



ประสิทธิภาพของสารสกัดสิรินธรวัลลีต่อความต้านทานเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

Efficacy of *Bauhinia sirindhorniae* on Resistance to Against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ณัฐฐา นิธิกุลวรวงษ์^{1*}

Nudtha Nithikulworawong

¹ สาขาการประมง คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์และวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วิทยาเขตหนองคาย

*Correspondent author: nudtha.n@nkc.kku.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรสิรินธรวัลลีที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล โดยใช้ดอกและใบของสิรินธรวัลลีที่สกัดด้วยอะซิโตน และเอทานอลความเข้มข้น 95% ด้วยวิธี disc-diffusion และการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* (Minimum Inhibitory Concentration: MIC และ Minimum Bactericidal Concentration: MBC) โดยวิธี broth dilution พบว่า สารสกัดจากใบที่ใช้เอทานอลความเข้มข้น 95% เป็นตัวทำลายมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ได้สูงที่สุดโดยพบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่มีการยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) เท่ากับ 15.53 ± 0.65 มิลลิเมตร และค่า MIC อยู่ที่ระดับความเข้มข้น 1,562.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่มีระดับความเข้มข้นใดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ผลของการศึกษาความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในลูกปลานิล หลังจากการให้อาหารผสมสารสกัดใบสิรินธรวัลลีพบว่า น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลานิลไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างชุดทดลอง ($P > 0.05$) ปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัด 1 % มีอัตราการตายต่ำสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($P < 0.05$) และมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ของปลา (RPS) สูงสุด

Abstract

The studies on antibacterial activity of crude extract from *Bauhinia sirindhorniae* against *Streptococcus agalactiae* were conducted by using leaves and flowers of *B. sirindhorniae* extracted by acetone and ethanol 95%. Antibacterial activity, performed by disc-diffusion method, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) for *B. sirindhorniae* extracts were determined by broth dilution method. The results revealed that the highest activity against *S. agalactiae* was found in leaves extract using of ethanol 95% with inhibition zone of 15.53 ± 0.65 mm and the MIC value against *S. agalactiae* was 1,562.5 mg/l. The determination of MBC was not observed in any concentration of *B. sirindhorniae* extracts. Additionally,

supplementation of leaves extract of *B.sirindhorniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diet was also conducted to investigate the effect on resistance to *S. agalactiae*. The results showed that weight gain and specific growth rate were not significantly difference ($P>0.05$). Fish fed with 1% extract had significantly lowest mortality ($P<0.05$) and had highest relative percentage survival (RPS).

คำสำคัญ: สิริธรวัลลี *Streptococcus agalactiae* ความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย ความต้านทานโรค ปลานิล

Keywords: *Bauhinia sirindhorniae*, *Streptococcus agalactiae*, Antibacterial activity, Disease resistance, Nile tilapia

1. บทนำ

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*, Linn) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งของไทย ซึ่งมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ นับตั้งแต่ปี 2508 เป็นต้นมา จากคุณสมบัติของปลานิล ซึ่งเลี้ยงง่ายเจริญเติบโตเร็ว และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ทำให้เกษตรกรนิยมเลี้ยงปลานิลอย่างกว้างขวาง ปัจจุบันมีผลผลิตจากการเลี้ยงปลานิลประมาณ 200,000 ตันต่อปี มูลค่าประมาณ 7,900 ล้านบาทต่อปี (คิดที่ราคาเฉลี่ย กิโลกรัมละ 39.32 บาท) และปริมาณการเลี้ยงปลานิลคิดเป็น 30.0% ของปริมาณการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดทั้งหมดของไทย ส่วนมูลค่าของปลานิลนั้นคิดเป็น 20.0% ของมูลค่าการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดทั้งหมด ผลผลิตปลานิล 70.0% ของปริมาณการผลิตปลานิลทั้งหมดบริโภคภายในประเทศ ปัจจุบันไทยมีศักยภาพสูงด้านการผลิตปลานิล ประกอบกับทิศทางการบริโภคปลานิลที่ขยายตัวของตลาดโลก โดยเฉพาะตลาดในประเทศสหรัฐอเมริกา และยุโรปมีความนิยมรับประทานเมนูปลามากขึ้นและสนใจปลานิลไทยเช่นกัน จากความต้องการบริโภคปลานิลมากขึ้น ทำให้ธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลานิลมีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น รูปแบบการเลี้ยงที่หนาแน่นมากขึ้น ประกอบกับการจัดการของเกษตรกรผู้เลี้ยงที่ยังไม่ดีพอ จึงทำให้เกษตรกรมักประสบปัญหาที่เกิดจากโรคระบาด โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย เช่น โรค Streptococcosis ที่เกิดจากแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* (1) ซึ่งส่งผลกระทบต่อธุรกิจเพาะเลี้ยงปลานิลอย่างมาก โดยในการแก้ปัญหาดังกล่าวเกษตรกรผู้เลี้ยงมักมีการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมี ซึ่งการแก้ปัญหาโดยวิธีดังกล่าว นั้น เกษตรกรบางส่วนยังขาดความรู้ความเข้าใจในการใช้

ยาปฏิชีวนะและสารเคมี จึงทำให้การรักษาไม่ได้ผลเท่าที่ควร นอกจากนี้ยังสามารถเกิดผลเสียตามมาเช่น ปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย ปัญหาการตกค้างของยาในเนื้อปลาและสิ่งแวดล้อมซึ่งส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค จากปัญหาดังกล่าวจึงทำให้เกิดความพยายามที่จะหาสิ่งอื่นที่สามารถใช้แทนยาปฏิชีวนะ สิ่งหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบันคือ พืชสมุนไพร ซึ่งจัดเป็นพืชที่สามารถหาได้ตามธรรมชาติ หรือสามารถปลูกได้เอง และพืชสมุนไพรส่วนใหญ่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยจากการที่มีการใช้รักษาโรคในคน หรือสัตว์ต่างๆเป็นเวลานานรวมถึงได้รับการยืนยันทางวิชาการว่าสามารถใช้ป้องกันและรักษาโรคในคน และสัตว์ต่างๆ และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา และไวรัส ได้อีกด้วย (2)

สิริธรวัลลี (*Bauhinia sirindhorniae*) หรือชื่อพื้นเมืองว่า สามสิบสองประดง จัดเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่น่าสนใจและที่สำคัญยังเป็นสมุนไพรท้องถิ่นของจังหวัดหนองคาย (3) สิริธรวัลลีเป็นไม้เถาเนื้อแข็ง ขนาดใหญ่ ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยวเรียงเวียนสลับ หลังใบเขียวเข้มเป็นมัน ท้องใบเกลี้ยง ดอกออกเป็นช่อ กลีบดอกสีเหลืองอมส้มถึงแดงมี 5 กลีบ ผลเป็นฝักแบนรูปขอบขนานเมล็ดสีน้ำตาลดำรูปกลมขนาดเล็ก พืชชนิดนี้มีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพรไทย เมื่อนำมาตากแห้งแล้วนำไปต้มจะแก้ปวดตามข้อ ตามเส้น ถ้านำดอกมาตากแห้งแล้วนำไปผสมกับน้ำใช้ทาสำหรับรักษาฝีหนอง ใช้บำรุงรักษาระบบประสาท สมอและการไหลเวียนของโลหิตในร่างกายป้องกันโรคความดันและโรคเบาหวาน

เมื่อนำไปผสมกับสมุนไพรตัวอื่น นอกจากนี้สารสกัดจากใบ ลำต้น และรากมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *Bacillus subtilis* ส่วนรากและลำต้นมีฤทธิ์ยับยั้ง *B.subtilis* และ *Staphylococcus aureus* (4) และยังมีการศึกษาแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดรากและลำต้นของ สิรินครวัลลีซึ่งพบสารบริสุทธิ์ 15 ชนิด และพบว่ามีสารบริสุทธิ์ 5 ชนิดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ (2S)-eriodictyol, isoliquiritigenin, isoliquiritigenin 4-methyl ether, (2S)-naringenin และ luteolin (5) แต่การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสิรินครวัลลีที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ ยังพบว่ามีฤทธิ์น้อยมาก ดังนั้นจากคุณสมบัติของสิรินครวัลลีดังกล่าว การวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสิรินครวัลลีในการยับยั้งแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่ก่อโรคในปลานิล โดยผลการศึกษาที่ได้จะเป็นแนวทางในการนำสมุนไพรมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดนี้ ซึ่งจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับเกษตรกรในการใช้พืชสมุนไพรในท้องถิ่น เพื่อการรักษาโรคและยังเป็นการลดการใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์น้ำซึ่งจะส่งผลให้เกิดการลดต้นทุนการผลิต เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

2. วิธีวิจัย

2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากสิรินครวัลลี

นำส่วนดอกบานและใบแก่ของสิรินครวัลลี มาบดให้ละเอียดและนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเพื่อเป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลาย นำสิรินครวัลลีมาแช่ในตัวทำละลายได้แก่ อะซิโตน และเอทานอลความเข้มข้น 95% ในอัตราส่วน 1:6 (W/V) ปิดฝาให้แน่น แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองแล้วนำส่วนใสไปกลั่นระเหยด้วยเครื่อง Evaporator จนได้สารสกัดหนืด เก็บสารสกัดหยาบไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ทดสอบ

2.2 การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการปั่นล้างแบคทีเรียที่ได้ด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ ที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที รอบละ 15 นาที ทั้งหมด 3 รอบ จากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายแบคทีเรียให้มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิเมตร โดยการวัดค่า Optical density (OD) เท่ากับ 0.15 ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสิรินครวัลลี

โดยวิธี disc-diffusion

ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสิรินครวัลลีโดยวิธี disc-diffusion (6) โดยใช้ก้านพันสำลี (cotton swab) ปลอดเชื้อจุ่มลงไปในการละลายแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ปรับความเข้มข้นไว้แล้ว กดและบิด cotton swab กับข้างหลอดทดลอง แล้วกวาดเชื้อ (swab) ให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) ให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 3 - 5 นาที เพื่อให้ส่วนผิวน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง จากนั้นหยดสารสกัดสิรินครวัลลีที่ละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบน paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร/แผ่น แล้วนำไปวางบนจานเพาะเชื้อ TSA ที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (inhibition zone) หน่วยเป็นมิลลิเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับตัวควบคุมใช้ตัวทำละลายของสารสกัดแต่ละชนิดหยดลงบน paper disc และดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองด้วยสารสกัดสิรินครวัลลี

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด ลิรินทรวัลลีโดยการหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และค่า Minimal Bactericidal Concentration (MBC) โดยวิธี broth dilution

ทำการศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยการเจือจางสารสกัดให้มีความเข้มข้นลดลงทุก 2 เท่า (Two-fold serial dilution) ในหลอดทดลอง (6) จากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อ *S. agalactiae* ที่ปรับความเข้มข้นไว้แล้วปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดทดลองนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจผลการทดลองโดยสังเกตความขุ่นของสารละลายในแต่ละหลอด และพิจารณาหลอดทดลองที่สารละลายยังใสอยู่ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดต่ำที่สุด โดยเทียบกับหลอดควบคุม และถือว่าที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (ค่า MIC) จากนั้นนำสารละลายจากหลอดทดลองที่ยังใสทุกหลอดมาทำการตรวจสอบค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำสุดที่เชื้อถูกฆ่าตายหมด (ค่า MBC) โดยการนำสารละลายดังกล่าวมาเชื้อแบบ spread plate ลงบนอาหาร TSA แล้วนำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบผลการทดลองโดยพิจารณาจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่พบการเจริญของเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด

2.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด ลิรินทรวัลลีต่อความต้านทานเชื้อ *Streptococcus* *agalactiae* ในลูกปลานิล

2.5.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำลูกปลานิลน้ำหนักประมาณ 2 กรัม ค่อดัว จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดหนองคาย อ. ศรีเชียงใหม่ จ.หนองคาย มาปรับสภาพก่อนการทดลองโดยการพักไว้ในบ่อซีเมนต์ ที่สาขาประมงมหาวิทยาลัยขอนแก่น วิทยาเขตหนองคาย ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง เวลา 08.00 น. และ 17.00 น. และให้อากาศตลอดเวลา เป็นเวลานาน 1 สัปดาห์

2.5.2 การเตรียมอาหารและการให้อาหาร

เลือกใช้สารสกัดจากส่วนดอกหรือใบลิรินทรวัลลีที่ได้จากตัวทำละลายที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ได้ดีที่สุดมาเป็นสารสกัดเพื่อใช้ในการทดสอบ หลังจากนั้นทำการเตรียมสารสกัดลิรินทรวัลลีตามวิธีการข้างต้น แล้วฉีดพ่นบนอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำ แล้วผึ่งให้แห้งในที่ร่มนาน 24 ชั่วโมง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดำเนินการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design: CRD) ทำการทดลองในตู้กระจกขนาด 45x90x45 เซนติเมตร บรรจุน้ำ 150 ลิตรต่อตู้ โดยใช้น้ำบาดาลที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว จำนวน 12 ตู้ คัดลูกปลานิลน้ำหนักเฉลี่ย 2.37 ± 0.29 กรัมต่อตัว จำนวน 30 ตัวต่อตู้ แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ตู้ ดังนี้ ชุดควบคุมให้ปลานิลกินอาหารเม็ดสำเร็จรูปปกติที่ฉีดพ่นด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% และชุดการทดลองที่ให้ปลานิลกินอาหารผสมสารสกัดลิรินทรวัลลีที่ระดับความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1.0% ตามลำดับ ให้อาหารกินจนอิ่ม วันละ 2 เวลา เช้า – เย็น เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ในระหว่างการทดลองทำการชั่งน้ำหนักของปลาทุก 2 สัปดาห์ และบันทึกอัตราการรอด ทำการเตรียมอาหารผสมสารสกัดใหม่ทุก 2 สัปดาห์

2.5.3 การทดสอบความต้านทานเชื้อ

S. agalactiae ของลูกปลานิล

หลังจากสิ้นสุดการเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ นำลูกปลานิลมาทำการทดสอบความต้านทานเชื้อ *S. agalactiae* โดยการนำปลานิลทั้ง 4 ชุดการทดลอง มาฉีดแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 cfu/ml (LD_{50}) (7) เข้าที่บริเวณช่องท้องด้วยละ 0.1 มิลลิลิตร ทำบันทึกการตายของปลาทุกวันเป็นเวลา 10 วัน นำผลการทดลองที่ได้ในแต่ละชุดการทดลองมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ (Relative Percent Survival: RPS) ในรูปของประสิทธิภาพของวัคซีน (8) ด้วยสูตร

$$\text{ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์} = \left(1 - \frac{\text{อัตราการตายเฉลี่ยของปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัด}}{\text{อัตราการตายเฉลี่ยของปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสมสารสกัด}} \right) \times 100$$

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone และค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ มาเปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ one way-ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3. ผลการวิจัยและอภิปราย

3.1 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสตรินทรวัลลี โดยวิธี disc-diffusion

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบและดอกสตรินทรวัลลีที่สกัดด้วยอะซิโตน และเอทานอลความ

เข้มข้น 95% พบว่า สารสกัดใบสตรินทรวัลลีที่สกัดจากเอทานอลความเข้มข้น 95% มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* มากที่สุด โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มสารสกัดสตรินทรวัลลีที่สกัดจากอะซิโตน ($P < 0.05$) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Inhibition zone) เท่ากับ 15.53 ± 0.65 มิลลิเมตร รองลงมาคือ สารสกัดดอกสตรินทรวัลลีที่สกัดจากเอทานอลความเข้มข้น 95% สารสกัดใบสตรินทรวัลลีที่สกัดจากอะซิโตน และสารสกัดดอกสตรินทรวัลลีที่สกัดจากอะซิโตน โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone เท่ากับ 14.23 ± 0.64 , 10.60 ± 0.85 และ 10.43 ± 1.96 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) ของสารสกัดสตรินทรวัลลีจากตัวทำละลายต่างกัน

สารสกัดสตรินทรวัลลี	ตัวทำละลาย	
	เส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone (mean $\pm$ SD; มิลลิเมตร)	
	อะซิโตน	เอทานอล 95%
ใบ	10.60 ± 0.85^a	15.53 ± 0.65^b
ดอก	10.43 ± 1.96^a	14.23 ± 0.64^b
ควบคุม	10.37 ± 0.85^a	13.67 ± 0.47^b

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสตรินทรวัลลีโดยการหาค่า MIC และ MBC

ผลการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดใบและดอกสตรินทรวัลลีที่สกัดด้วยอะซิโตน และเอทานอลความเข้มข้น 95% พบว่า สารสกัดสตรินทรวัลลีจากทั้ง 2 ตัวทำละลายสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ได้แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (ตารางที่ 2) จากผลการทดสอบพบว่า สารสกัดจาก

ใบสตรินทรวัลลีที่สกัดด้วยอะซิโตน และเอทานอลความเข้มข้น 95% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* มากที่สุดโดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (MIC) เท่ากับ 1,562.50 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ สารสกัดจากดอกสตรินทรวัลลีที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% และอะซิโตน โดยมีค่า MIC เท่ากับ 6,250 และ 25,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ค่า MIC (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของสารสกัดสรีนธรวัลลีจากตัวทำละลายต่างกันต่อเชื้อ *S. agalactiae*

สารสกัดสรีนธรวัลลี	อะซิโตน	เอทานอล 95%
ใบ	1,562.50	1,562.50
ดอก	25,000	6,250

3.3 การเจริญเติบโตและอัตราการรอดของลูกปลานิล

จากการศึกษาผลของสารสกัดสรีนธรวัลลีต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของลูกปลานิลที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดสรีนธรวัลลีทั้ง 4 ชุดการทดลอง คือ อาหารปกติ (ชุดควบคุม) อาหารผสมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 0.1 และ 1% เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลานิลไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างชุดทดลอง ($P>0.05$) แต่จากการทดลองพบว่ากลุ่มปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดสรีนธรวัลลีมีแนวโน้มอัตราการเจริญเติบโตที่มากกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งกลุ่มปลาที่ได้รับ

อาหารผสมสารสกัดสรีนธรวัลลีระดับความเข้มข้น 0.5% มีน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่สูงที่สุด เท่ากับ 2.34 ± 0.015 กรัม และ 1.634 ± 0.008 % ต่อวัน ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดสรีนธรวัลลีระดับความเข้มข้น 0.1% และ 1% มีน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นเท่ากันคือ 2.33 ± 0.015 กรัม และมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.632 ± 0.008 และ 1.629 ± 0.008 % ต่อวัน ตามลำดับ ส่วนอัตราการรอดของปลาในระหว่างการทดลองให้อาหารผสมสารสกัดสรีนธรวัลลีเป็นเวลา 6 สัปดาห์พบว่า มีอัตราการรอดที่เท่ากันในทุกชุดการทดลองคือ 100% (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการรอดของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดสรีนธรวัลลี เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (mean $\pm$ SD)

ชุดการทดลอง	น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น(กรัม)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR;%ต่อวัน)	อัตราการรอด (%)
กลุ่มควบคุม	2.31 ± 0.025	1.618 ± 0.013	100 ± 0.00
อาหารผสมสารสกัด 0.1%	2.33 ± 0.015	1.632 ± 0.008	100 ± 0.00
อาหารผสมสารสกัด 0.5%	2.34 ± 0.015	1.634 ± 0.008	100 ± 0.00
อาหารผสมสารสกัด 1%	2.33 ± 0.015	1.629 ± 0.008	100 ± 0.00

3.4 การทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *S. agalactiae* ของลูกปลานิล

จากการทดสอบเบื้องต้นในการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดจากใบสรีนธรวัลลีมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ได้สูงสุด ดังนั้นในการทดสอบความต้านทานเชื้อแบคทีเรียจึงเลือกใช้ใบนำมาเป็นสารสกัดและทำการทดสอบต่อไป

จากผลการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ของลูกปลานิล หลังจากทำการ

ให้อาหารผสมสารสกัดใบสรีนธรวัลลีทั้ง 4 ชุดการทดลอง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 1% มีอัตราการตายต่ำสุดโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 33.33 ± 3.33 % ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระหว่างชุดการทดลอง ($P<0.05$) ลำดับต่อมาเป็นปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 0.5% และ 0.1% มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 45.56 ± 3.85 และ 47.78 ± 5.09 % ตามลำดับ โดยปลาในกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสูงสุดมีค่าเฉลี่ย

เท่ากับ $74.44 \pm 8.39\%$ (ตารางที่ 4) นอกจากนี้ ปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 1% มีค่า RPS สูงสุดเท่ากับ $54.70 \pm 8.41\%$ แตกต่างกับกลุ่มปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 0.1% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งมีค่า RPS ต่ำสุดเท่ากับ $35.42 \pm 8.37\%$ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) กับกลุ่มปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 0.5% (ค่า RPS เท่ากับ $38.27 \pm 8.57\%$) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 อัตราการตาย และเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ของปลานิล หลังจากได้รับเชื้อ *S. agalactiae* เป็นเวลา 10 วัน (mean $\pm$ SD)

ชุดการทดลอง	อัตราการตาย (%)	เปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ (%)
กลุ่มควบคุม	74.44 ± 8.39^a	
อาหารผสมสารสกัด 0.1%	47.78 ± 5.09^b	35.42 ± 8.37^a
อาหารผสมสารสกัด 0.5%	45.56 ± 3.85^b	38.27 ± 8.57^{ab}
อาหารผสมสารสกัด 1%	33.33 ± 3.33^c	54.70 ± 8.41^b

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งหมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

3.4 อภิปรายผลการศึกษา

ในปัจจุบันการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งในมนุษย์และสัตว์ รวมทั้งสัตว์น้ำมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย ซึ่งการศึกษาในสัตว์น้ำส่วนใหญ่จะเลือกใช้สมุนไพรพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ทางยานำมาทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการ เช่น การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดใบหูกวางต่อเชื้อแบคทีเรีย 7 ชนิด ในปลากัด (9) การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบฝรั่ง กระเทียม ฟาโทะลายโจร และใบสอ่งฟ้าต่อ *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (10-12) การใช้สารสกัดขมิ้นชัน (13) และการใช้สารสกัดกระเทียม (14) ในการทดสอบฤทธิ์ต่อ *A. hydrophila* ในปลาดุกถูกผสม การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเปลือกมังคุดต่อ *S. agalactiae* ในปลานิล (15) และการศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรพญาวานรต่อความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลานิล (16) แต่สำหรับข้อมูลงานวิจัยในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสิรินธรวัลดี (*Bauhinia sirindhorniae*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรท้องถิ่นที่สำคัญ ในจังหวัดหนองคายยังมีอยู่น้อยมาก โดยเฉพาะการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสิรินธรวัลดีต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ ดังนั้นในการศึกษากครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการทดสอบ

ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ รวมทั้งการทดสอบความต้านทานโรคของปลานิล หลังจากได้รับอาหารผสมสารสกัดสิรินธรวัลดี

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสิรินธรของ Sirivan และคณะ (4) พบว่า สารสกัดจากรากและลำต้นของสิรินธรวัลดีที่ใช้เอทานอลความเข้มข้น 95% เป็นตัวทำละลายมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ได้ แต่สำหรับการศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้ใบและดอกสิรินธรวัลดีมาทำการศึกษา เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากใบและดอกสิรินธรวัลดี ประกอบกับหากต้องการนำไปใช้ประโยชน์ได้ในสภาพการเลี้ยงปลาจริง การใช้ใบและดอกจะทำได้ง่ายกว่าการใช้รากและลำต้น อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดสิรินธรวัลดีในครั้งนี้พบว่า สารสกัดจากใบและดอกสิรินธรวัลดีที่สกัดจากเอทานอลความเข้มข้น 95% มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ได้เช่นเดียวกับการใช้รากและลำต้นสิรินธรวัลดี และจากผลการทดลองยังพบว่าสารสกัดจากใบสิรินธรวัลดีที่สกัดจากเอทานอลความเข้มข้น 95% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ได้มากที่สุด ซึ่งมีค่า Inhibition zone เท่ากับ 15.53 ± 0.65 มิลลิเมตร และมีค่า MIC เท่ากับ

1,562.50 มิลลิกรัมต่อลิตร สอดคล้องกับการทดลองของ Adithepchaikarn และ Praneet (15) แต่ต่างจากรายงานของ Adithepchaikarn และคณะ (17) ที่พบว่า สารสกัดจากใบฝรั่งที่สกัดจากเฮกเซนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ได้มากที่สุด และหากนำผลการศึกษานี้มาเปรียบเทียบกับด้านประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* กับสารสกัดสมุนไพรชนิดอื่นจะพบว่า สารสกัดจากใบสตรีนธวัลลีมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. agalactiae* ได้มากกว่าสารสกัดจากใบฝรั่งที่มีค่า Inhibition zone เท่ากับ 2.50 ± 0.50 มิลลิเมตร (17) และมีค่า MIC เท่ากับ 17.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร (10) และสารสกัดจากกระเทียมที่มีค่า MIC เท่ากับ 73.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร (10) แต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. agalactiae* ได้น้อยกว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่มีค่า Inhibition zone เท่ากับ 17.00 ± 0.50 มิลลิเมตร และค่า MIC เท่ากับ 6.5480 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (15) หากเปรียบเทียบค่า Inhibition zone และค่า MIC กับสารสกัดจากใบหูกวางจะพบว่าค่า Inhibition zone ของสารสกัดจากใบสตรีนธวัลลีมีค่ามากกว่า ในขณะที่ค่า MIC มีค่าน้อยกว่าสารสกัดจากใบหูกวาง โดยมีค่าเท่ากับ 6 มิลลิเมตร และ 750 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และยังพบว่าสารสกัดจากใบหูกวางยังมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* (MBC) เท่ากับ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตรอีกด้วย (9) จากผลการทดสอบฤทธิ์ของใบสตรีนธวัลลีในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบสตรีนธวัลลีมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาได้เช่นเดียวกับสารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดอื่นที่มีการทดสอบประสิทธิภาพที่ผ่านมา นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดรากและลำต้นของสตรีนธวัลลีซึ่งพบสารบริสุทธิ์ 15 ชนิด และพบว่ามีสารบริสุทธิ์ 5 ชนิดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ (2S)-eriodictyol, isoliquiritigenin, isoliquiritigenin 4-methyl ether, (2S)-naringenin และ luteolin (4-5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สตรีนธวัลลีมีสารบริสุทธิ์ที่มีคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรียได้ ดังนั้น การศึกษาการแยกสารบริสุทธิ์จากใบและดอกสตรีนธวัลลีจึงมีความสำคัญสำหรับการศึกษาต่อเนื่องต่อไป

สำหรับการทดสอบความต้านทานเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลหลังจากได้รับอาหารผสมสารสกัดใบสตรีนธวัลลีพบว่าปลาที่ได้รับอาหารปกติ (กลุ่มควบคุม) มีอัตราการตายสูงสุดโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $74.44 \pm 8.39\%$ ในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดใบสตรีนธวัลลีที่ระดับความเข้มข้น 1% มีอัตราการตายต่ำสุดโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $33.33 \pm 3.33\%$ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบสตรีนธวัลลีมีผลต่ออัตราการตายของปลานิล ซึ่งจะสอดคล้องกับการศึกษาความต้านทานเชื้อแบคทีเรียในปลานิลของสมุนไพรชนิดอื่นๆ ได้แก่ Pattharaporn และ Praveena (16) ที่ทำการศึกษาผลของสารสกัดพญาวารต่อความต้านทานแบคทีเรีย *S. agalactiae* พบว่าปลาในชุดควบคุมมีอัตราการตายสะสมสูงสุด เช่นเดียวกับ Nattawut (18) ที่ทำการทดลองให้อาหารผสมพญาวารบดแห้งกับปลานิลพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารปกติจะมีเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุด นอกจากนี้จากการศึกษาของ Pongsak และ Parichat (19) ยังพบว่า หลังจากทำให้ปลานิลกินอาหารผสมฟ้าทะลายโจรนั้นไม่พบการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมรวมทั้งการตอบสนองต่อการกินอาหารของปลานิลและไม่พบอัตราการตายสะสมของปลานิลหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในกลุ่มปลานิลที่ได้รับอาหารผสมฟ้าทะลายโจรที่อัตราส่วน 4:36 และ 5:35 (w/w) อย่างไรก็ตามการนำผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการเลี้ยงสัตว์น้ำที่แท้จริงยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป เพื่อเป็นทางเลือกสำหรับเกษตรกรในการป้องกันโรคสัตว์น้ำ และลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป

4. สรุป

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสตรีนธวัลลีในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล พบว่า สารสกัดจากใบที่ใช้เอทานอลความเข้มข้น 95% เป็นตัวทำละลายมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ได้สูงสุดโดยพบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ

15.53±0.65 มิลลิเมตร และพบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) ที่ระดับความเข้มข้น 1,562.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่มีระดับความเข้มข้นใดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียและการศึกษาความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลาไนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างชุดทดลอง ($P>0.05$) เพอร์เซ็นต์อัตราการตายสะสมและเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ (RPS) ของปลาในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 1 % มีความสามารถในการต้านทานแบคทีเรีย *S. agalactiae* ได้ดีที่สุด

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นันทวิทย์อารีย์ชน ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในการทดลอง และขอขอบคุณสาขาประมง คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์และวิศวกรรมศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น วิทยาเขตหนองคายที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำการทดลอง

6. เอกสารอ้างอิง

- (1) Darinya J, Nontawith A, Prapansak S. Study on identification and antimicrobial sensitivity test of *Streptococcus* spp. isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Proceedings of 45th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries:2007 Jan 30 - Feb 2; Bangkok, Thailand; 2007. p. 204-11. Thai.
- (2) Pongsak R, Parichat P. Use of herbs as prophylactic and therapeutic agents in fish. J Sci Tech, Ubon Ratchathani University. 2010;12(4):63-71.
- (3) Larsen K, Larsen SS. *Bauhinia sirindhorniae* sp. Nov. (Leguminosae Caesalpinoideae) a remarkable new species of Thailand. Nord. J Bot. 1997;17:113.
- (4) Sirivan A, Nongluksna S, Nijisiri R. Antibacterial activity of flavonoids from *Bauhinia sirindhorniae*. Thai J Health Res. 2005;19(1):13-19.
- (5) Sirivan A. Chemical constituents and biological activities of *Bauhinia sirindhorniae* and *Croton hutchinsonianus* [PhD thesis]. Bangkok: Chulalongkorn University; 2004. Thai.
- (6) Alderman DJ, Smith P. Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. Aquaculture. 2001;196:211-43.
- (7) Chinnapat S. Effect of mannan-oligosaccharide on growth, immunity and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linn.) [MSc thesis]. Bangkok: Kasetsart University; 2010. Thai.
- (8) Ellis N, Large B. The early stages of reading: a longitudinal study. Appl Cognit Psychol. 1988;2:47-76.
- (9) Watchariya P, Nontawith A. Antibacterial activity and toxicity of Indian almond (*Terminalia catappa*) extract in Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan). Proceedings of 44th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries:2006 Jan 30 - Feb 2; Bangkok, Thailand; 2006. p. 109-16. Thai.
- (10) Arinee C, Jinda W, Kamolchai T, Arunee B, Prasartporn B, Montana S, et al. Antimicrobial activity of guava leaf and garlic extracts against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus* spp. isolated from infected fish. KKU Vet J. 2008;18(1):46-53. Thai.
- (11) Arinee C, Jinda W, Thepinthitiya S, Morakod B, Lalitwadee N. Antibacterial activity of *Clausena harmandiana* leaf extract against patho-

- genic bacteria isolated from animals. KKU Vet J. 2011;21(1):61-8. Thai.
- (12) Direkbusarakom S, Ezura Y, Yoshimizu M, Herunsalee A. Efficacy of Thai traditional herb extracts against fish and shrimp pathogenic bacteria. Fish Patholo. 1998;43(4):437-41.
 - (13) Somsak R, Ruamruedee P, Pichet T. Effect of Medicinal Plants Inhibitory *Aeromonas hydrophila* in Hybrid Walking Catfish (*Clarias macrocephalus* X *C. gariepinus*). Research report. Rajamangala University of Technology ISAN Sakonnakhon; 2009.
 - (14) Ruamruedee P, Pongkrit S, Somwit P. In vitro antibacterial activities of crude extract from garlic against *Aeromonas hydrophila* isolated from Hybrid catfish. Proceedings of 48th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries: 2010 Feb 3-5; Bangkok, Thailand; 2010. p. 329-35. Thai.
 - (15) Adithepchaikarn P, Praneet N. Efficacy of mangosteen peel (*Garcinia mangostana* Linn.) extract on inhibition of *Streptococcus agalactiae*, a fish pathogenic bacterium. J Fish Tech Res. 2010;4(1):103-10.
 - (16) Pattharaporn S, Praveena T. Effects of *P seuderatherum palatiferum* leaf extract on growth performance, haematology, immune response and resistance to against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*). Proceedings of 49th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries: 2011 Feb 1-4; Bangkok, Thailand; 2011. p. 1-9. Thai.
 - (17) Adithepchaikarn P, Pongsak R, Parichat P. Growth inhibition of a fish pathogen, *Streptococcus agalactiae*, by guava leaf extract (*Psidium guajava* Linn.). Proceedings of 37th Congress on Science and Technology of Thailand: 2011 Oct 10-12; Bangkok, Thailand; 2011.
 - (18) Nattawut A. Effects of *Pseuderatherum palatiferum* on growth performance, immune response and disease resistance in Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*) [Special problem]. Bangkok: King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang; 2009. Thai
 - (19) Pongsak R, Parichat P. Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). J Biosci and Bioeng. 2009;107(5):579-82.