demethoxycurcumin: bisdemethoxycurcumin (1:0.47:0.12) (ภาพที่ 3.1-3.2)
2. ทดสอบการละลายในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ดังนี้ dimethylsulfoxide (DMSO), 95% เอทานอล และ 0.1M NaOH
3. หยดตัวทำละลายที่ใช้ทดสอบครั้งละประมาณ 1 ml ลงในหลอดทดลองที่ใส่สารสกัดขมิ้นชันประมาณ 100 mg แล้วเขย่าให้เข้ากัน สังเกตการละลาย บันทึกลักษณะที่พบ

การเตรียมสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันสำหรับผสมอาหาร

การเตรียมสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันสำหรับผสมอาหารพิจารณาจากปริมาณของขมิ้นชันที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแอโรโมนาสในห้องปฏิบัติการ (ค่า MIC_{50}; 500 µg/ml; 500 ppm) ความเหมาะสมของตัวทำละลาย ความปลอดภัยต่อสุขภาพปลานิล และวิธีการผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันกับอาหารปลานิลที่ไม่ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพ และความเหมาะสมของการปฏิบัติงานจริงในฟาร์ม

การศึกษาครั้งนี้กำหนดทดสอบสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันสำหรับผสมอาหาร 2 สูตร คือ 500 ppm (MIC_{50}) และ 1,000 ppm (2 เท่าของ MIC_{50}) (เท่ากับ 5 g และ 10 g/kg feed) โดยมีสัดส่วนของพรีมิกซ์ขมิ้นชันที่ผสมในอาหารคือ 1/10 เพื่อไม่ให้อาหารชื้นเกินไปหรือเสื่อมคุณภาพ ผสมพรีมิกซ์ตามสูตรและบรรจุในภาชนะบรรจุ 1 ลิตร (ตารางที่ 3.1)

1. ชั่งสารสกัดขมิ้นชัน 5 g (10 g สำหรับสูตรที่ 2) ใส่ในบีกเกอร์ ที่หุ้มด้วยกระดาษฟลอยด์ เพื่อป้องกันการสัมผัสแสง
2. ค่อยๆเติมตัวทำละลายปริมาตร 1 l ลงในบีกเกอร์ ปิดปากบีกเกอร์ด้วยกระดาษฟอยลด์
3. ผสมขมิ้นชันให้เข้ากันกับตัวทำละลายโดยใช้เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer)
4. เมื่อส่วนผสมละลายเข้ากันดีแล้วจึงบรรจุใส่ขวดพลาสติกทึบแสงปริมาตร 1 ลิตร เก็บไว้ในที่เย็นจนกว่าจะผสมอาหารปลาก่อนใช้เลี้ยง

ตารางที่ 3.1 สูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันสำหรับผสมอาหาร

	สูตร 1	**สูตร 2**
ความเข้มข้นของขมิ้นชันในตัวทำละลาย (ppm)*	500	1,000
ขมิ้นชัน (g)	5	10
ตัวทำละลาย (l)	1	1

*อัตราส่วนการผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชัน 1 ลิตร ต่ออาหารสัตว์ 10 กิโลกรัมเท่ากับความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชัน 50 ppm และ 100 ppm ในอาหารปลา

ผลการศึกษา

การทดสอบการละลายของขมิ้นชัน

พบว่าสารสกัดขมิ้นชัน สามารถละลายได้ดีที่สุดใน DMSO รองลงมาเป็น 95% เอทานอล และ 0.1M NaOH เมื่อใช้ตัวทำละลายในปริมาณที่เท่ากัน DMSO สามารถทำละลายสารสกัดขมิ้นชันได้มากกว่า 95% เอทานอล และ0.1M NaOH ถึง 10 เท่า (ตารางที่ 3.2) ลักษณะสารละลายขมิ้นชันมีลักษณะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของตัวทำละลาย โดยขมิ้นชันที่ละลายใน DMSO จะมีสีเหลืองเข้มมาก แต่เนื้อสารละลายจะเหลวใส ไม่ข้นหนืด สำหรับขมิ้นชันที่ละลายใน 95% เอทานอลสารละลายที่ได้จะมีสีเหลืองใส ในขณะที่ขมิ้นชันที่ละลายใน 0.1M NaOH พบว่าขมิ้นชันละลายยาก จับตัวเป็นก้อนและตกตะกอนและส่วนที่เป็นสารละลายจะมีสีส้ม (ภาพที่ 3.3)

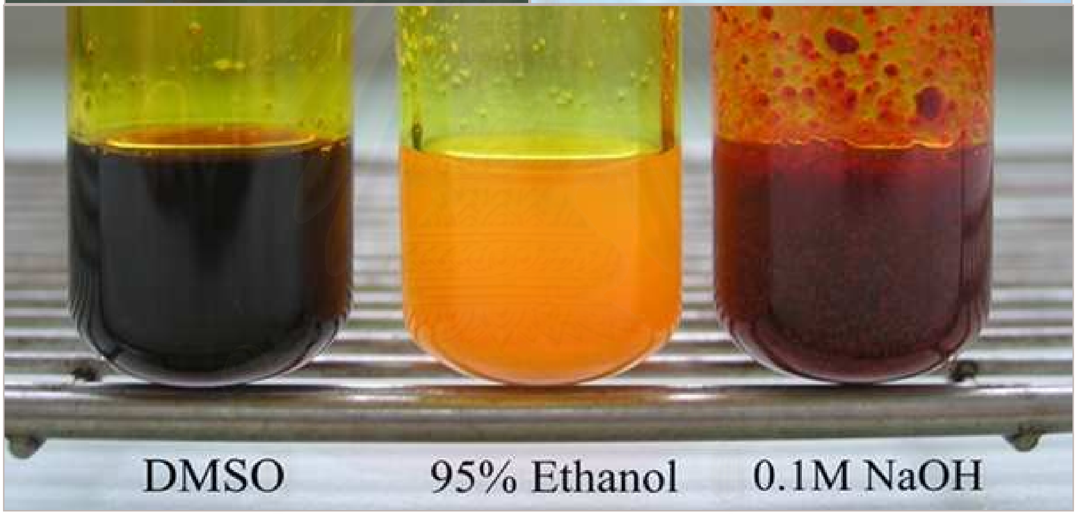
ตารางที่ 3.2 การทดสอบตัวทำละลายขมิ้นชัน

ตัวทำละลาย	**ปริมาณตัวทำละลาย (ml) ต่อขมิ้นชัน 100 mg**	**ปริมาณขมิ้นชัน (mg) ต่อตัวทำละลาย 1 ml**	**สารละลาย**	
			กายภาพ	**กรด-ด่าง**
DMSO	4	30	สีเหลืองเข้มใส	7.5
95% เอทานอล	80	3	สีเหลืองอ่อนใส	5
0.1M NaOH	80	3	สีส้ม เป็นก้อน	13

การเตรียมสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันสำหรับผสมอาหาร

เตรียมสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันสำหรับผสมอาหาร 2 สูตร คือ 500 ppm (MIC_{50}) และ 1,000 ppm (2 เท่าของ MIC_{50}) เพื่อนำไปทดลองใช้ผสมอาหารในฟาร์ม โดยใช้ตัวทำละลาย คือ 95% เอทานอล เนื่องจากไม่ทำให้อาหารปลาเสื่อมคุณภาพ และปลาสามารถกินอาหารได้ การเตรียมสารละลายพรีมิกซ์ขมิ้นชันกำหนดให้พรีมิกซ์ขมิ้นชันปริมาณ 1 ลิตร ผสมกับอาหาร 10 กิโลกรัม ซึ่งเป็นอัตราส่วนการผสมที่เหมาะสมสำหรับสภาพการปฏิบัติงานจริงในฟาร์ม ที่สามารถผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันกับอาหารได้ทั่วถึงโดยไม่ทำให้อาหารชื้นและเสื่อมคุณภาพ สำหรับการผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 1 ปริมาณ 1 l ใช้เวลาในการผสมประมาณ ½ - 1 ชั่วโมงสารสกัดขมิ้นชันส่วนใหญ่จึงจะละลาย ในขณะที่พรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 2 ใช้เวลาในการละลาย 1 - 2 ชั่วโมงสารสกัดขมิ้นชันจึงละลายเข้ากับ 95% เอทานอลพรีมิกซ์ขมิ้นชันทั้งสองสูตรเมื่อละลายแล้วยังคงพบตะกอนเหลืออยู่เล็กน้อย

Curcuminoid Extract


DMSO
95% Ethanol
0.1M NaOH

3.1	3.2
3.3	

ภาพที่ 3.1 ลักษณะของบรรจุภัณฑ์ของสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ทดสอบ

ภาพที่ 3.2 ลักษณะของสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ทดสอบ

ภาพที่ 3.3 ลักษณะการละลายของสารสกัดขมิ้นชันใน DMSO 95% เอทานอล และ 0.1M NaOH

บทที่ 4

พัฒนาวิธีการควบคุมคุณภาพของสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชัน

การควบคุมคุณภาพของสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันดำเนินการโดยตรวจวัดปริมาณสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ผสมอาหาร เพื่อให้สารสกัดขมิ้นชันที่นำมาใช้ปรุงเป็นสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันที่มีมาตรฐาน โดยปริมาณสารสำคัญวิเคราะห์ด้วยวิธี High performance liquid chromatography, HPLC ปริมาณสารสำคัญ curcuminoids ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชัน

1. สารมาตรฐาน
   1.1 การหาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชันที่นำมาใช้ผสมอาหาร จำเป็นต้องมีสารมาตรฐานของสารสำคัญดังกล่าวมาเป็นต้นแบบในการเทียบผลการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิค HPLC โดยนำสารสกัดขมิ้นชันมาแยกให้ได้สารมาตรฐาน ด้วยเทคนิค column chromatography และทำให้ตกผลึกเพื่อให้ได้สารมาตรฐานที่มีความบริสุทธิ์ โดยสารมาตรฐานมีค่าดังนี้ curcumin (99.56%), demethoxycurcumin (98.77%) และ bisdemethoxycurcumin (98.05%)
   1.2 เตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin แต่ละชนิดใน methanol (AR grade, Lab scan) ให้มีความเข้มข้น 0.3, 0.2 และ 0.2 mg/ml แล้วเจือจางด้วย 50% methanol ให้มีความเข้มข้น 0.03, 0.01, 0.002 mg/ml ตามลำดับ
2. สารสกัดขมิ้นชันที่นำมาใช้ผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชัน

เตรียมสารละลายของสารสกัดขมิ้นชันใน methanol ให้มีความเข้มข้น 0.40 mg/ml แล้วเจือจางด้วย 50% methanol ให้มีความเข้มข้น 0.04 mg/ml

3. High performance liquid chromatography (HPLC)
   3.1 ใช้คอลัมน์ชนิด C18 (HiQsil®, 4.6 mm × 150 mm, 5µ) ควบคุมอุณหภูมิที่ 33°C มีวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น acetonitrile (HPLC grade, Lab scan) และ 2% acetic acid (40:60, v/v) ด้วยอัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 2.0 ml/min
   3.2 ฉีดสารละลายมาตรฐานเข้า HPLC system (Shimadzu, Japan) ใช้ UV-Visible detector ตรวจวัดสารที่ 425 nm บันทึก HPLC chromatogram

3.3 ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ปริมาตรเท่ากับ 20 µl เข้า HPLC system ใช้ UV-Visible detector ตรวจวัดสารที่ 425 nm บันทึก HPLC chromatogram และพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายที่ฉีด จากนั้นคำนวณหาปริมาณ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin

การศึกษาความคงตัวของสารสกัดขมิ้นชันที่ผสมในอาหาร

ทดสอบความคงตัวของสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ในอาหารปลาหลังจากการผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันในอาหารปลาแล้ว การหว่านอาหารเลี้ยงปลาในบ่อ มักทำให้มีการสูญเสียสารสำคัญในอาหารจากการละลายออกจากเม็ดอาหารปลา (leaching) เมื่อเม็ดอาหารสัมผัสกับน้ำ ดังนั้นการศึกษานี้จึงวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดขมิ้นชันคงเหลือในอาหารหลังจากที่อาหารสัมผัสกับน้ำ เป็นระยะเวลาต่างๆ ผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันกับอาหารแล้วนำอาหารมาแช่ในน้ำ จากนั้นนำอาหารมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดขมิ้นชันคงเหลือในอาหารด้วยเทคนิค HPLC ที่เวลา 5, 10, 20, 30 และ 60 นาที

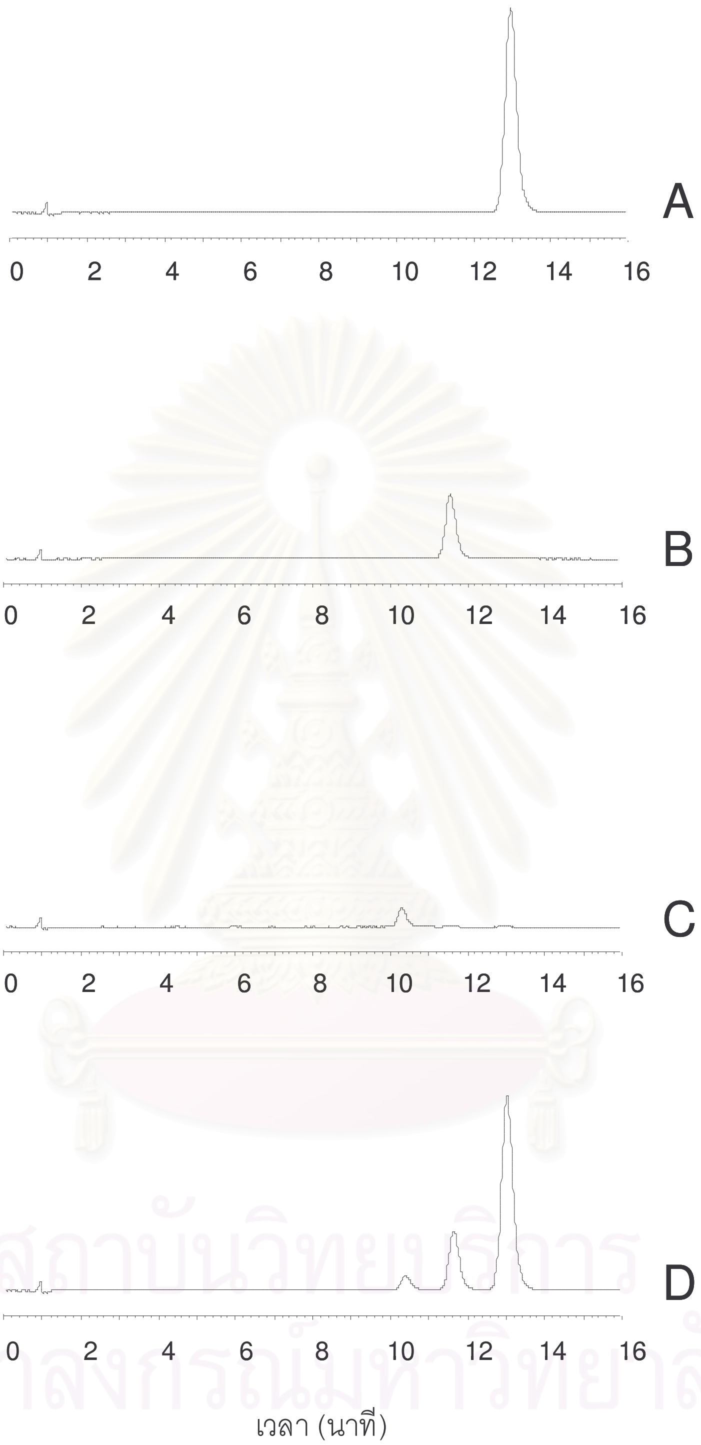
ผลการศึกษา

วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชัน

วิเคราะห์ปริมาณ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin ในสารสกัดขมิ้นชันด้วยเทคนิค HPLC แสดง chromatogram ในภาพที่ 4.1 โดยสารสกัดขมิ้นชันที่ทดสอบพบพีคเกิดขึ้น ณ retention time ประมาณ 12.97, 11.58 และ 10.33 นาที ซึ่งสอดคล้องกับพีคของสารมาตรฐาน curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin ตามลำดับ จากการคำนวณพบว่าสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแอโรโมนาสที่แยกได้จากปลานิลป่วยในห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วยปริมาณสารสำคัญคือ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin เท่ากับ 72.29%, 23.50% และ 3.63% ตามลำดับ และมีปริมาณของ curcuminoids รวมเท่ากับ 99.42%

การศึกษาความคงตัวของสารสกัดขมิ้นชันที่ผสมในอาหาร

ปริมาณของสารสกัดขมิ้นชันในเม็ดอาหารลดลงหลังจากที่เม็ดอาหารปลาสัมผัสกับน้ำ และลดลงตามระยะเวลาที่เม็ดอาหารสัมผัสกับน้ำ โดย ณ เวลา 30 และ 60 นาที ยังคงตรวจพบสารสกัดขมิ้นชันในอาหาร 70% และ 60% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.2)

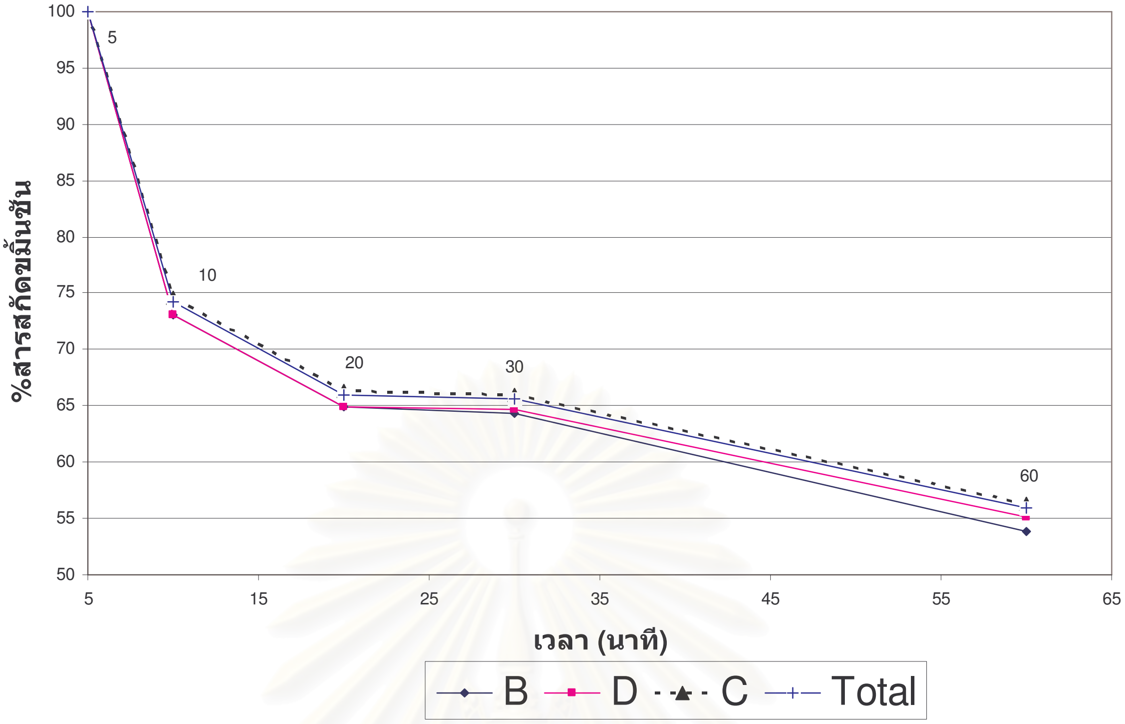


ภาพที่ 4.1 HPLC chromatograms ของสารละลายมาตรฐานและสารสกัดขมิ้นชัน curcumin 0.03 mg/ml (A), demethoxycurcumin 0.01 mg/ml (B), bisdemethoxycurcumin 0.002 mg/ml (C) และสารสกัดขมิ้นชันที่นำมาใช้ผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชัน 0.04 mg/ml (D)

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันในเม็ดอาหาร

เวลา (นาที)	replicate	Content (µg/pack)			
		B	D	C	Total
5	1	42.64	292.92	870.84	1,206.40
	2	44.74	306.37	908.41	1,259.52
10	1	28.95	198.55	602.45	829.95
	2	34.94	239.53	725.63	1,000.10
20	1	31.17	216.36	660.51	908.04
	2	25.54	172.52	519.31	717.37
30	1	33.46	231.67	702.20	967.33
	2	22.73	156.13	471.88	650.74
60	1	21.57	151.21	456.62	629.40
	2	25.50	179.28	544.30	749.08

หมายเหตุ B: bisdemethoxycurcumin, D: demethoxycurcumin, C: curcumin



B: bisdemethoxycurcumin, D: demethoxycurcumin, C: curcumin

ภาพที่ 4.2 สารสกัดขมิ้นชันที่คงเหลือในเม็ดอาหารหลังจากเม็ดอาหารสัมผัสน้ำ

บทที่ 5

ประเมินสูตรพรีมิกซ์ขมิ้นชันที่เหมาะสมสำหรับการใช้ผสมอาหารปลานิล

การเลี้ยงปลานิลในระบบอุตสาหกรรมปัจจุบัน ประกอบด้วยการจัดการหลายขั้นตอนตั้งแต่คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์มาผสม เก็บไข่ที่ได้รับการผสมแล้วมาฟักต่อภายในโรงเพาะฟักจนกระทั่งถุงไข่แดงยุบจึงนำมาอนุบาลต่อและให้อาหารผสมฮอร์โมนประมาณ 3 สัปดาห์เพื่อให้ปลาไม่แสดงลักษณะของเพศเมีย จากนั้นจึงสามารถนำไปเลี้ยงเป็นปลาขุน หรือขายเป็นลูกพันธุ์ต่อไป ในขั้นตอนการขายลูกพันธุ์ปลานั้นจะมีการคัดขนาดปลาเพื่อขายโดยใช้ตะแกรง หรือตาข่ายช่วยแยกปลาที่มีขนาดแตกต่างกัน การจัดการในขั้นตอนนี้มักพบปัญหาการเกิดแผลบนผิวหนังปลาซึ่งเกิดจากการเสียดสีกับอุปกรณ์ที่ใช้ในการคัดขนาด เป็นผลให้ปลามีโอกาสติดเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะเชื้อแอโรโมนาสผ่านทางบาดแผลได้ การทดสอบประสิทธิผลของพรีมิกซ์ขมิ้นชันผสมอาหารสำหรับปลานิลจะเริ่มดำเนินการศึกษาหลังจากช่วงอนุบาลจนถึงคัดขนาดปลาเพื่อขาย จากนั้นเก็บข้อมูล วิเคราะห์และพิจารณาผลการทดสอบหลังจากที่ปลานิลได้รับอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชัน ประเมินประสิทธิผลของการใช้พรีมิกซ์ขมิ้นชันผสมอาหารปลา เพื่อเสริมสุขภาพปลานิล เพิ่มความแข็งแรงให้กับผิวปลา ลดอัตราการเกิดแผลหลังจากการคัดขนาด และประเมินสูตรที่เหมาะสมสำหรับใช้ผสมอาหารปลานิล

การทดสอบประสิทธิผลของพรีมิกซ์ขมิ้นชันผสมอาหารสำหรับปลานิล

1. สัตว์ทดลอง

ลูกปลานิลแปลงเพศอายุ 23 วัน น้ำหนักประมาณ 0.08 – 0.1 กรัมต่อตัว จำนวนประมาณ 500,000 ตัว/ไร่ เลี้ยงในบ่อดินที่มีน้ำลึกประมาณ 1.6 เมตร (ความหนาแน่นเฉลี่ย 150-200 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร) ทำการทดลอง 3 บ่อ แบ่งเป็นบ่อควบคุม 1 บ่อและบ่อทดลอง 2 บ่อ (พรีมิกซ์ขมิ้นชันผสมอาหารสูตรที่ 1 และ 2)

2. การให้ขมิ้นชันผสมอาหาร

    2.1 เตรียมผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันกับอาหารก่อนนำไปเลี้ยงปลา (พรีมิกซ์ขมิ้นชันที่ผสมกับอาหารแล้ว ควรนำมาใช้ภายในวันเดียวกัน) เขย่าขวดพรีมิกซ์ขมิ้นชันที่เตรียมไว้ก่อนผสม พ่นลงบนอาหารเม็ดสำเร็จรูปให้ทั่ว คลุกเคล้าให้เข้ากันดี จากนั้นแผ่อาหารเม็ดสำเร็จรูปให้กระจายตัว และตากลมให้แห้ง จากนั้นจึงบรรจุในถุงทึบแสง ปิดให้สนิทเก็บไว้ไม่ให้ถูกแสง (ภาพที่ 5.1)

    2.2 กลุ่มทดลอง ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ผสมขมิ้นชันติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน โดย

        - บ่อทดลองที่ 1 ให้กินอาหารสูตรที่ 1: 500 ppm ในอาหาร

- บ่อทดลองที่ 2 ให้กินอาหารสูตรที่ 2: 1,000 ppm ในอาหาร

2.3 กลุ่มควบคุม ได้รับอาหารปกติ (อาหารเม็ดสำเร็จรูปขนาดเบอร์ 1 ที่ใช้เลี้ยงกุ้ง) ตลอดการทดลอง

2.4 ปริมาณการให้อาหารประมาณ 10% ของน้ำหนักตัว

3. การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจ

3.1 ตัวอย่างปลานิล

3.1.1 เก็บตัวอย่างลูกปลานิล เมื่อเริ่มการทดลองและสิ้นสุดการทดลอง ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง เพื่อนำมาตรวจสุขภาพโดยทั่วไป ตรวจปรสิตภายนอกและเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธีการเพาะเชื้อ

3.1.2 เก็บตัวอย่างลูกปลานิลกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองหลังจากผ่านตะแกรงร่อนที่ใช้คัดขนาดปลานิล เพื่อประเมินความแข็งแรงของผิวหนังโดยการสังเกตแผลตามลำตัว

3.2 ตัวอย่างอาหารเม็ดสำเร็จรูปทั้งอาหารเม็ดสำเร็จรูปปกติ และอาหารที่ผสมขมิ้นชันสูตรที่ 1 และ 2 เมื่อเริ่มการทดลอง ระหว่างการทดลอง และสิ้นสุดการทดลอง เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณขมิ้นชันในอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่นำไปเลี้ยงปลานิล โดยสุ่มเก็บตัวอย่างละ 50 g จำนวน 2 ซ้ำ

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

เก็บข้อมูลการเจริญเติบโตและความแข็งแรงของปลานิลทุกกลุ่ม กลุ่มละประมาณ 500 ตัว เช่น น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณปลาในบ่อเลี้ยง ลักษณะทั่วไปของปลาในแต่ละช่วงของการทดลอง ข้อมูลการจัดการการเลี้ยง เช่น ขนาดบ่อ วิธีการให้อาหาร ปริมาณการกินอาหาร ข้อมูลคุณภาพน้ำ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำ และข้อมูลอาหารที่ใช้ผสม เป็นต้น เพื่อนำมาวิเคราะห์ประสิทธิผลของพรีมิกซ์ขมิ้นชันผสมอาหารสำหรับปลานิลด้วยวิธีทางสถิติ คือ One-way ANOVA

ภาพที่ 5.1 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงลูกปลานิลทดลองสำหรับกลุ่มควบคุม คือ อาหารปกติ (1) กลุ่มทดลอง คือ อาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชัน (2)

ผลการศึกษา

การเจริญเติบโตและความแข็งแรงของปลานิล

จากการสังเกตพฤติกรรมลูกปลานิลแปลงเพศอายุ 23 วัน น้ำหนักประมาณ 0.08 – 0.1 กรัมต่อตัว ที่เลี้ยงในบ่อดิน (ภาพที่ 5.3-5.4) เมื่อได้รับอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันทั้งสองสูตร ปลาจะไม่ค่อยกินอาหารในวันแรก แต่ในวันถัดมาพบว่าปลาเริ่มคุ้นกับอาหาร ปริมาณการกินอาหารเพิ่มขึ้น (ภาคผนวกที่ 3) พบปลาป่วยประปรายในทุกกลุ่มการทดลอง ลักษณะปรากฏภายนอกของลูกปลาป่วย ได้แก่ ปาก ครีบและหางเปื่อย ขาว ไม่สามารถสังเกตความแตกต่างของจำนวนปลาป่วยระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม และเมื่อสิ้นสุดการทดลองสังเกตได้ว่าปลาส่วนใหญ่มีสุขภาพแข็งแรง (ภาคผนวกที่ 4)

อัตรารอดของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองอาหารสูตรที่ 1 และ 2 คือ 80.73% 100% และ 98.4% ตามลำดับ ซึ่งอัตรารอดของกลุ่มทดลองอาหารทั้งสองกลุ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุม (ตารางที่ 5.1) น้ำหนักตัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของปลากลุ่มทดลองอาหารสูตรที่ 1 และ 2 เท่ากับ 0.393 กรัมต่อตัว และ 0.452 กรัมต่อตัว ซึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุม (0.387 กรัมต่อตัว) (ภาพที่ 5.2) สำหรับอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average daily gain, ADG) ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้อาหารสูตรที่ 1 มีค่าไม่แตกต่างกัน (0.028 กรัมต่อวัน) แต่น้อยกว่ากลุ่มที่ให้อาหารสูตรที่ 2 (0.032 กรัมต่อวัน) (ตารางที่ 5.2 และภาคผนวกที่ 5)

ค่าอัตราการแลกเนื้อ (Feed conversion ratio, FCR) ของกลุ่มทดลองอาหารสูตรที่ 1 และ 2 เท่ากับ 0.882 และ 0.855 ตามลำดับ และกลุ่มควบคุมเท่ากับ 1.182 ซึ่งมีค่า FCR ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารผสมพรีมิกซ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อคำนวณค่าประสิทธิภาพของอาหาร (feed efficiency) ของกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมขมิ้นชันอาหารสูตรที่ 1 และ 2 เท่ากับ 1.094 1.211 ตามลำดับ โดยมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม คือ 0.851 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 5.2 และภาคผนวกที่ 7)

ผลการศึกษาแสดงว่า การผสมอาหารปลานิลด้วยพรีมิกซ์ขมิ้นชันในการศึกษานี้ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการกินอาหารของปลา ไม่ทำให้คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงเสีย แม้ว่าในช่วงแรกของการให้อาหารปลาจะกินอาหารได้ไม่มาก (ตารางที่ 5.2 และภาคผนวกที่ 5) แต่เมื่อคำนวนอัตราการแลกเนื้อพบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันมีประสิทธิภาพการใช้อาหารดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 5.1 อัตรารอดและอัตราตายของปลานิลทดลอง

กลุ่มทดลอง	อัตรารอด	อัตราตาย	%RPS*
ควบคุม	80.729	19.27	
สูตรที่ 1	100	0	100
สูตรที่ 2	98.4	1.6	91.70

*RPS, Relative Percent Survivals

$$\text{อัตรารอด} = \frac{\text{จำนวนปลามีชีวิตเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มการทดลอง}} \times 100$$

$$\text{อัตรารอด} = \frac{\text{จำนวนปลาตายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มการทดลอง}} \times 100$$

$$\%\text{RPS} = 1 - \left(\frac{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ได้รับพรีมิกซ์ขมิ้นชัน}}{\text{อัตราการตายของกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ}} \right) \times 100$$

ตารางที่ 5.2 การเจริญเติบโตของปลานิลทดลอง

กลุ่มทดลอง	**น้ำหนัก (กรัม/ตัว)**			ADG	FCR	%Weight gain	Feed efficiency
	ก่อนทดลอง	**หลังทดลอง**	**เพิ่มขึ้น**				
ควบคุม	0.081^{b}	0.468^{b}	0.387	0.028	1.182^{a}	482.019	0.851^{b}
	(0.005)	(0.035)	(0.034)	(0.002)	(0.101)	(52.480)	(0.076)
สูตรที่ 1 (500 ppm)	0.101^{a}	$0.494^{a,b}$	0.393	0.028	0.882^{b}	393.358	1.140^{a}
	(0.007)	(0.029)	(0.034)	(0.002)	(0.075)	(57.050)	(0.099)
สูตรที่ 2 (1000 ppm)	0.099^{a}	0.551^{a}	0.452	0.032	0.855^{b}	461.417	1.211^{a}
	(0.006)	(0.092)	(0.098)	(0.007)	(0.170)	(131.512)	(0.262)

ADG, Average Daily Gain; FCR, Feed Conversion Ratio

( ) แสดงถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) จากการสุ่มตัวอย่างลูกปลาจำนวน 5 ครั้ง (รวมกลุ่มละประมาณ 500 ตัว)

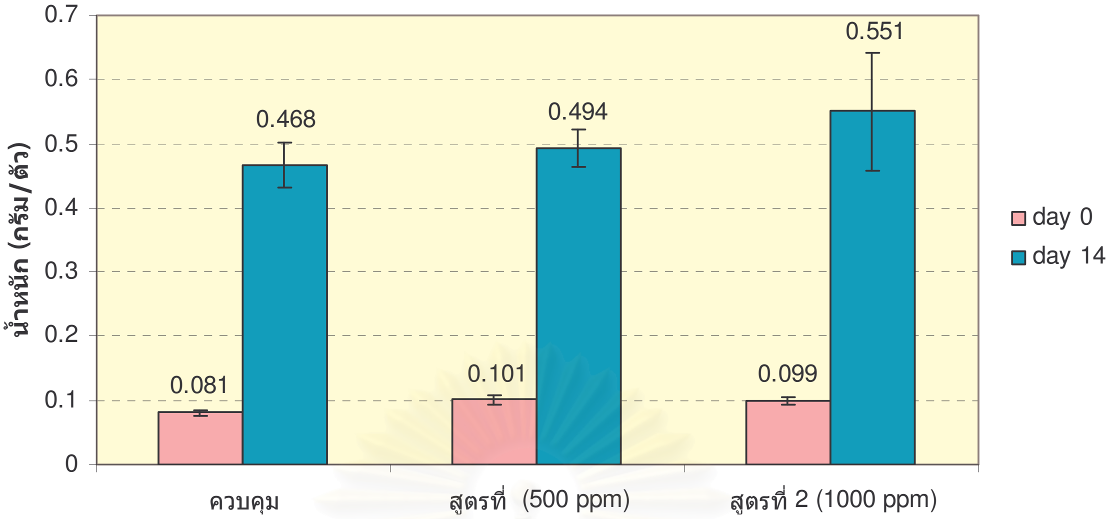
ทดสอบทางสถิติโดยใช้วิธี One-way ANOVA (p <0.05)

$$\text{ADG} = \frac{\text{น้ำหนักปลาหลังทดลอง - น้ำหนักปลาก่อนทดลอง}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง}}$$

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

$$\text{\%Weight gain} = \frac{\text{น้ำหนักปลาหลังทดลอง - น้ำหนักปลาก่อนทดลอง}}{\text{น้ำหนักปลาก่อนทดลอง}} \text{ X } 100$$

$$\text{Feed efficiency} = \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากินตลอดการเลี้ยง}}$$



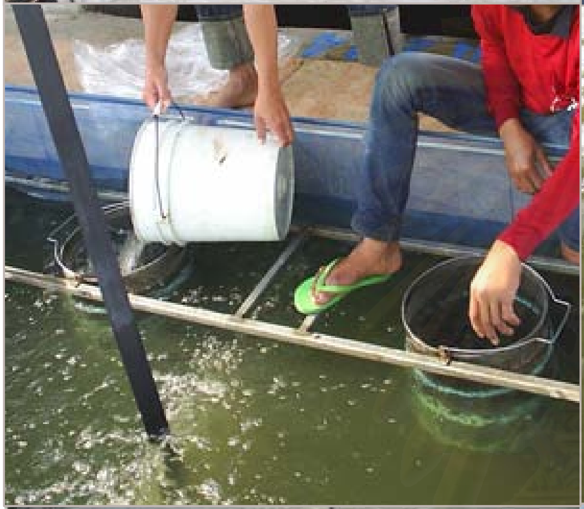
ภาพที่ 5.2 แผนภูมิแสดงน้ำหนักปลานิลเมื่อเริ่มการทดลองและสิ้นสุดการทดลอง (14 วัน)

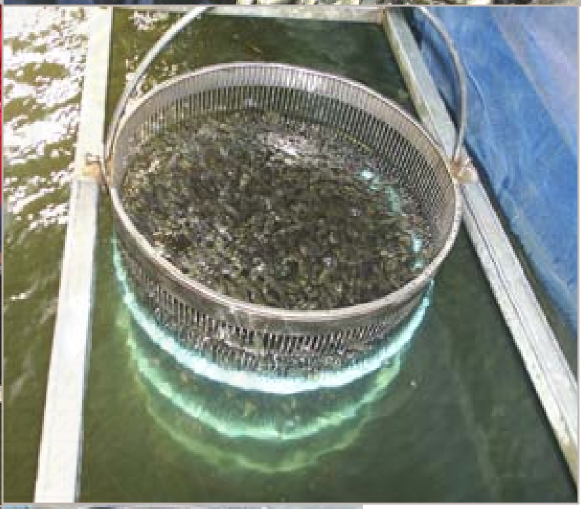
การเป็นแผลที่ผิวหนังของปลานิลหลังจากผ่านขั้นตอนการคัดขนาดเพื่อขาย

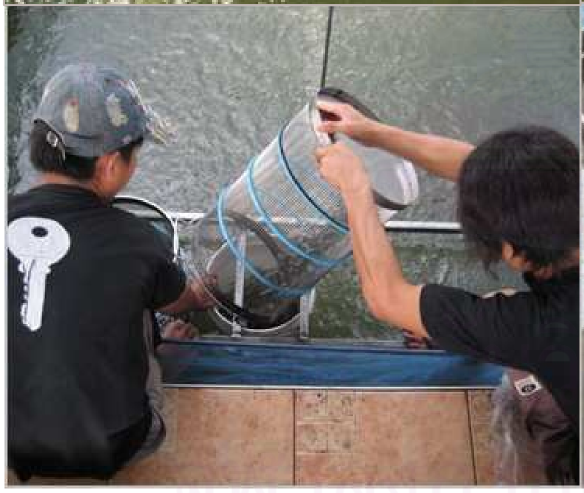
หลังจากทดลองให้พรีมิกซ์ขมิ้นชันผสมอาหารนานประมาณ 14 วันแล้ว ทางฟาร์มจะนำมาคัดขนาดโดยการผ่านตะแกรงร่อน (ภาพที่ 5.5-5.8) พบว่าปลานิลทั้งสามกลุ่มโดยส่วนใหญ่มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ดี มีส่วนน้อยเท่านั้นที่พบปาก ครีบและหางเปื่อย ขาว (ภาพที่ 5.9)

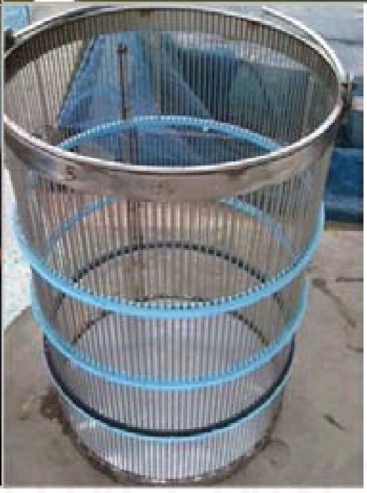
การตรวจหาแบคทีเรียก่อโรค

ตัวอย่างลูกปลานิลที่เก็บมาตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคในห้องปฏิบัติการในช่วงเริ่มการทดลองและสิ้นสุดการทดลอง ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ตรวจโดยตัดเนื้อเยื่อแยกเอาเฉพาะส่วนไตมาบด (tissue homogenate) แล้วเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจดูเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาไม่พบลักษณะของแบคทีเรียก่อโรคเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในทุกตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ









5.3	5.4
5.5	5.6
5.7	5.8

ภาพที่ 5.3 บ่อดินที่ใช้ในทดลองเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารสูตรต่างๆ

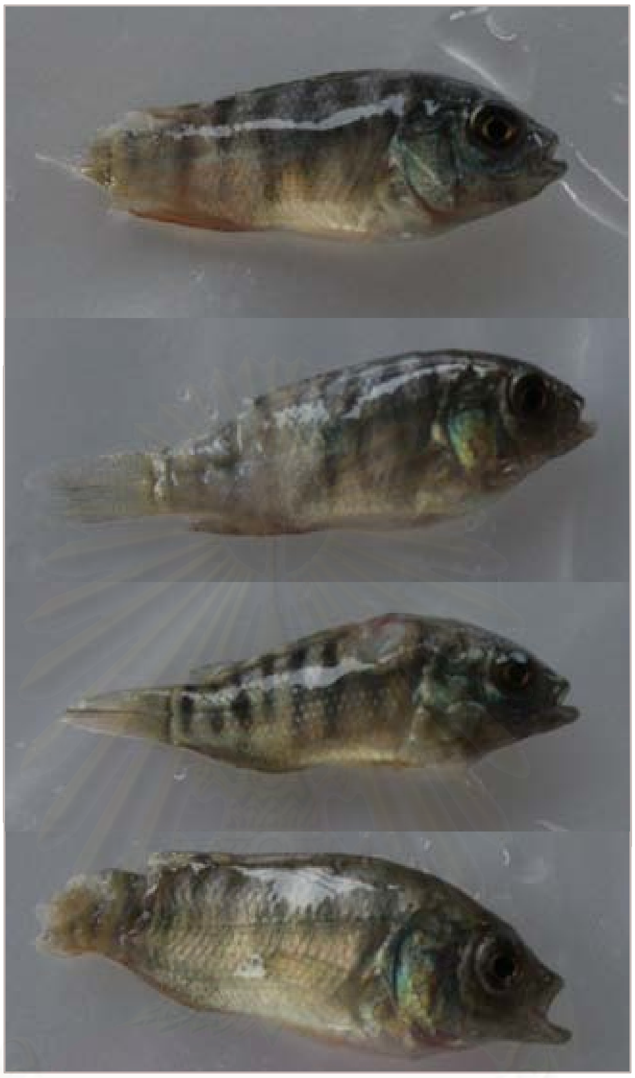
ภาพที่ 5.4 ลูกปลานิลแปลงเพศอายุ 23 วัน น้ำหนักประมาณ 0.08 – 0.1 กรัมต่อตัว

ภาพที่ 5.5 การคัดขนาดปลานิล ใช้ถังตักลูกปลาในบ่อที่มีขนาดคละกันใส่ลงในตะแกรงร่อนปลา

ภาพที่ 5.6 การคัดขนาดปลานิล ลูกปลาตัวเล็กจะว่ายออกจากตะแกรงร่อน

ภาพที่ 5.7 การคัดขนาดปลานิล ได้ลูกปลาตัวใหญ่กว่าขนาดตะแกรงร่อน

ภาพที่ 5.8 ตะแกรงร่อนปลา



ภาพที่ 5.9 ลูกปลานิลป่วยแสดงลักษณะอาการภายนอก ได้แก่ ปาก ครีบและหางเปื่อย กร่อน ขาว

อภิปรายและวิจารณ์ผล

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแอโรโมนาส (MIC) ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในปลานิลทั้งการทดสอบระดับห้องปฏิบัติการและในฟาร์มปลานิล โดยนำสารสกัดขมิ้นชันที่มีการระบุคุณภาพวัตถุดิบ (certificate of analysis) มาใช้ในการผสมอาหารปลานิล เพื่อเป็นสารเสริมสุขภาพปลา นอกจากนี้การศึกษารวมถึงการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ curcuminoids 3 ชนิด เพื่อให้สารสกัดที่นำมาใช้เป็นสารสกัดที่มีมาตรฐาน

การทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดขมิ้นชันในห้องปฏิบัติการ แสดงความเข้มข้นของขมิ้นชันที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแอโรโมนาสจำนวน 43 isolates ที่ทดสอบเท่ากับ <50 – 800 µg/ml โดยมีค่า MIC_{50} เท่ากับ 500 µg/ml ค่า MIC_{90} เท่ากับ 800 µg/ml โดยไม่พบการรายงานค่า MIC ของขมิ้นชันที่ทดสอบกับเชื้อแอโรโมนาในสัตว์น้ำ จึงไม่สามารถเปรียบเทียบกับผลการศึกษาครั้งนี้ สำหรับค่า MIC ของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ต่อขมิ้นชันเช่น *E. coli, Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus, Helicobacter pylori* (Chattopadhyay *et al*., 2004, Mahady *et al*., 2002) มีค่าแตกต่างกันไปในแต่ละการทดลอง ตามชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ศึกษา การใช้ตัวทำละลายสารสกัดขมิ้นชัน (Mishra *et al*., 2005; Dubey *et al*., 2008) และกระบวนการสกัดวัตถุดิบที่นำมาศึกษาที่แตกต่างกัน จึงได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ไม่เท่ากัน (Lutomski *et al*., 1974) อย่างไรก็ตามยังพบว่าสารสกัดขมิ้นชันมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Vibrio* spp. มีค่า MIC_{50} เท่ากับ 256 ppm และค่า MIC_{90} เท่ากับ 512 ppm (Rojsitthisak *et al*., 2005), *S. aureus* ATCC 25923 มีค่า MIC เท่ากับ 187.5 ppm, *S. epidermidis* ATCC 14990 มีค่า MIC เท่ากับ 46.9 ppm (Tajbakhsh *et al*., 2008), *Helicobacter pylori* มีค่า MIC เท่ากับ 50 ppm, *Bacillus subtilis* มีค่า MIC เท่ากับ 16 ppm (Ronita *et al*., 2009) การศึกษานี้แสดงผลทดสอบในห้องปฏิบัติการว่าขมิ้นชันมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแอโรโมนาส จึงมีความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดขมิ้นชันผสมในอาหารปลา เพื่อควบคุมปริมาณเชื้อแอโรโมนาสซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในปลานิล

การละลายของสารสกัดขมิ้นชันในตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ dimethylsulfoxide (DMSO), 95% เอทานอลและ 0.1M NaOH พบว่าค่าความเป็นกรดด่างของตัวทำละลายมีผลต่อการละลายของขมิ้นชัน โดยขมิ้นชันจะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีฤทธิ์เป็นกรดมากกว่าด่าง ถึงแม้ว่า DMSO จะมีฤทธิ์เป็นกรดและเป็นตัวทำละลายสารสกัดขมิ้นชันได้ดีที่สุดแต่ไม่สามารถนำมาใช้ผสมอาหารได้เนื่องจากมีฤทธิ์ทำให้ระคายเคือง และกัดกร่อนทำลายเนื้อเยื่อ (Pope and Oliver, 1966) ดังนั้น 95%

เอทานอลจึงเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้ละลายขมิ้นชันเพื่อผสมอาหาร นอกจากนี้ยังเป็นหนึ่งในตัวทำละลายที่ JECFA ระบุว่าสามารถใช้ทำละลายขมิ้นชันได้ดีเช่นกัน (JECFA, 2004)

ในการศึกษานี้ เปรียบเทียบอาหารปลาที่ผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชัน 2 สูตร ซึ่งให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดขมิ้นชัน เท่ากับ 500 ppm และ 1,000 ppm ในอาหาร (2 เท่าของ MIC_{50}) ซึ่งใช้เวลาในการละลายสารสกัดขมิ้นชันใน 95% เอทานอลนานพอสมควร หากนำไปใช้ในการทำงานจริงในฟาร์มขนาดใหญ่อาจพบปัญหาการผลิตไม่ทันต่อความต้องการใช้ได้ และพรีมิกซ์ขมิ้นชันทั้งสองสูตรเมื่อละลายแล้วยังคงพบตะกอนเหลืออยู่เล็กน้อย ดังนั้นก่อนนำไปใช้จึงต้องเขย่าขวดพรีมิกซ์ขมิ้นชันที่เตรียมไว้เพื่อให้ส่วนตะกอนที่ยังเหลืออยู่กระจายตัวในสารละลายมากที่สุดก่อนผสมอาหาร

สารสกัดขมิ้นชันที่ทดสอบหาปริมาณ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin ด้วยเทคนิค HPLC พบพีคเกิดขึ้น ณ retention time ประมาณ 12.97, 11.58 และ 10.33 นาที ซึ่งสอดคล้องกับพีคของสารมาตรฐาน curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดขมิ้นชันที่นำมาศึกษาและผสมในอาหารปลามีคุณภาพตามมาตรฐาน ถึงแม้ว่าปริมาณสารสำคัญของ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin ที่พบตรวจมีค่า เท่ากับ 72.29%, 23.50% และ 3.63% ตามลำดับ และมีปริมาณของ curcuminoids รวมเท่ากับ 99.42% ดังนั้นคุณสมบัติของเคอร์คิวมินอยด์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแอโรโมนาสในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นฤทธิ์ของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ที่มีอัตราส่วนของ curcumin :demethoxycurcumin : bisdemethoxycurcumin เท่ากับ 72.29 : 23.50 : 3.63 (ประมาณ 20 : 6.5 : 1) ตามลำดับ เมื่อนำไปทดสอบความคงตัวของสารสกัดขมิ้นชันที่ผสมอาหารโดยนำเม็ดอาหารที่ผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันแช่น้ำ พบว่าเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดขมิ้นชันที่ผสมในอาหารลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป โดย ณ เวลา 30 และ 60 นาที ยังคงตรวจพบสารสกัดขมิ้นชันในอาหาร 70% และ 60% ของปริมาณที่ผสมในอาหารตามลำดับ ดังนั้นการคำนวนปริมาณของสารสกัดขมิ้นชันที่เหมาะสมสำหรับผสมอาหารนั้นจำเป็นจะต้องพิจารณาค่าความคงตัวของสารสกัดเมื่ออาหารละลายในน้ำ นอกจากนี้อาจเคลือบเม็ดอาหารด้วยน้ำมันปลาหรือเจลาตินเพื่อลดการสูญเสียของสารออกฤทธิ์จากการละลายออกจากเม็ดอาหาร (leaching)

ประสิทธิผลของพรีมิกซ์ขมิ้นชันผสมอาหารเพื่อเป็นสารเสริมสุขภาพปลานิล การทดลองเลี้ยงลูกปลานิลอายุ 23 วัน ด้วยอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันเป็นเวลา 14 วัน แล้วนำลูกปลามาคัดขนาด พบว่าในช่วงแรกที่ปลาไม่ค่อยกินอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชัน อาจเนื่องจากขมิ้นชันที่ผสมทำให้กลิ่นและรสชาติของอาหารเปลี่ยนไป แต่ในวันต่อมาพบว่าปลาเริ่มคุ้นกับอาหาร สามารถกินได้มากขึ้น บางส่วนของลูกปลาทั้ง 3 กลุ่มที่พบอาการผิดปกติภายนอก เช่น ปาก ครีบและหางเปื่อย ลักษณะดังกล่าวมักพบได้ในการเลี้ยงลูกปลาอนุบาลแบบหนาแน่น การประเมินอัตราการป่วยของลูกปลาไม่

สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม อาจเป็นไปได้ว่าช่วงเวลาที่ทดลองให้อาหาร (14 วัน) ไม่เพียงพอต่อการสังเกตความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมในระหว่างการเลี้ยงได้ด้วยตาเปล่า

เมื่อนำอัตรารอด น้ำหนักตัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตต่อวันมาวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมแล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องจากมีความเบี่ยงเบนของข้อมูลในแต่ละกลุ่มการทดลอง ลูกปลาที่ได้มีขนาดไม่สม่ำเสมอ เมื่อนำมาชั่งน้ำหนักในช่วงสิ้นสุดการทดลองทำให้ค่าที่วัดได้เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติแล้วไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และช่วงเวลาที่ดำเนินการทดลองศึกษาประสิทธิผลของพรีมิกซ์ขมิ้นชันผสมอาหารเป็นช่วงที่อากาศเย็น อุณหภูมิแวดล้อมอยู่ระหว่าง 21-26 °C ทำให้ปลากินอาหารได้น้อยลง (ภาคผนวกตารางที่ 6) แต่อย่างไรก็ตามหากไม่พิจารณาความเบี่ยงเบนของข้อมูลหรือนัยสำคัญทางสถิติแล้ว พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารผสมขมิ้นชันมีค่าอัตรารอด น้ำหนักตัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตต่อวันมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน

อัตราการแลกเนื้อและประสิทธิภาพการใช้อาหารของกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมขมิ้นชันมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยกลุ่มที่ให้กินอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันแสดงประสิทธิภาพการใช้อาหารดีกว่ากลุ่มควบคุม จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการเสริมสุขภาพปลานิล พบว่าพรีมิกซ์ขมิ้นชันที่ผสมในอาหารปลานิลทำให้เพิ่มการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารหลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันขนาด 500 ppm และ 1,000 ppm ต่ออาหาร โดยการผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันในเม็ดอาหารปลาไม่มีผลทำให้ปลากินอาหารลดลง แม้ว่าในวันแรกของการให้อาหารปลาจะกินอาหารได้ไม่มาก นอกจากนี้พรีมิกซ์ขมิ้นชันยังไม่ทำให้คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงเสีย

เมื่อสิ้นสุดการทดลองและปลาทุกกลุ่มการทดลองผ่านขั้นตอนการคัดขนาดเพื่อขาย พบว่าปลานิลทั้งสามกลุ่มโดยส่วนใหญ่มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ดี สอดคล้องกับผลการตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคจากตัวอย่างลูกปลานิล ที่ตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อไตของลูกปลานิลทุกตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ

สรุปและเสนอแนะ

สารสกัดขมิ้นชันมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแอโรโมนาสที่แยกได้จากปลานิลป่วยในห้องปฏิบัติการ และสารสกัดขมิ้นชันสามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเพื่อเป็นสารเสริมสุขภาพในปลานิล โดยพบว่าลูกปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันขนาด 500 ppm และ 1,000 ppm (ต่ออาหาร) เป็นเวลาติดต่อกัน 14 วัน มีประสิทธิภาพของการใช้อาหารดีกว่ากลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ อย่างไรก็ตามปริมาณของสารสกัดขมิ้นชันที่นำมาเตรียมเป็นสารละลายพรีมิกซ์มีข้อจำกัดด้านคุณสมบัติการละลายของสารสกัดขมิ้นชัน จึงทำให้สารละลายพรีมิกซ์สารสกัดขมิ้นชันมีการตกตะกอนและต้องทำให้สารละลายเข้ากันก่อนนำมาสเปรย์บนเม็ดอาหาร ประกอบกับความไม่คงตัวของสารสกัดขมิ้นชันหลังจากสเปรย์บนเม็ดอาหาร ทำให้สูญเสียสารสกัดขมิ้นชันออกจากเม็ดอาหารเมื่อหว่านอาหารลงน้ำ แต่เนื่องจากการทดลองนี้เป็นการศึกษาขั้นเบื้องต้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินคุณสมบัติของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแอโรโมนาสและเสริมสุขภาพปลานิล จึงไม่สามารถผสมสารสกัดขมิ้นชันเป็นอาหารอัดเม็ดสำเร็จรูป (supplemented pellet) ซึ่งจะลดปัญหาการสูญเสียของสารสำคัญเมื่อหว่านอาหารลงน้ำ แต่อาหารเม็ดสำเร็จรูปเป็นเรื่องของกรรมวิธีในการผสมอาหารสัตว์ และต้องมีอุปกรณ์ระดับโรงงานอุตสาหกรรมจึงไม่อยู่ในขอบข่ายของการศึกษานี้ ดังนั้นหากมีการประเมินความคุ้มทุนของการใช้สารสกัดขมิ้นชันเป็นสารเสริมสุขภาพปลานิลอย่างชัดเจนแล้ว ขบวนการผลิตอาหารปลาผสมสารสกัดขมิ้นชันควรเป็นการอัดเม็ดสำเร็จรูป (supplemented pellet) แทนการสเปรย์บนอาหาร (top dressing) ดังเช่นการทดลองนี้

บรรณานุกรม

กรมสินค้าส่งออก. 2548. สินค้าส่งออกผลิตภัณฑ์ประเภทปลานิล. กระทรวงพาณิชย์. แหล่งที่มา http://www.ops2.moc.go.th/tradeth/cgihs/mainhs.asp

ฝ่ายเผยแพร่กองส่งเสริมการประมง. 2544. เอกสารคำแนะนำการเพาะเลี้ยงปลานิล. ฝ่ายเผยแพร่กองส่งเสริมการประมง. กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 10 หน้า.

ยุพินท์ วิวัฒนชัยเศรษฐ์ และ พันธุ์ศักดิ์ ใครบุตร. 2547. เอกสารคำแนะนำการเพาะเลี้ยงปลานิล. ฝ่ายเผยแพร่สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง. กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 31 หน้า.

องค์การเภสัชกรรม. 2548. ขมิ้นชัน. [Online]. แหล่งที่มา: http:// www.gpo.or.th

Ammon, H. P. and Wahl, M. A. 1991. Pharmacology of *Curcuma longa*. Planta Med. 57: 1-7.

Angulo, F. 1999. Use of antimicrobial agents in aquaculture : potential for public health impact. National aquaculture association. Center for disease control and prevention (CDC).

API Company. API20 NE and API 20E Instruction Manual (API Co., La Balme les Grottes, France).

Bonte, F., Noel-Hudson, M. S., Wepierre, J., and Meybeck, A. 1997. Protective effect of curcuminoids on epidermal skin cells under free oxygen radical stress. Planta Med. 63: 265-266.

Brouet, I. and Oshima, H. 1995. Curcumin, an anti-tumour promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. 206: 533-540.

Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U. and Banerjee, R.K. 2004. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. Curr. Sci. 87: 44-53.

Curr. Sci. 87: 44-53. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS). 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests. Ninth Informational Supplement-Sixth Edition. 19(1): 91-93.

Das, K. C. and Das, C. K. 2002. Curcumin (diferuloyl-methane), a singlet oxygen (1O2) quencher. Biochem. Biophys. Res. Commun. 295: 62-66.

Dubey, S.K., Sharma, A.K., Narian, U., Misra, K. and Pati, U. 2008. Design, Synthesis and characterization of some bioactive conjugates of curcumin with

glycine, glutamic acid, valine and demethylenated piperic acid and study of their antimicrobial and antiproliferative properties. Eur. J. Med. Chem. 43(9):1837-1846.

Farmer III, J. J., Arduino, M. J. and Hickman-Brenner, F. W. 2006. The Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. The Prokaryotes. 6: 564-596.

JECFA. 2004. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additive, Series 52 : Curcumin (addendum). Available online from : http:/Owww.inchem .org/ documents/jecfa/jecmono/v52je04 htm

Grinberg, L. N., Shalev, O., Tønnesen, H. H. and Rachmilewitz, E. A. 1996. Studies on curcumin and curcuminoids: XXVI. Antioxidant effects of curcumin on the red blood cell membrane. Int. J. Pharm. 132: 251-257.

Hänninena, M., Oivanenb, P. and Hirvelä-koskic, P. 1997. *Aeromonas* species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater. Int. J. of Food Micro. 34(1): 17-26.

Heng, M. C., Song, M. K., Harker, J. and Heng, M. K. 2000. Drug-induced suppression of phospho-rylase kinase activity correlates with resolution of psoriasis as assessed by clinical, histological and immunohistochemical parameters. Br. J. Dermatol. 143: 937-949.

Inano, H., Onoda, M., Inafuku, N., Kubota, Y., Osawa, T., Kobayashi, H. and Wakabayashi, K. 2000. Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats. Carcinogenesis 21: 1835-1841.

Jayaprakasha, G. K., Rao, L. J. M., and Sakariah, K. K. 2002. Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycur-cumin and bisdemethoxycurcumin. J. Agric. Food Chem. 50: 3668-3672.

Joe, B. and Lokesh, B. R. 1997. Prophylactic and therapeutic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids, capsaicin, and curcumin on adjuvant induced arthritis in rats. J. Nutr. Biochem. 8: 397-407.

Khafif, A., Schantz, S. P., Chou, T. C., Elderstein, D. and Sacks, P. G. 1998. Quantitation of chemopreventive synergism between (-)-epigallocatechin-3-gallate and curcumin in normal, premalignant and malignant human oral epithelial cells. Carcinogenesis 19: 419-424.

Limtrakul, P., Lipigorngoson, S., Namwong, O., Apisariyakul, A. and Dunn, F. W. 1997. Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. Cancer Lett. 116: 197-203.

Lutomski, J., Kedzia, B. and Debska, W., Effect of an alcohol extract and of active ingredients from *Curcuma longa* on bacteria and fungi. Planta Med., 1974, 26, 9–19.

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

Mishra, S., Narain, U., Mishra, R. and Misra, K. 2005. Design, development and synthesis of mixed bioconjugates of piperic acid-glycine, curcumin-glycine/alanine and curcumin-glycine- piperic acid and their antibacterial and antifungal properties. Bioorg. Med. Chem. 13: 1477-1486.

Ogden, I.D., MIllar, I.G., Watt, A.J. and Wood, L. 1994. A comparison of three identification kits for the confirmation of *Aeromonas* spp. Letters in Applied Microbiology. 18: 97-99.

Perkins, S., Verschoyle, R. D., Hill, K., Parveen, I., Threadgill, M. D., Sharma, R. A., Williams, M. L., Steward, W. P. and Gescher, A. J. 2002. Chemopreventive efficacy and pharmaco-kinetics of curcumin in the Min/+ Mouse, a model of familial adenomatous polyposis. Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev. 11: 535-540.

Pope, D. C. and Oliver, W. T. 1966. Dimethyl Sulfoxide (DMSO). Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 30: 3-8.

Polasa, K., Naidu, A. N., Ravindranath, I. and Krishnaswamy, K. 2004. Inhibition of B(α)P induced strand breaks in presence of curcumin. Mutat. Res. 557: 203-213.

Rajakrishnan, V., Jayadeep, A., Arun, O. S., Sudhakaran, P. R. and Menon, V. P. 2000. Changes in the prostaglandin levels in alcohol toxicity: Effect of curcumin and N-acetylcysteine. J. Nutr. Biochem. 11: 509-514.

Rojsitthisak, P., Limpanon, Y., Thipmongkolsilp, N., Kongtong, B. and Wongtavatchai, J. 2005. In vitro inhibitory effect of tumeric extract from *Curcuma longa* linn. On shrimp pathogenic vibrios. Thai J Pharm Sci. 29(Suppl): 86.

Ronita, D., Parag, K., Snehasikta, S., Ramamurthy, T., Abhijit, C., Balakrish, N. and Asish, K. M., 2009. Antimicrobial activity of curcumin against Indian *Helicobacter* pylori and also during mice infection. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 53(4):1592-7.

Sharma, R. A., McLelland, H. R., Hill, K. A., Ireson, C. R., Euden, S. A., and Manson, M. M. 2001. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral curcuma extract in patients with colorectal cancer. Clin. Cancer Res. 7: 1984-1900.

Song, E. K., Cho, H., Kim, J. S., Kim, N. Y., An, N. H., Kim, J. A., Lee, S. H. and Kim, Y. C. 2001. Diarylheptanoids with free radical scavenging and hepatoprotective activity in vitro from *Curcuma longa*. Planta Med. 67: 876-877.

Tajbakhsh, S., Mohammadi, K., Deilami, I., Zandi, K., Fouladvand, M., Ramedani, E. and Asayesh, G. 2008. Antibacterial activity of indium curcumin and indium diacetylcurcumin. African Journal of Biotechnology. 7 (21): 3832-3835.

Ungphaiboon. S., Supavita, T., Singchangchai, P., Sungkarak, S., Rattanasuwan, P. and Itharat, A. 2005. Study on antioxidant and antimicrobial activities of turmeric clear liquid soap for wound treatment of HIV patients. Songklanakarin J Sci Technol. 27(Suppl):569-78.

WHO Technical Report Series. 1999. Food safety issues associated with products from aquaculture. Joint FAO/NACA/WHO study group. 833. Geneva.

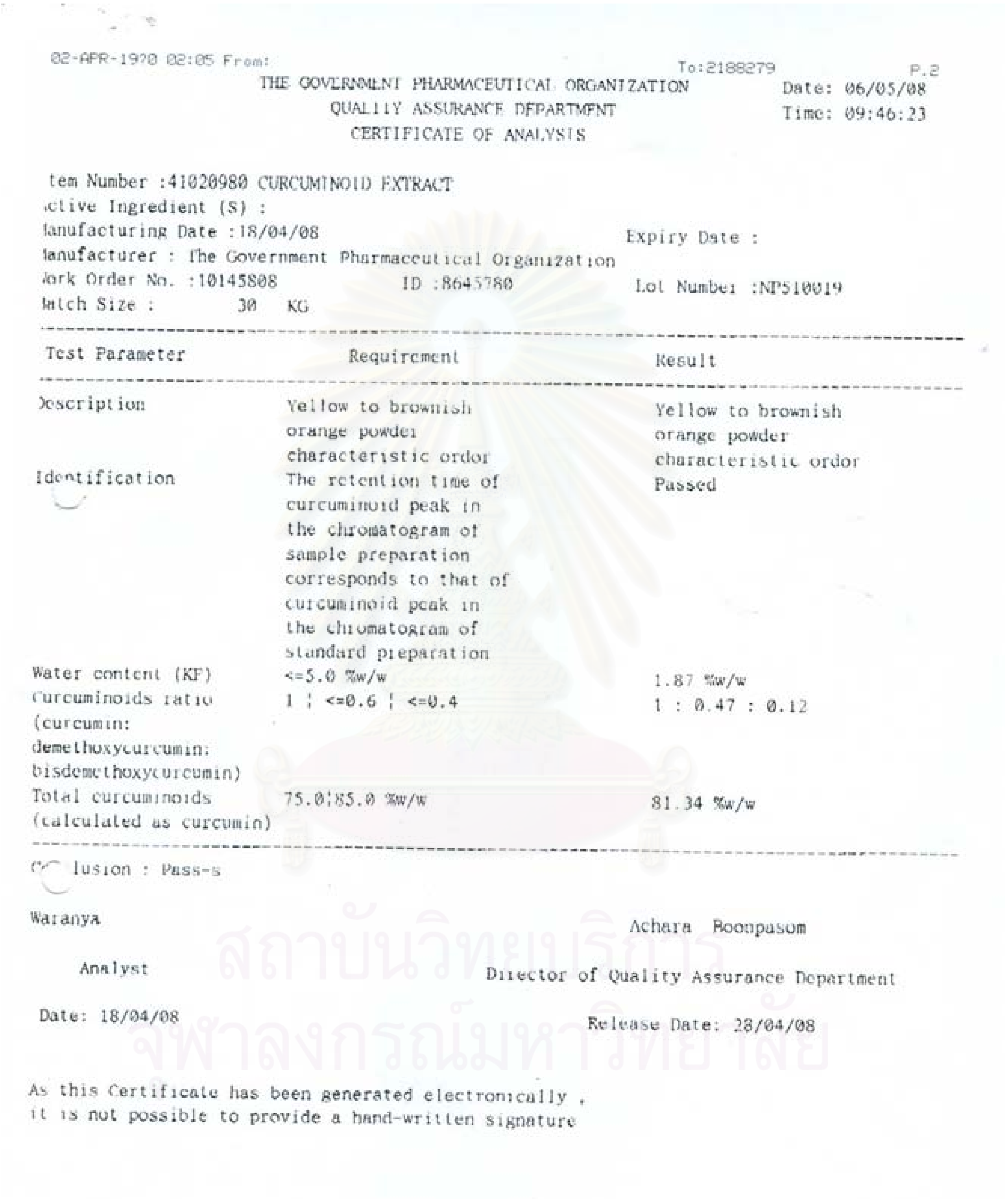
World aquaculture. 2004. World production aquaculture. [Online]. Available. http://www.was.org/main

World Health Organization (WHO), Department of Communicable Disease Surveillance and Response. 2000. WHONET5 Laboratory Database Software, Geneva.

YAMBOT, A.V. 1998. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from *Oreochromis niloticus* During Fish Disease Outbreaks in the Philippines. Asian Fish. Sci. 10: 347-354 .

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 Certificate of analysis : curcuminoids



02-APR-1970 02:05 From: To:2188279 P.2

THE GOVERNMENT PHARMACEUTICAL ORGANIZATION
QUALITY ASSURANCE DEPARTMENT
CERTIFICATE OF ANALYSIS

Date: 06/05/08
Time: 09:46:23

tem Number :41020980 CURCUMINOID EXTRACT
ctive Ingredient (S) :
anufacturing Date :18/04/08 Expiry Date :
anufacturer : The Government Pharmaceutical Organization
ork Order No. :10145808 ID :8645780 Lot Number :NP510019
atch Size : 30 KG

Test Parameter	Requirement	Result
escription	Yellow to brownish orange powder characteristic ordor	Yellow to brownish orange powder characteristic ordor
Identification	The retention time of curcuminoid peak in the chromatogram of sample preparation corresponds to that of curcuminoid peak in the chromatogram of standard preparation	Passed
Water content (KF)	<=5.0 %w/w	1.87 %w/w
Curcuminoids ratio (curcumin: demethoxycurcumin: bisdemethoxycurcumin)	1 ¦ <=0.6 ¦ <=0.4	1 : 0.47 : 0.12
Total curcuminoids (calculated as curcumin)	75.0¦85.0 %w/w	81.34 %w/w

Conclusion : Pass-s

Waranya
Analyst
Date: 18/04/08

Achara Boonpasom
Director of Quality Assurance Department
Release Date: 28/04/08

As this Certificate has been generated electronically ,
it is not possible to provide a hand-written signature

ภาคผนวกที่ 2 การเจือจางขมิ้นชันสำหรับ Antimicrobial Agar Dilution Susceptibility Test

ขั้นตอนที่	ความเข้มข้นขมิ้นชัน (µg /ml)	นำมาจากขั้นตอนที่	อัตราส่วน (ml)		ความเข้มข้นก่อนผสม MHA	ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ เจือจาง 1:10 ใน MHA
			สารละลายขมิ้นชัน	น้ำกลั่น		
1	12000	stock solution*	-	-	12000	1200
2	10000	stock solution*	-	-	10000	1000
3	12000	1	2	1	8000	800
4	10000	2	1	1	5000	500
5	10000	2	1	3	2500	250
6	10000	2	1	7	1250	125
7	1250	6	1	1	625	62.5
8	5000	4	1	9	500	50

* ชั่งสารสกัดขมิ้นชันใน volumetric flask ขนาด 10 ml ค่อยๆเติม DMSO เพื่อละลายสารสกัดขมิ้นชันจนหมด จากนั้นปรับปริมาตรด้วย 95%เอทานอล ให้ได้ stock solution ที่มีความเข้มข้น 12,000 µg/ml และ 10,000 µg /ml ตามลำดับ

MHA Mueller-Hinton Agar

ภาคผนวกที่ 3 ปริมาณอาหารที่ให้ต่อวัน (kg) ในแต่ละกลุ่มทดลอง

วันที่ทดลอง	ปริมาณอาหารที่ให้ต่อวัน (kg)		
	กลุ่มควบคุม	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2
1	22.5	8	8
2	24	9	8
3	24	10	10
4	25.5	11	11
5	27	12	12
6	28.5	13	13
7	25	14	14
8	26	15	15
9	27	15	16
10	28	13	16
11	23	14	14
12	24	14.5	15
13	24	15	15.5
14	24	16	16
รวม	352.5	179.5	183.5

หมายเหตุ อาหารที่ใช้ในการทดลอง คือ อาหารกุ้งกุลาดำเม็ดขนาดเบอร์ 1

ภาคผนวกที่ 4 ลักษณะทั่วไปของลูกปลาเมื่อทดลองให้อาหาร

วันที่ ทดลอง	**ลักษณะทั่วไปของลูกปลาที่สังเกตได้**		
	กลุ่มควบคุม	**สูตรที่ 1**	**สูตรที่ 2**
0	ลูกปลาแข็งแรงดี ว่ายน้ำปกติ ไม่พบแผล	ลูกปลาแข็งแรงดี ว่ายน้ำปกติ ไม่พบแผล	ลูกปลาแข็งแรงดี ว่ายน้ำปกติ ไม่พบแผล
1	เริ่มเห็นปลามีอาการปากเปื่อยเล็กน้อย	ลูกปลายังไม่ค่อยกินอาหาร เนื่องจากยังไม่คุ้น	ลูกปลายังไม่ค่อยกินอาหาร เนื่องจากยังไม่คุ้น
2	เริ่มเห็นปลามีอาการปากเปื่อยเล็กน้อย	ลูกปลาเริ่มกินอาหารดีขึ้น พบปลาป่วยลอยตามขอบบ่อบ้าง	ลูกปลาเริ่มกินอาหารบ้าง พบลูกปลาบางส่วนปากเปื่อย หางเปื่อย
3	เริ่มเห็นปลามีอาการปากเปื่อยเล็กน้อย	ลูกปลากินอาหารดีขึ้น เริ่มคุ้นกับอาหาร	ลูกปลากินอาหารดีขึ้น เริ่มคุ้นกับอาหาร
4	เริ่มเห็นปลามีอาการปากเปื่อยเล็กน้อย	ยังพบลูกปลาที่ป่วย ว่ายน้ำไม่แข็งแรง	ลูกปลากินอาหารดี โดยส่วนมากสุขภาพแข็งแรง
5	ลูกปลามีอาการปากเปื่อย หางขาวมากขึ้น	พบลูกปลาขนาดเล็ก แตก size มาก	ลูกปลาโดยส่วนใหญ่มีขนาดไล่เลี่ยกัน
6	ลูกปลามีอาการปากเปื่อย หางขาวมากขึ้น	ยังคงมีลูปปลาที่ป่วย กระจายตามขอบบ่อและกินอาหารช้า	ลูกปลาสุขภาพแข็งแรงดี พบลูกปลาบางส่วนหางเปื่อย
7	ลูกปลามีอาการปากเปื่อย หางขาวมากขึ้น	ตรวจสอบพบลูกปลามีปรสิตเกาะอยู่เป็นจำนวนมาก	พบลูกปลาว่ายน้ำผิดปกติ เชื่องช้าลง หางปลาเริ่มขาวขุ่น
8	ลูกปลามีอาการปากเปื่อย หางขาวมากขึ้น	ลูกปลากินอาหารน้อยลง อาจเพราะอากาศเย็นลง	ตรวจสอบพบลูกปลามีปรสิตเกาะอยู่เป็นจำนวนมาก
9	ลูกปลามีอาการปากเปื่อย หางขาวมากขึ้น	ลูกปลาไม่ค่อยกินอาหาร มีอาหารเหลือ	ลูกปลากินอาหารน้อยลง อาจเพราะอากาศเย็นลง
10	มีปลาตายบริเวณท้ายบ่อเป็นจำนวนมาก	ปรับลดอาหาร ลูกปลามีครีบและหางเปื่อย	ลูกปลากินอาหารน้อยลง อาจเพราะอากาศเย็นลง
11	มีปลาตายบริเวณท้ายบ่อเป็นจำนวนมาก	ในช่วงเช้าปลากินอาหารน้อย แต่ช่วงเย็นลูกปลาเริ่มกินอาหารดีขึ้น	พบลักษณะการเปื่อยที่ครีบและหาง ลูกปลาไม่ค่อยกินอาหาร
12	มีปลาตายบริเวณท้ายบ่อเป็นจำนวนมาก	พบลูกปลาป่วย มีขุยขาวขึ้นที่ลำตัวละหาง	ลูกปลาเริ่มกินอาหารดีขึ้น แต่กินช้าในช่วงเช้า
13	ลูกปลาแข็งแรงขึ้น แต่ยังพบปลาตายอยู่	ยังพบปลาป่วยละตายอยู่แต่กินอาหารดีขึ้น	ช่วงเย็นอากาศอบอุ่น ลูกปลากินอาหารมาก พบปลาหางเปื่อย ป่วยเล็กน้อย
14	ลูกปลาแข็งแรงขึ้น พบบางส่วนมีแผล ตัวเปื่อย	พบปลาตายน้อยลงแต่ไม่ค่อยแข็งแรงเท่ากลุ่มควบคุม	สุขภาพปลาโดยรวมแข็งแรงดี แต่ยังคงมีปรสิตอยู่
15 (หลังจากร่อนปลา)	สุ่มตรวจลูกปลาแข็งแรงดี ว่ายน้ำปกติ สีปกติ ขนาดสม่ำเสมอ ไม่พบแผล แต่จากการสังเกตพบปลามีลักษณะตาโปน ตาบอดบ้างเล็กน้อย คิดเป็น 0.5%	สุ่มตรวจลูกปลาแข็งแรงดี ว่ายน้ำปกติ สีปกติ ขนาดสม่ำเสมอ ไม่พบแผล แต่จากการสังเกตพบปลามีบาดแผลตามลำตัว หางกร่อน สีเข้มผิดปกติ คิดเป็น 0.5%	สุ่มตรวจลูกปลาแข็งแรงดี ว่ายน้ำปกติ สีปกติ ขนาดสม่ำเสมอ ไม่พบแผล แต่จากการสังเกตพบปลามีบาดแผลบริเวณ หัว ลำตัว ครีบกร่อน คิดเป็น 0.5%

ภาคผนวกที่ 5 ข้อมูลการเจริญเติบโตของปลานิล อาหารและอัตรารอด

กลุ่มทดลอง	ครั้งที่วัด	น้ำหนัก (กรัม/ตัว)			ADG	FCR	%Weight gain	Feed efficiency
		ก่อนทดลอง	หลังทดลอง	เพิ่มขึ้น				
ควบคุม	1	0.076	0.458	0.382	0.027	1.192	501.16	0.839
	2	0.075	0.453	0.377	0.027	1.206	499.89	0.829
	3	0.080	0.522	0.442	0.032	1.029	549.31	0.971
	4	0.088	0.476	0.389	0.028	1.170	443.35	0.854
	5	0.083	0.430	0.347	0.025	1.311	416.39	0.763
สูตรที่ 1 (500 ppm)	1	0.093	0.529	0.436	0.031	0.790	468.18	1.212
	2	0.096	0.470	0.374	0.027	0.921	390.81	1.220
	3	0.106	0.477	0.371	0.026	0.929	349.36	1.064
	4	0.110	0.470	0.360	0.026	0.956	328.83	0.931
	5	0.098	0.521	0.423	0.030	0.815	429.61	1.629
สูตรที่ 2 (1000 ppm)	1	0.098	0.550	0.452	0.032	0.825	460.99	1.266
	2	0.102	0.558	0.455	0.033	0.820	444.06	1.085
	3	0.099	0.495	0.397	0.028	0.940	402.45	1.077
	4	0.107	0.455	0.347	0.025	1.074	323.08	1.046
	5	0.090	0.697	0.608	0.043	0.614	676.51	1.227

ADG, Average Daily Gain (กรัม/วัน); FCR, Feed Conversion Ratio

กลุ่มทดลอง	**จำนวนปลา (ตัว)**			**ปริมาตรบ่อเลี้ยง (ลูกบาศก์เมตร)**	**ความหนาแน่น (ตัว/ลูกบาศก์เมตร)**
	เริ่มการทดลอง	**สิ้นสุดการทดลอง**			
		รอด	**ตาย**		
ควบคุม	960,000	775,000	185,000	7,915	121
สูตรที่ 1	500,000	500,000	0	2,306	216
สูตรที่ 2	500,000	492,000	8,000	2,943	169

ภาคผนวกที่ 6 คุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง

Day	DO			pH			Temp (°C)			NH_3			Nitrite		
	ctrl	exp.1	exp.2	ctrl	exp.1	exp.2	ctrl	exp.1	exp.2	ctrl	exp.1	exp.2	ctrl	exp.1	exp.2
1	7.5	3	4.5	7	7	7	25	25	26	0.25	0	0	0	0	0
2	7.5	6.5	5.5	7.3	7.3	7	26	26	25	0	0.25	0.25	0	0	0
3	7.5	5	5	7.3	7	7	26	26	26	0	0.25	0.25	0	0	0
4	7.5	4	5.5	7.3	7.3	7	24	26	26	0	0.25	0.25	0	0.05	0.05
5	7.5	4	5.5	7.3	7.3	7.6	23	26	26	0	0.25	0.25	0	0	0.1
6	7.5	5.5	6	7.3	7.3	7.3	23	23	25	0.25	0.25	0.25	0	0	0
7	7.5	6	4.5	7.3	7	7	23	22	22	0	0	0	0	0	0
8	7.5	5.5	4.5	7.3	7.6	7	21	21	22	0.25	0.25	0.25	0	0	0
9	7.5	4	4	7.3	7	7.3	21	21	21	0	0.25	0.25	0	0	0
10	7.5	4.5	4	7.3	7.3	7	21	22	21	0	0.25	0.25	0	0	0
11	5	4	4	7	7.3	7	22	21	22	0.25	0	0.25	0	0	0
12	5	3	3	7	7	7.3	23	22	21	0.25	0.25	0.25	0	0	0.05
13	7.5	2.5	2.5	7	7	7.3	23	23	22	0.25	0.25	0.25	0	0	0
14	5	3	2.5	7	7	7	24	23	23	0.25	0.25	0.25	0	0.05	0.05

หมายเหตุ

Ctrl; กลุ่มควบคุม, exp.1; กลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 1, exp.2; กลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 2

ข้อมูลเครื่องมือหรือชุดทดสอบที่ใช้ตรวจค่าคุณภาพน้ำ

DO; AQUA DO ชุดตรวจสอบออกซิเจนละลายน้ำ (บริษัท แอ๊ดวานซ์ ฟาร์มา จำกัด)

pH; AQUA VBC ชุดทดสอบความเป็นกรดด่าง

Temp (°C); SK SATO

NH_3; AQUA VBC ชุดทดสอบแอมโมเนีย

Nitrite; AQUA VBC ชุดทดสอบไนไตรต์

ภาคผนวกที่ 7 การวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี Oneway ANOVA โดยเปรียบเทียบน้ำหนักปลานิลเมื่อเริ่มการทดลอง ของกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 1 และกลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 2

Oneway

ANOVA

BW0

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.272E-03	2	6.362E-04	16.202	.000
Within Groups	4.712E-04	12	3.927E-05		
Total	1.744E-03	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: BW0
LSD

					95% Confidence Interval	
(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
500ppm	1000ppm	1.4000E-03	3.96E-03	.730	-7.23499E-03	1.0035E-02
	control	2.0200E-02*	3.96E-03	.000	1.1565E-02	2.8835E-02
1000ppm	500ppm	-1.4000E-03	3.96E-03	.730	-1.00350E-02	7.2350E-03
	control	1.8800E-02*	3.96E-03	.000	1.0165E-02	2.7435E-02
control	500ppm	-2.0200E-02*	3.96E-03	.000	-2.88350E-02	-1.15650E-02
	1000ppm	-1.8800E-02*	3.96E-03	.000	-2.74350E-02	-1.01650E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

ภาคผนวกที่ 8 การวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี Oneway ANOVA โดยเปรียบเทียบน้ำหนักปลานิลเมื่อสิ้นสุดการทดลองของกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 1 และกลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 2

Oneway

ANOVA

BW14

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.816E-02	2	9.079E-03	2.603	.115
Within Groups	4.186E-02	12	3.488E-03		
Total	6.002E-02	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: BW14
LSD

					95% Confidence Interval	
(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
control	500ppm	-2.5600E-02	3.74E-02	.506	-.10699	5.5788E-02
	1000ppm	-8.3200E-02*	3.74E-02	.046	-.16459	-1.81228E-03
500ppm	control	2.5600E-02	3.74E-02	.506	-5.57877E-02	.10699
	1000ppm	-5.7600E-02	3.74E-02	.149	-.13899	2.3788E-02
1000ppm	control	8.3200E-02*	3.74E-02	.046	1.8123E-03	.16459
	500ppm	5.7600E-02	3.74E-02	.149	-2.37877E-02	.13899

*. The mean difference is significant at the .05 level.

ภาคผนวกที่ 9 การวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี Oneway ANOVA โดยเปรียบเทียบน้ำหนักปลานิลที่เพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ของกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 1 และกลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 2

Oneway

ANOVA

BW140

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.276E-02	2	6.381E-03	1.601	.242
Within Groups	4.783E-02	12	3.986E-03		
Total	6.059E-02	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: BW140
LSD

					95% Confidence Interval	
(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
control	500ppm	-5.4000E-03	3.99E-02	.895	-9.23988E-02	8.1599E-02
	1000ppm	-6.4400E-02	3.99E-02	.133	-.15140	2.2599E-02
500ppm	control	5.4000E-03	3.99E-02	.895	-8.15988E-02	9.2399E-02
	1000ppm	-5.9000E-02	3.99E-02	.165	-.14600	2.7999E-02
1000ppm	control	6.4400E-02	3.99E-02	.133	-2.25988E-02	.15140
	500ppm	5.9000E-02	3.99E-02	.165	-2.79988E-02	.14600

ภาคผนวกที่ 10 การวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี Oneway ANOVA โดยเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average Daily Gain, ADG) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ของกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 1 และกลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 2

Oneway

ANOVA

ADG

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.173E-05	2	3.087E-05	1.572	.248
Within Groups	2.356E-04	12	1.963E-05		
Total	2.973E-04	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ADG
LSD

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
500ppm	1000ppm	-4.2000E-03	2.80E-03	.160	-1.03059E-02	1.9059E-03
	control	2.0000E-04	2.80E-03	.944	-5.90586E-03	6.3059E-03
1000ppm	500ppm	4.2000E-03	2.80E-03	.160	-1.90586E-03	1.0306E-02
	control	4.4000E-03	2.80E-03	.142	-1.70586E-03	1.0506E-02
control	500ppm	-2.0000E-04	2.80E-03	.944	-6.30586E-03	5.9059E-03
	1000ppm	-4.4000E-03	2.80E-03	.142	-1.05059E-02	1.7059E-03

ภาคผนวกที่ 11 การวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี Oneway ANOVA โดยเปรียบเทียบอัตราการแลกเนื้อ (Feed Conversion Ration, FCR) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ของกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 1 และกลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 2

Oneway

ANOVA

FCR

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.329	2	.164	11.060	.002
Within Groups	.178	12	1.487E-02		
Total	.507	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: FCR
LSD

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
control	500ppm	.29940*	7.71E-02	.002	.13137	.46743
	1000ppm	.32700*	7.71E-02	.001	.15897	.49503
500ppm	control	-.29940*	7.71E-02	.002	-.46743	-.13137
	1000ppm	2.7600E-02	7.71E-02	.727	-.14043	.19563
1000ppm	control	-.32700*	7.71E-02	.001	-.49503	-.15897
	500ppm	-2.7600E-02	7.71E-02	.727	-.19563	.14043

*. The mean difference is significant at the .05 level.

ภาคผนวกที่ 12 การวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี Oneway ANOVA โดยเปรียบเทียบร้อยละของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (%weight gain) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ของกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 1 และกลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 2

Oneway

ANOVA

WEIGHTG

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21528.77	2	10764.385	1.386	.287
Within Groups	93216.51	12	7768.042		
Total	114745.3	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: WEIGHTG
LSD

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
500ppm	1000ppm	-68.0592	55.7424	.246	-189.5115	53.3931
	control	-88.6610	55.7424	.138	-210.1133	32.7913
1000ppm	500ppm	68.0592	55.7424	.246	-53.3931	189.5115
	control	-20.6018	55.7424	.718	-142.0541	100.8505
control	500ppm	88.6610	55.7424	.138	-32.7913	210.1133
	1000ppm	20.6018	55.7424	.718	-100.8505	142.0541

ภาคผนวกที่ 13 การวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี Oneway ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าประสิทธิภาพของอาหาร (Feed efficiency) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ของกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 1 และกลุ่มทดลองอาหารผสมพรีมิกซ์ขมิ้นชันสูตรที่ 2

Oneway

ANOVA

FEEDEFFI

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.364	2	.182	6.476	.012
Within Groups	.337	12	2.807E-02		
Total	.700	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: FEEDEFFI
LSD

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	95% Confidence Interval Upper Bound
control	500ppm	-.36000*	.10597	.005	-.59088	-.12912
	1000ppm	-.28900*	.10597	.018	-.51988	-5.81177E-02
500ppm	control	.36000*	.10597	.005	.12912	.59088
	1000ppm	7.1000E-02	.10597	.516	-.15988	.30188
1000ppm	control	.28900*	.10597	.018	5.8118E-02	.51988
	500ppm	-7.1000E-02	.10597	.516	-.30188	.15988

*. The mean difference is significant at the .05 level.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย