

การนำสารสกัดสาหร่ายและพืชน้ำละลายในน้ำมันปาล์ม และน้ำมันออริกาโน่ เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

Vibrio parahaemolyticus ที่เป็นสาเหตุโรครกกุ้ง

Application of seaweed and aquatic plant extracts in palm oil and oregano oil for growth

inhibition of shrimp pathogen, *Vibrio parahaemolyticus*

ชนกนันท์ วัฒนະบุรณำพันธ์ (Chanoknan Wattanaburanapan)* ดร.นุจริน จรุงจา (Dr.Nujarin Jongruja)**

บทคัดย่อ

เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์สร้างสารพิษเป็นสาเหตุของโรครกกุ้งตายด่วนในกุ้งขาวแวนนาไม การระบาดของโรครกกุ้ง ทำให้การใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มกุ้งเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีสารตกค้างภายในตัวกุ้งและทำให้เกิดความเสี่ยงในการเกิดเชื้อดื้อยาเพิ่มขึ้นด้วย สารสกัดจากสาหร่ายและพืชน้ำสามารถควบคุมโรคและเหนี่ยวรั้งภูมิคุ้มกัน ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงได้ใช้สารสกัดจากสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) สาหร่ายคอมบุ (*Laminaria saccharina*) และพืชน้ำสาหร่ายหางกระรอก (*Hydrilla verticillata*) ละลายในน้ำมันปาล์มและน้ำมันออริกาโน่ เพื่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* โดยเทคนิค disc diffusion พบการยับยั้งสูงที่สุดจากสาหร่ายพวงองุ่นในน้ำมันออริกาโน่ และหลังจากตรวจสอบหาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายและพืชน้ำ จะทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบฟีนอลิกในสารสกัดสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) โดยวิธี GC-MS

ABSTRACT

Virulent strain of *Vibrio parahaemolyticus*, causes early mortality syndrome (EMS) in white leg shrimps with high mortality rate. Therefore, farmers normally use antibiotics in shrimp aquaculture. Antibiotics remain in shrimp and cause an antibiotic bacteria resistance in world wide. Aquatic feed industry attempt to add more additive ingredients into shrimp feed such as seaweed and aquatic plant extracts because these extracts may have antibacterial activity and can enhance immunity of shrimp. In this experiment, we use 3 extracts of *Caulerpa lentillifera*, *Laminaria saccharina*, and *Hydrilla verticillata*. Extracts were dissolved in palm oil and oregano oil to test the antibacterial activity by disc diffusion method. Antioxidant activity by DPPH and TPC assays were also examined. Phenolic compounds in *Caulerpa lentillifera* extract will be analyzed by GC-MS method.

คำสำคัญ: การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย การละลายสารสกัดในน้ำมันปรุงอาหาร สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Keywords: Antibacterial, Extract in cooking oils, Bioactive compound

*นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

**อาจารย์ สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

บทนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยมีความสำคัญมาก เนื่องจากเป็นอุตสาหกรรมหลักในการส่งออก กุ้งสด และกุ้งแปรรูปต่าง ๆ โดยมีอัตราการส่งออกนอกประเทศเป็นอันดับหนึ่งของโลกในปี 2009 (Food and Agriculture Organization of The United Nations, 2011) และมีมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นมาจนกระทั่งปี 2011 ผลกระทบ จากอุทกภัยและการระบาดของโรควุ้นตายด่วน (early mortality syndrome: EMS) ตั้งแต่ปลายปี 2010 ส่งผลให้ปริมาณ การผลิตกุ้งลดลง ทำให้ประเทศผู้ผลิตและส่งออกรายอื่น ๆ ที่ผลิตกุ้ง ได้มากกว่า มีมูลค่าการส่งออกกุ้งที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่ง โรคระบาดนี้มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ที่ทำให้อัตราการตายของกุ้งสูงถึง 100% ภายใน 30 วัน (Tran, 2013) โดยเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อโรคมียีนสร้างสารพิษบนพลาสมิด ที่สามารถ สร้างสารพิษทำลายเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้ง ซึ่งโดยปกติเชื้อจะสร้างสารพิษเฉพาะที่ในกระเพาะอาหารของกุ้ง แต่ การเกิดโรควุ้นตายด่วนจะมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียแบบกระจายไปทั่วตัวกุ้งหรือการติดเชื้อในกระแสเลือด ความรุนแรงของ โรคมะเร็งจะเกิดขึ้นเมื่อเชื้อแบคทีเรียปล่อยสารพิษออกมาทำลายเซลล์ตับ โดยการผลิตสารพิษจะถูกกระตุ้นหลังจาก แบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* เข้าไปจับกับเซลล์ของกุ้ง (Rongzhi Wang, 2015) ทุกอวัยวะของกุ้งจะมีเชื้อ แบคทีเรียปนเปื้อนอยู่ ในการศึกษาเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งที่ติดโรควุ้นตายด่วนจะพบว่า เซลล์ที่สะสมไขมันใน เซลล์ตับและตับอ่อนหายไป ในระยะสุดท้ายจะพบเชื้อแบคทีเรียอยู่เป็นจำนวนมากในตัวกุ้ง จากที่กล่าวมาข้างต้น การ ระบาดของโรควุ้นตายด่วนเกิดขึ้นมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 และยังไม่สามารถควบคุม กำจัดโรคระบาดนี้ได้จนถึงปัจจุบัน ทางออกของการกำจัดหรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ง่ายที่สุดคือการใช้ยาปฏิชีวนะ เพื่อยับยั้งการเจริญของ *Vibrio parahaemolyticus* ในบ่อเลี้ยงกุ้ง ถึงแม้ว่ายาปฏิชีวนะจะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ แต่ไม่ใช่แบคทีเรียทุกตัว จะโดนกำจัด ด้วยกลไกการปรับตัวของเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดการกลายพันธุ์และแบคทีเรียอื่น ๆ จะมียีนที่ต่อต้านยา ปฏิชีวนะได้ ซึ่งจะก่อให้เกิดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา โดยเหตุการณ์เหล่านี้จะเกิดขึ้นเมื่อผู้บริโภคได้รับสารตกค้างในตัวกุ้ง เข้าไปอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นในหลาย ๆ ประเทศจึงมีมาตรการการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างจำกัดในสัตว์บริโภค แต่ถึงอย่างนั้น ทุก ๆ ปี จะมีการตรวจพบการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะในอาหารทะเลส่งออก ดังเช่น ในปี 2017 องค์การอาหารและยา แห่งสหรัฐอเมริกาตรวจพบการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะในกุ้งที่นำเข้าจากประเทศไทยคิดเป็นร้อยละ 62.5 จากกุ้งที่มีการ ตรวจพบการปนเปื้อนทั้งหมด ส่งผลให้เกิดการติดกลับของสินค้าเป็นจำนวนมาก ดังนั้นนอกจากยาปฏิชีวนะจะส่งผลต่อ สุขภาพของผู้บริโภคแล้ว ยังส่งผลในระดับเศรษฐกิจอีกด้วย

การใช้สารสกัดสำหรับเพื่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมีมากกว่า 100 ปี เช่น ปี 1917 มีการใช้สารสกัดจาก สาหร่ายมาช่วยยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก และมีการศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำโดยใช้ สารสกัดจากสาหร่ายสีเขียว (Natrash, 2015), (Vijayakumar, 2012) และสาหร่ายสีน้ำตาล (Bansemir, 2006) เนื่องจาก สารสกัดของสาหร่ายบางชนิดเป็นสารจำพวก bioactive compound ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา โดยสาหร่ายที่พบเจอได้ง่าย มีจำนวนมากและนิยมนำมาประกอบอาหาร คือ สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) และสาหร่ายคอมบุ (*Larminarin saccharina*) และพืชน้ำที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย คือ สาหร่ายหางกระรอก

สาหร่ายพวงองุ่นเป็นสาหร่ายทะเลสีเขียว ที่อยู่ในแฟมิลี *Caulerpaceae* จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสาหร่ายสีเขียว ในแฟมิลี *Caulerpaceae* ซึ่งประกอบไปด้วย *Caulerpa racemosa* var. *clavifera* f. *macrophysa* (Kützting) Weber-van Bosse, *C. racemosa* var. *laetevirens* (Montagne) Weber-van Bosse, และ *Caulerpa lentillifera* J. Agardh มีองค์ประกอบของกรดไขมัน ชนิด Polyunsaturated fatty acids (PUFA) และสารรงควัตถุ caulerpin ที่มีคุณสมบัติเป็น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ช่วยยับยั้ง เชื้อแบคทีเรียที่เป็นปนเปื้อนในอาหาร ได้แก่ *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Salmonella* sp. (Nagappan, 2014)

สาหร่ายคอมบุเป็นสาหร่ายสีน้ำตาล ที่มีคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio anguillarum* ที่ก่อโรคในปลา ด้วยการวัด inhibition zone (mm) ที่เกิดขึ้นพบว่าสาหร่ายคอมบุมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (Bansemir, 2006) (Cox, 2010) และยังมีงานวิจัยรายงานว่าสาหร่ายคอมบุมีคุณสมบัติ anti-inflammation, anti-cancer, anti-viral (Dürig, 1997) (Ermakova, 2011) (Trincherro, 2009)

สาหร่ายหางกระรอกเป็นพืชน้ำชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในแฟมิลี *Hydrocharitaceae* ที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่หลายชนิดที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์บางชนิดได้และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ทำหน้าที่เข้าจับกับอนุมูลอิสระเพื่อหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชันลูกโซ่ ที่จะส่งผลให้เกิดความไม่เสถียรในเซลล์ และเกิดเป็นมะเร็งขึ้นได้ สารเหล่านั้นที่พบคือ Loliolide และ Thymidine (Yu Xiao, 2007) sesquiterpene compound (Coryan-17-ol, 18,19-didehydro-10-methoxy-acetate), Steroid compound (Ergost -5-en-ol, 22, 23-dimethyl acetate), plasticizer compound (1,2 Benzene dicarboxylic acid butyl octylester), Linoleic compound (10-Octadecenoic acid, methyl ester), Stearic acid (Pentadecanoic acid, 14-methyl, methyl ester) และ Phytol (Diterpene compound) (Kensa, 2016) จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารได้ คือ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* (Kumari, 2013)

ในอาหารเลี้ยงกุ้งจะประกอบไปด้วยสารอาหารหลักคือ แหล่งคาร์โบไฮเดรต แหล่งโปรตีน แหล่งไขมัน และวิตามิน เกลือแร่ต่าง ๆ โดยแหล่งวิตามิน เกลือแร่จะทำหน้าที่คล้ายกับอาหารเสริมที่จะช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโต ทำให้ลูกกุ้งสุขภาพดี แข็งแรง เพิ่มอัตราการรอดของกุ้งได้ อาหารเสริมที่เติมในอาหารกุ้งที่มักเป็นส่วนประกอบทั่วไปคือ น้ำมันปลาและน้ำมันออริกาโน ซึ่งน้ำมันทั้งสองชนิดนี้ได้รับการวิเคราะห์ว่ามีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้

น้ำมันปลาเป็นน้ำมันพืช ที่มีส่วนประกอบเป็นกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว (Oleic acid, Linoleic acid) (CPIAGROTECH, 2017) ผลิตได้จากผลปลาล้างน้ำมัน นิยมนำมาใช้ในการประกอบการทำอาหารประเภทต่าง ๆ เนื่องจากผลปลาล้างและเมล็ดผลปลาล้างมีน้ำมันอยู่ในปริมาณมาก และมีต้นทุนการผลิตต่ำ จุดเดือดสูง เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณวิตามินอีในน้ำมันปลาล้างกับน้ำมันพืชชนิดอื่น ๆ พบว่ามีปริมาณวิตามินอีสูง โดยองค์ประกอบวิตามินอีในน้ำมันปลาล้างที่พบคือ Tocopherol และ Tocotrienol สารทั้งสองชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Ng, 2002) ที่ช่วยยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันภายในเซลล์ของกุ้งได้

น้ำมันออริกาโนจัดเป็นน้ำมันพืชที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเปรียบเทียบกับความสามารถกับ α -tocopherol และภายในโครงสร้างของน้ำมันออริกาโนที่ซับซ้อนประกอบด้วยส่วนหลัก คือ terpene hydrocarbons และอนุพันธ์ของเบนซีน กิจกรรมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันออริกาโนสูง เนื่องจากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก อยู่จำนวนมาก (Teremina, 2011) นอกจากนี้น้ำมันออริกาโนจะมีประโยชน์ต่อมนุษย์แล้ว ยังมีผลต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ด้วย โดยมีการนำน้ำมันออริกาโนมาใช้เป็นส่วนประกอบหนึ่งอาหารสัตว์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเลี้ยงสัตว์ให้สูงขึ้น ลดการเกิดโรคในฟาร์มสัตว์เศรษฐกิจ ในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์น้ำที่มีส่วนผสมของน้ำมันออริกาโนเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิต ทำให้มีสุขภาพดีขึ้น ระดับภูมิคุ้มกันสูงขึ้น

ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงใช้สารสกัดจากสาหร่าย (สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) สาหร่ายคอมบุ (*Larminarin saccharina*)) และพืชน้ำ (พืชน้ำสาหร่ายหางกระรอก (*Hydrilla verticillata*)) ละลายในน้ำมันปลา และ

น้ำมันออริกาโน เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรครุ้งตายด่วน *Vibrio parahaemolyticus* และการวิเคราะห์หาองค์ประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งแบคทีเรีย และสารต้านอนุมูลอิสระ

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ด้วยสารสกัดสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) สาหร่ายคอมบุ (*Larminarin saccharina*) และพืชน้ำสาหร่ายหางกระรอก (*Hydrilla verticillata*)
2. เพื่อศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) สาหร่ายคอมบุ (*Larminarin saccharina*) และพืชน้ำสาหร่ายหางกระรอก (*Hydrilla verticillata*) ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ

วิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างในการทดลอง

สารสกัดสาหร่ายและสารสกัดพืชน้ำนำเข้าจากประเทศจีน ได้แก่ *Hydrilla verticillata*, *Laminarin saccharina* and *Caulerpa lentillifera* (CN Lab Nutrition, Asian group; Shaanxi Honghao Bio-tech Co., Ltd; Xi'an Aladdin Biological Technology Co., Ltd ตามลำดับ)

- น้ำมันปาล์มและน้ำมันออริกาโนจาก บริษัท BergaFat S-classic จำกัดและ บริษัท Biofine (Thailand) จำกัด

2. การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus*

การศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดสาหร่ายและสารสกัดพืชน้ำ ทำโดยวิธีการ disc diffusion โดยสารสกัดที่เตรียมมีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใส่สารละลายอย่างละ 20 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นทดสอบขนาด 6 มิลลิเมตร (Whatman Article No., 28418660 (US reference)) จากนั้นวางแผ่นทดสอบลงบนหน้าอาหาร TCBS ที่มีการป้ายเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ไว้แล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง แล้วบันทึกค่าการยับยั้งด้วยการวัดบริเวณ clear zone (มิลลิเมตร) ที่เกิดขึ้น

3. การยืนยันสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

การยืนยันสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* จะใช้วิธีการทดสอบด้วยเทคนิค Colony PCR โดยจะทำการเลือกโคโลนีของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สารพันธุ์ที่สร้างสารพิษขึ้นมาใส่ใน master mix และใส่ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบมาจำเพาะต่อยีนที่สร้างสารพิษของเชื้อ (Tox A gene และ Tox B gene) ที่สภาวะ initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที, Denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Annealing ที่ 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Extension ที่ 65 องศาเซลเซียส 1 นาทีต่อกิโเบส และ Final Extension ที่ 65 องศาเซลเซียส 1 นาทีต่อกิโเบส

ToxA gene primer

Forward 5' GGAATTC CATATG AGT AAC AAT ATA AAA CAT GAA ACT GAC TAT TCT CAC 3'

Reverse 5'GC GGATCC TTA GTG GTA ATA GAT TGT ACA GAA ACC ACG ACT 3'

ToxB gene primer

Forward 5' GGAATTC CATATG ACT AAC GAA TAC GTT GTA ACA ATG TCA TCT 3'

Reverse 5'GC GGATCC CTA CTT TTC TGT ACC AAA TTC ATC GGG 3'

4. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่าย

การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายและพีชน้ำ จะใช้หลักการของ DPPH assay เป็นการกำจัดสารอนุมูลอิสระในระบบ โดยการเติมอิเล็กตรอนให้แก่สารอนุมูลอิสระ ให้เกิดความเสถียรภายในโมเลกุล และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายที่ทำการทดสอบ ในการทดสอบนี้มีการดัดแปลงมาจาก (Thomas, 2014) โดยใช้สารอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ที่จะมีสีม่วง เมื่อเกิดปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลายจะอ่อนลงหรือกลายเป็นสีเหลือง ซึ่งจะนำสารละลายสาหร่ายและพีชน้ำ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ลงไปใน 500 ไมโครลิตรของสารละลาย DPPH ที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ หลังจากบ่มในที่มืด 15 นาที จากนั้นจะนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้น้ำผสมกับสารละลาย DPPH เป็นตัวอ้างอิง ในขณะที่ใช้เทานอลผสมกับสารละลาย DPPH และกรดแอสคอบิกผสมกับสารละลาย DPPH เป็นตัวควบคุมในการทดลอง และใช้การคำนวณหาร้อยละกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระดังสมการ

$$AA; \% = (1 - (\text{Abs}_{\text{control}} - (\text{Abs}_{\text{Sample}} - \text{Abs}_{\text{Blank}})) / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100\%$$

5. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด

สารสกัดจากพีชน้ำจะพบสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบภายใน และสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดจะมีคุณสมบัติเป็นสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถที่จะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหรือมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ ดังนั้นจึงทำการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดทั้ง 3 ชนิดตามวิธีของ (Fu C., 2016) โดยใช้สารละลายตัวอย่าง 500 ไมโครลิตรลงใน Folin-Ciocalteu's reagent (ทำการเจือจาง 10 เท่า) หลังจากผ่านไป 4 นาที จะเติม 7.5% (w/v) sodium carbonate ลงไปและบ่มในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร สารมาตรฐานคือ gallic acid

6. การวิเคราะห์ชนิดสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดสาหร่ายงุ่น

ทำการวิเคราะห์ชนิดสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดสาหร่ายงุ่นด้วยวิธี GC-MS โดยทำการวิเคราะห์ฟีนอลิกด้วยเครื่อง Gas Chromatograph-Mass Spectrometer (AGILENT 5) คอลัมน์ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 250 ไมโครเมตร หนา 0.25 ไมโครเมตร อุณหภูมิในคอลัมน์ 325 องศาเซลเซียส โดยฉีดสารละลายตัวอย่างเข้มข้น ปริมาตร 2 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง gas chromatography ความดัน 5.1734 psi อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิโปรแกรมคือ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 2 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนอุณหภูมิถึง 240 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 40 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนอุณหภูมิถึง 280 องศาเซลเซียส

ผลการวิจัย

1. การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus*

การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ด้วยเทคนิค disc diffusion พบว่าสารสกัดสาหร่ายทั้งสองชนิด และสารสกัดของพีชน้ำสาหร่ายหางกระรอกมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้แตกต่างกันในแต่ละตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยรูปที่ 11 แสดงตัวอย่างส่วนใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดสาหร่ายงุ่นในสารละลายน้ำมันออริกาโน

ตารางที่ 1 ค่าการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ของสาหร่ายคอมบุ (*Laminaria saccharina*) ที่ละลายในตัวทำละลายในระดับการเจือจางแตกต่างกัน โดยทั่วไปการวัด inhibition zone หรือ clear zone จะทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้น (เป็นมิลลิเมตร) โดยวัดคร่อม disc ด้วยการวัดจะวัดทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิด แล้วมักจะใช้สูตรคำนวณดังนี้ ค่า inhibition zone = [(เส้นผ่าศูนย์กลางรวมโซนใส) - (เส้นผ่าศูนย์กลางของแผ่น disc)] / (เส้นผ่าศูนย์กลางของแผ่น disc)

สารละลาย	ค่าการยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของสารละลายแต่ละความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)							
	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10	20
เอทานอล	0	0	0	0	0	0	0	0
น้ำมันปาล์ม	0.05	0.8	0.3	0.55	0.6	0.3	0.865	0.79
น้ำมันออริกาโน่	0.425	1.55	1.5	1.8	0.075	0.045	1.15	1.85

ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสาหร่ายคอมบุโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่าในตัวทำละลายเอทานอล ไม่เกิดการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* แต่ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำมันทั้งสองชนิดเกิดการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียขึ้น ในสารละลายน้ำมันชนิดที่หนึ่ง น้ำมันปาล์มเกิดการยับยั้งแบคทีเรียได้มากที่สุดที่ 0.865 มิลลิเมตร ในความเข้มข้นที่ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายน้ำมันชนิดที่สอง น้ำมันออริกาโน่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียที่ความเข้มข้นที่ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าการยับยั้งที่ 1.85 มิลลิเมตร

ตารางที่ 2 ค่าการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ของสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) ที่ละลายในตัวทำละลายในระดับการเจือจางแตกต่างกัน โดยทั่วไปการวัด inhibition zone หรือ clear zone จะทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้น (เป็นมิลลิเมตร) โดยวัดคร่อม disc ด้วยการวัดจะวัดทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิด แล้วมักจะใช้สูตรคำนวณดังนี้ ค่า inhibition zone = [(เส้นผ่าศูนย์กลางรวมโซนใส) - (เส้นผ่าศูนย์กลางของแผ่น disc)] / (เส้นผ่าศูนย์กลางของแผ่น disc)

สารละลาย	ค่าการยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของสารละลายแต่ละความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)							
	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10	20
เอทานอล	0	0	0	0	0	0	0	0
น้ำมันปาล์ม	0	0.075	0.356	0.49	0.065	0.6	0.7	0.65
น้ำมันออริกาโน่	1.065	1.78	1.15	1.95	2.25	0.95	2.65	2.05

ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสาหร่ายคอมบุโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่าในตัวทำละลายเอทานอล ไม่เกิดการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* แต่ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำมันอีกสองชนิดเกิดการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียขึ้น สารละลายน้ำมันชนิดที่หนึ่งคือน้ำมันปาล์มเกิดการยับยั้งแบคทีเรียได้มากที่สุดที่ 0.75 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายน้ำมันชนิดที่สอง น้ำมันออริกาโน่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียที่ความเข้มข้นที่ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีส่วนที่เกิดการยับยั้งเท่ากับ 2.65 มิลลิเมตร

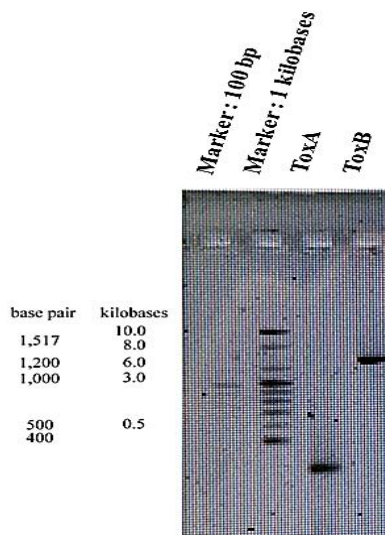
ตารางที่ 3 ค่าการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ของพืชน้ำสาหร่ายหางกระรอก (*Hydrilla verticillata*) ที่ละลายในตัวทำละลายในระดับการเจือจางแตกต่างกัน โดยทั่วไปการวัด inhibition zone หรือ clear zone จะทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้น (เป็นมิลลิเมตร) โดยวัดคร่อม disc ด้วยการวัดจะวัดทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยของสารออกฤทธิ์แต่ละชนิด แล้วมักจะใช้สูตรคำนวณดังนี้ ค่า inhibition zone = [(เส้นผ่าศูนย์กลางรวมโซนาไล) - (เส้นผ่าศูนย์กลางของแผ่น disc)] / (เส้นผ่าศูนย์กลางของแผ่น disc)

สารละลาย	ค่าการยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของสารละลายแต่ละความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)							
	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10	20
เอทานอล	0	0	0	0	0	0	0	0
น้ำมันปาล์ม	0	0	0.2	0	0.025	0	0.365	0.215
น้ำมันออร์กานโอ	1.5	1.55	0.65	0.55	0.55	0.55	0	0.025

ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสาหร่ายคอมบุโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่าในตัวทำละลายเอทานอลไม่เกิดการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* แต่ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำมันทั้งสองชนิดเกิดการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียขึ้น โดยในสารละลายน้ำมันชนิดที่สาม เกิดการยับยั้งแบคทีเรียสูงที่สุดที่ความเข้มข้นที่ต่ำคือ 1.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ในทางกลับกันในสารละลายน้ำมันอีกชนิดนั้นมีการยับยั้งที่เกิดขึ้นต่ำกว่ามาก โดยในสารละลายน้ำมันชนิดที่สอง น้ำมันปาล์มเกิดการยับยั้งอยู่ที่ 0.365 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าการยับยั้งที่สูงที่สุดของความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การยืนยันสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

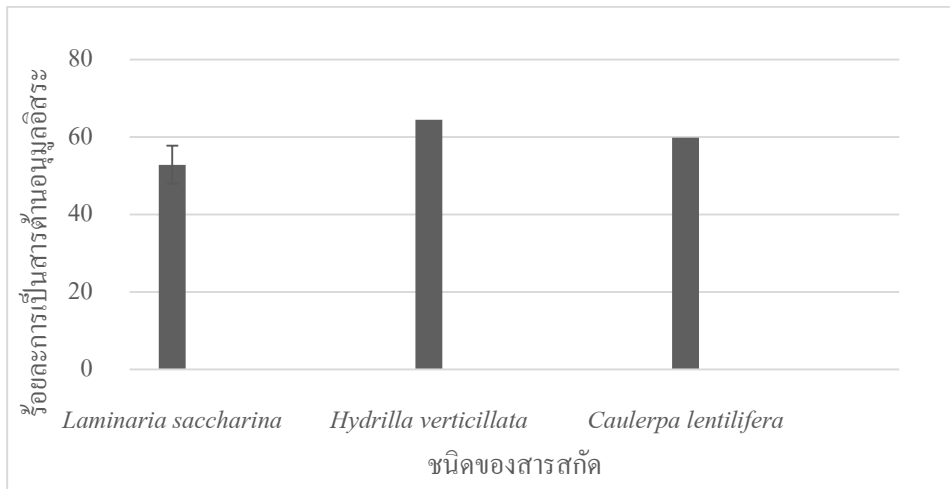
การตรวจสอบสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* โดยใช้เทคนิค colony PCR พบว่าเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ใช้ในการงานวิจัยชิ้นนี้เป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ สาเหตุของโรค EMS ในกุ้ง โดย ToxA และ ToxB เป็นยีนสร้างสารพิษบนสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ มีขนาดเท่ากับ 335 bp และ 1,317 Kbp ตามลำดับ



รูปที่ 1 ขนาดของยีนสร้างสารพิษของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

3. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายสามชนิด

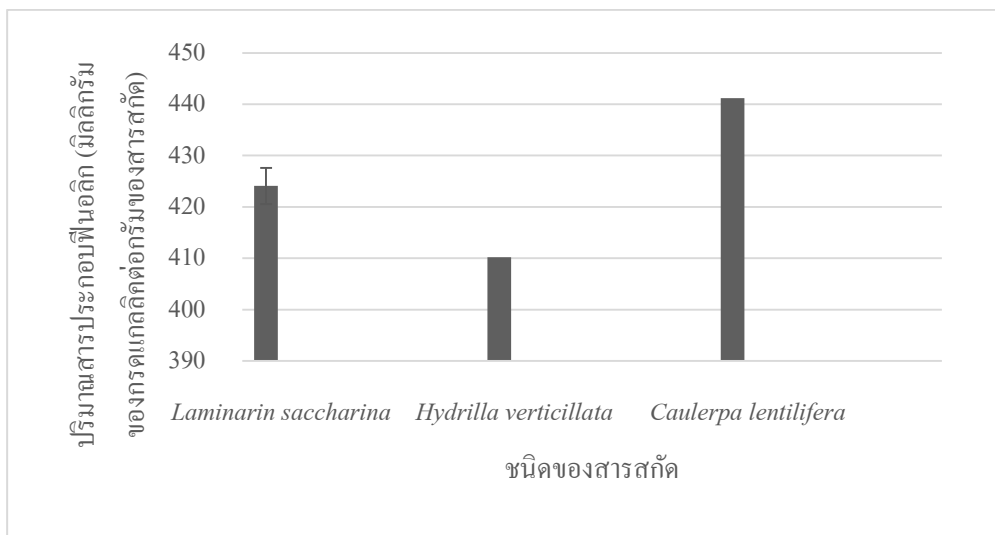
จากการทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายทั้งสามชนิด พบว่าสาหร่ายทั้งสามชนิด แสดงคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสาหร่ายคอมบุ (*Laminaria saccharina*) และสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) มีร้อยละการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 52.86 ± 4.93 และ 59.86 ± 4.36 ตามลำดับ สำหรับสาหร่ายหางกระรอก (*Hydrilla verticillata*) มีร้อยละการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอยู่ที่ 64.48 ± 10.68



รูปที่ 2 คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายสามชนิดและพืชน้ำ

4. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสาหร่าย

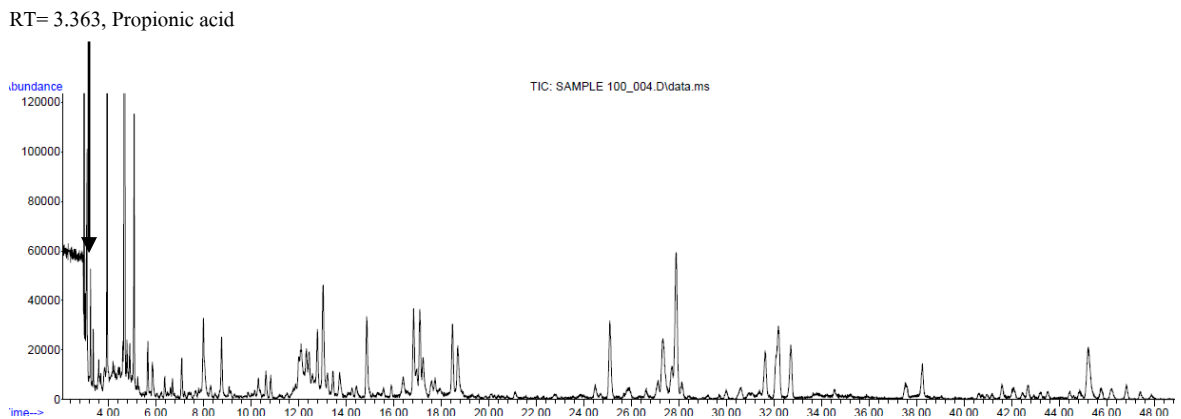
การวิเคราะห์ห่อหุ้มประกอบของฟีนอลิกในสาหร่ายทั้งสามชนิด พบว่าสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) มีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุดที่ 441.20 ± 1.28 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสาหร่าย สาหร่ายคอมบุ (*Laminaria saccharina*) และสาหร่ายหางกระรอก (*Hydrilla verticillata*) มีปริมาณฟีนอลิกที่ 424.07 ± 3.54 และ 410.19 ± 2.88 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสาหร่าย ตามลำดับ



รูปที่ 3 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสาหร่ายสามชนิดและพืชน้ำ

5. การวิเคราะห์ชนิดสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดสาหร่ายงุ่น

การวิเคราะห์ชนิดสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดสาหร่ายงุ่นด้วยเครื่อง Gas Chromatograph-Mass Spectrometer พบองค์ประกอบทางเคมีทั้งหมด 68 ชนิด และเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi* ได้ (Saori, 2011) คือ กรดอินทรีย์ Propanoic โดยสารออกมาที่ RT = 3.363 นาที



รูปที่ 4 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดสาหร่ายงุ่น พบสารประกอบของ propionic acid ที่ RT=3.363 นาที

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

งานวิจัยเกี่ยวกับการใช้สารสกัดจากสาหร่ายเพื่อประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ อาทิเช่น อาหาร ยา อาหารสัตว์ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย การยับยั้งเชื้อรา การยับยั้งเชื้อไวรัส การป้องกันการอักเสบ อีกทั้งยังส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันและระบบประสาทได้อีกด้วย (Mayera, 2002) จากผลการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* พบว่าเกิดการยับยั้งมากที่สุดในสารสกัดสาหร่ายงุ่นในน้ำมันออริกานอล โดยปกติองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันออริกานอลมีสารที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของสัตว์น้ำอย่างมีนัยสำคัญคือ carvacrol และ thymol (Z.L. Zheng, 2009) อีกทั้งยังมีงานวิจัยที่สนับสนุนว่าการใช้น้ำมันออริกานอลเป็นส่วนผสมในอาหารกุ้งเพื่อใช้เลี้ยงมีผลต่อปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* sp. (*V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae*) (M. H. Gracia-Valenzuela, 2014)

จากการวิเคราะห์สารประกอบปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดทั้งสามชนิดในเชิงปริมาณและการวิเคราะห์สารประกอบ ฟีนอลิกเชิงคุณภาพ เพื่อนำสารสกัดไปใช้ผสมกับอาหารกุ้งในการทดลองในสัตว์ทดลองต่อไปในอนาคต ผลการทดลองพบปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุดในสารสกัดสาหร่ายงุ่น และวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบสารอินทรีย์ propanoic acid โดยสารชนิดนี้ได้รับการรายงานว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ก่อโรคเรืองแสงในกุ้งในระดับห้องปฏิบัติการ (Saori, 2011) ยิ่งไปกว่านั้นสารอินทรีย์ชนิดนี้ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (Lysozyme (*Lys*), Crustin (*Cru*), Penaeidin-3a (*Pen-3a*), Prophenoloxidase (*proPo*)) ในกุ้งขาวแวนนาไม่ให้เพิ่มขึ้นด้วย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือ และคำแนะนำจากคณาจารย์ จึงใคร่ขอขอบพระคุณ ดร. นุจริน จรุงจา อาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการวิจัย ผศ.ดร. ไตรวิทย์ รัตนโรจน์พงศ์ และ ดร. จิรายุส เอื้อนรเศรษฐ์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ด้านเทคนิคทางห้องปฏิบัติการและทางด้านวิชาการ ขอขอบคุณ บริษัท ชรรมวิถิ จำกัด และ บริษัท โกลาฟีด จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัยและเครื่องมือในการทำการทดลอง ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

- Bansmir A. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture* 2006; 252(1): 79–84.
- Cox S. An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *International Food Research Journal* 2010; 17: 205-220.
- Cpiagrotech. น้ำมันปลา ลืม คือ ? [ออนไลน์] 2017[อ้างเมื่อ 5 มิถุนายน 2561]. จาก <http://www.cpiagrotech.com/knowledge-034/>
- Dürig J. Anticoagulant Fucoidan Fractions from *Fucus vesiculosus* Induce Platelet Activation in Vitro. *Thrombosis Research* 1997; 85(6): 479-491.
- Ermakova S. Fucoidans from Brown Seaweeds *Sargassum hornery*, *Eclonia cava*, *Costaria costata*: Structural Characteristics and Anticancer Activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2011; 164(6): 841-850.
- Food and Agriculture Organization of The United Nations. Fishery and aquaculture statistics yearbook 2009. Rome: Office of Knowledge Exchange, Research and Extension Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2011.
- Fu CWF. Extraction of phenolic antioxidants from four selected seaweeds obtained from Sabah. *International Food Research Journal* 2016; 23: 2363-2369.
- Kensa VM. GC-MS Determination of Bioactive Constituents of *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. Collected from Unpolluted and Polluted Water Sources. *Asian Journal of Biology* 2016; 1(1): 1-6.
- Kumari M. In vitro Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of Three Aquatic Plants. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 2013; 38(4): 233-239.
- Gracia-Valenzuela MH. Antimicrobial effect of dietary oregano essential oil against *Vibrio* bacteria in shrimp. *Archives of Biological Sciences* 2014; 66 (4); 1367-1370.
- Mayera AMS. Marine pharmacology in 1999: compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities affecting the cardiovascular, endocrine, immune and nervous systems, and other misc. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2002; 132(3); 315-39.
- Nagappan T. Nutritional and bioactive properties of three edible species of green algae, genus *Caulerpa* (*Caulerpaceae*). *Journal of Applied Phycology* 2014; 26(2): 1019–1027.

- Natrah FMI. Antibacterial Activities of Selected Seaweed and Seagrass from Port Dickson Coastal Water against different Aquaculture Pathogens. *Sains Malaysiana* 2015; 44(9): 1269–1273.
- Ng WK. Potential of palm oil utilisation in aquaculture feeds. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 2002; 11(7): 473–476
- Rongzhi W. The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*. *frontier Microbiology* 2015; 144(5,6): 1-43.
- Saori M. Effect of Organic Acids on Shrimp Pathogen, *Vibrio harveyi*. *Current Microbiology* 2011; 63(1): 1-7.
- Terenina MB. Oregano Essential Oil as an Inhibitor of Higher Fatty Acid Oxidation. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2011; 47(4): 490-494.
- Thomas J. Antioxidant and antibacterial activity of *Chaetomorpha antennina* against shrimp pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture* 2014; 433: 467–475.
- Tran LH. Determination, Characterization, and Control Measures of the agent causing early mortality syndrome (EMS) also known as acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) in farmed penaeid shrimp. The University of Arizona 2013; 28-52.
- Trincherro J. Antiretroviral Activity of Fucoidans Extracted from the Brown Seaweed *Adenocystis utricularis*. *Phytotherapy Research* 2009; 23(5): 707-712.
- Vijayakumar P. In Vitro Screening of Antibacterial Activity of Green Seaweed (*Chetomorpha Linum*) Against Fish Bacterial Pathogens. *International Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine* 2012; 2(3): 593-597.
- Yu X. Chemical Composition of *Hydrilla Verticillata* (L. f.) Royle in Taihu Lake. *Chinese Journal of Chemistry* 2007; 25(5): 661-665.
- Zheng ZL. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 2009; 292; 214–218.