รายงานการวิจัย

การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดบัวบก และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียวิบริโอก่อโรคในกุ้ง

Synthesis of silver nanoparticle using *Centella asiatica* leaves extract and their antibacterial activity in Shrimp

วราลี ไกรนรา Waralee Krainara

สุณิษา คงทอง Sunisa Khongthong

อุมาพร ขิมมากทอง Umaporn Khimmakthong

คณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคงศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณการวิจัยเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2563

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย “การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดบัวบกและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียวิบริโอก่อโรคในกุ้ง” ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย เงินงบประมาณรายได้ประจำปี 2563 ระยะเวลาการทำวิจัย 2 ปี ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2562 ถึง เดือน กันยายน 2564 เป็นงานวิจัยพื้นฐานที่ก่อให้เกิดองค์ความรู้ที่สามารถนำไปใช้ต่อยอดพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อประยุกต์ใช้ในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งเชิงพาณิชย์

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยที่ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกฝ่าย และคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยที่ให้การช่วยเหลือและสนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือวิเคราะห์ ตลอดจนสถานที่ในการทำการวิจัย ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

วราลี ไกรนรา

กันยายน 2564

การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดบัวบก และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียวิบริโอก่อโรคในกุ้ง

วราลี ไกรนรา สุณิษา คงทอง และ อุมาพร ขิมมากทอง

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิต ลักษณะของอนุภาคนาโนซิลเวอร์จากสารสกัดหยาบใบบัวบก ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio spp*. ที่ก่อโรคในกุ้ง จากการศึกษาพบว่าปฏิกริยาของการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนเริ่มต้นหลังจากเติมสารสกัดใบบัวบกลงไป และสูงสุดเมื่อผ่านการบ่มเป็นเวลา 240 นาที ลักษณะอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้เป็นทรงกลม ขนาด 4 – 100 นาโนเมตร และมีค่าสเปกตรัม FTIR ที่เปลี่ยนแปลงไปแสดงถึงการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน ผลการศึกษาประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อการยับยั้งแบคทีเรียสกุล *Vibrio spp*. 4 สายพันธ์ ได้แก่ *V. parahaemolyticus, V. vulnificus, V. mimicus* และ *V. fluvialis* โดยวิธี Broth dilution พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำ

คำสำคัญ: อนุภาคซิลเวอร์นาโน บัวบก การต้านแบคทีเรีย โรควิบริโอ

Synthesis of silver nanoparticle using *Centella asiatica* leaves extract and their antibacterial activity in Shrimp

Waralee Krainara, Sunisa Khongthong, and Umaporn Khimmakthong

Abstract

The purpose of this study was to determine synthesis, characteristics of silver nanoparticles from *Centella asiatica* crude extract, and the ability to inhibit the growth of pathogenic Vibrio spp. bacteria in shrimp. The study found that the reaction of silver nanoparticle synthesis started after the addition of *Centella asiatica* extract and maximum after curing for 240 min. The synthesized silver nanoparticles were spherical, 4–100 nm, and the changed FTIR spectra indicated that the silver nanoparticles were synthesized. The efficacy of silver nanoparticles against four strains of *Vibrio spp*. including *V. parahaemolyticus, V. vulnificus, V. mimicus* and *V. fluvialis* by broth dilution. It was found to be effective against bacteria *Vibrio spp*. at low concentrations.

Keywords: Silver nanoparticle, *Centella asiatica*, Bactericidal activity, Vibriosis

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัยหา	1
1.2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	8
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย	9
บทที่ 3 ผลการวิจัย และอภิปรายผล	12
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	19
บรรณานุกรม	20

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดบัวบก	17

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะการเปลี่ยนสีของสารละลายที่รีดิวซ์ให้เกิดอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่เวลาต่าง ๆ	12
2	UV-Visible absorbance spectra ของการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดบัวบก ที่การบ่มที่เวลาต่างๆ	13
3	ภาพ TEM แสดงรูปร่างและขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์โดยใช้สารสกัดจากบัวบก	14
4	แสดง FTIR สเปกตรัม ก. FTIR สเปกตรัมของสารสกัดบัวบก, ข. FTIR สเปกตรัมของอนุภาคซิลเวอร์นาโน	15
5	แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคซิลเวอร์นาโน โดยวิธี Broth microdilution และ Rezazurin assay เปรียบเทียบกับชุดควบคุม tetracycline ความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	16

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ซึ่งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย มีรายงานการส่งออกกุ้งสด กุ้งแช่แข็ง และกุ้งแปรรูป ประจำเดือนมกราคม-สิงหาคม 2561 มีมูลค่าสูงถึง 828.87 ล้านเหรียญสหรัฐ ซึ่งมีปริมาณลดลงถึง 23.46 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับช่วงเวลาเดียวกันของปีที่ผ่านมา ตลาดหลักในการส่งออกคือ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น จีน เวียดนาม เกาหลีใต้ และมีตลาดอื่นที่มีอัตราการขยายตัวสูง เช่น กัมพูชา อิตาลี สิงคโปร์ และรัสเซีย (กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ, 2561) ปัจจุบันนี้การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลมักมีปัญหาและอุปสรรค์ในการเลี้ยงซึ่งมีผลทำให้ปริมาณผลผลิตลดลง หนึ่งในสาเหตุสำคัญที่ทำให้ปริมาณของกุ้งทะเลลดลงคือการเกิดการแพร่ระบาดของโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย ทำให้เกิดความเสียหาย การเลี้ยงกุ้งไม่ได้ผลผลิตตามความต้องการของตลาด ซึ่งเกิดจากการเพาะเลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่มาจากการจัดการระหว่างการเลี้ยงโดยเลือกพื้นที่ไม่เหมาะสม ปล่อยกุ้งหนาแน่น ให้อาหารมากเกินไป ขาดการดูแลคุณภาพน้ำและสุขภาพกุ้ง ทำให้เกิดของเสียสะสมในบ่อ ส่งผลทำให้คุณภาพน้ำในบ่อไม่ดี กุ้งบางส่วนอ่อนแอและเกิดโรคได้ง่าย โดยมีรายงานการตรวจพบจากการระบาดของโรคในกุ้ง ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่าสาเหตุหลักของการเกิดโรคมาจากการอักเสบของลำไส้ที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะในกลุ่ม *Vibrio* spp. เช่น *V. parahaemolyticus, V. vulnificus, V. mimicus* และ *V. fluvialis* (Nash, G. *et al*, 1992, Ishimaru, K. M. *et al*, 1995) โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถพบได้ทั่วไปในทางเดินอาหาร ตับ ตับอ่อน และน้ำเลือดของกุ้งที่ปกติ เมื่อกุ้งอยู่ในสภาวะเครียดทำให้การดูดซึมอาหารในลำไส้ไม่ดี กุ้งผอม โตช้าและทยอยตายเนื่องจากอ่อนแอ (ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง เขต 2, 2560)

การป้องกันและการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งส่วนใหญ่เกษตรกรจะไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะต่อโรคติดเชื้อแบคทีเรียได้ เนื่องจากกุ้งในระยะนี้จะไม่กินอาหาร การรักษาจึงมักไม่ได้ผล ซึ่งหากเกษตรกรสามารถกำจัดเชื้อ *Vibrio* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุในการตายของกุ้งก็จะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรในการควบคุมโรค ปัจจุบันได้มีรายงานการใช้เภสัชภัณฑ์ทางเลือกมากมายเพื่อใช้ในการควบคุมโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้ง เช่น สมุนไพร สารสกัดสมุนไพร โพรไบโอติกแบคทีเรีย เป็นต้น แต่ปัญหาของการใช้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังไม่ได้ประสิทธิภาพมากพอหรือมีการใช้ในปริมาณสูง ดังนั้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์ด้วยนวัตกรรมโดยการใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ผลิตจากสารสกัดธรรมชาติที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียซึ่งมีผลควบคุมโรคติดเชื้อในกุ้งได้นั้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ

จากปัญหาดังกล่าวที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจและส่งผลกระทบต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเสนอโครงการการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดใบบัวบกและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง โดยในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้เตรียมสารสกัดหยาบจากใบบัวบกเพื่อนำมาสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ผลิตขึ้นต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus, V. vulnificus, V. mimicus* และ *V. fluvialis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง หากการวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จจะเป็นประโยชน์ต่อยอดในการประยุกต์ใช้ต่อไป

1.2 หลักการ แนวคิด ทฤษฎี

กุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*)

กุ้งขาวแปซิฟิกเป็นกุ้งทะเล พบได้ทั่วไปบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันออก เกษตรกรในประเทศไทยนิยมเรียกว่ากุ้งขาวแวนนาไมหรือเรียกว่า กุ้งขาว เป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เนื่องจากพ่อแม่พันธุ์ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์ ลักษณะเฉพาะของกุ้งขาวที่สามารถสังเกตได้เด่นชัดคือ บริเวณฟันกรี (หนาม) ด้านบนจะหยักและถี่ ปลายกรีจะตรง โดยที่ฟันกรีด้านล่าง 2 อันและด้านบน 8 อัน ความยาวของกรีจะยาวกว่าลูกตาไม่มาก และที่สังเกตเห็นได้ชัดคือ จะเห็นลำไส้กุ้งชนิดนี้ชัดกว่ากุ้งขาวอื่นๆ ขณะที่โตเต็มวัยสมบูรณ์เต็มที่ของกุ้งชนิดนี้จะมีความยาว 230 มิลลิเมตร (คู่มือการเลี้ยงกุ้งขาว, 2014) ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งมักมีการเลี้ยงแบบหนาแน่นและให้อาหารที่อุดมไปด้วยสารอาหารโปรตีนเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคกุ้ง โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย ซึ่งสร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกร โรคที่เกิดจากแบคทีเรียที่สร้างความเสียหายแก่การเพาะเลี้ยงกุ้งมากที่สุดคือโรคจากแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp (สิริ, 2545)

โรคที่พบในกุ้งขาว

โรคในกุ้งขาวในระยะแรกสังเกตได้จากลักษณะภายนอกคือกุ้งที่มีสุขภาพแข็งแรงเปลือกจะใส ส่วนกุ้งที่เกิดอาการเครียดจะเริ่มเห็นจุดสีดำใต้เปลือกและเกิดแผลตามลำตัว แผลจะมีสีดำเพราะกุ้งสร้างสารสีเรียกว่า เมลานิน (Melanin) ขึ้นมาอย่างรวดเร็วและมีการแพร่กระจายติดโรคทั่วบ่อ เช่น

โรคจากแบคทีเรีย (Bacterial diseases) เช่น โรคเรืองแสง (Vibriosis) เกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. เช่น *V. harveyi, V. parahaemolyticus V. vulnificus* และ *V. aginolyticus* เป็นต้น บริเวณที่พบการติดเชื้อได้แก่ เหงือก กล้ามเนื้อ น้ำเลือด ตับ และตับอ่อน กุ้งจะมีอาการตับฝ่อไม่กินอาหาร ลำไส้ว่างเปล่า บริเวณลำตัวและรยางค์มีแผล

โรคจากไวรัส (Viral disease) เช่น โรค Taura syndrome virus (TSV) พบในกุ้งขาวระยะ Post larvae มี 2 ระยะคือ ระยะรุนแรงและระยะเรื้อรังโดยในระยะรุนแรงกุ้งมีสีแดงซีดทั้งตัว และจะตายขณะลอกคราบ นอกจากนี้กุ้งจะมีเปลือกนิ่มและลำไส้ว่างเปล่า และโรคตัวแดงดวงขาว White spot syndrome virus (WSSV) กุ้งจะมีอัตราการตายสูง มีจุดสีขาวบริเวณลำตัวและใต้เปลือก อวัยวะเป้าหมายได้แก่ผิวใต้เปลือก ต่อมน้ำเหลือง อวัยวะสร้างเม็ดเลือด เหงือกและหัวใน

โรคปรสิต ปริสิตมีผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลน้อย กลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคได้แก่ปรสิตที่ต้องอาศัยพาหะหรือเจ้าบ้านแบบถาวร และตรวจโรคได้ด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา เช่น Microsporidia ก่อโรคหลังขาว

โรคจากรา เช่น โรค Fusariosis หรือโรคเหงือกดำ (Blank gill) มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium* spp. พบในกุ้งทะเลหลายชนิดที่เลี้ยงในระบบหนาแน่นที่มีระบบการเลี้ยงไม่ดีการติดเชื้อราชนิดนี้เกิดจากกุ้งมีบาดแผลซึ่งทำให้เชื้อราเข้าสู่ร่างกายจะพบจุดสีน้ำตาลบริเวณเปลือก เหงือกและรยางค์ มีอาการที่ไม่รุนแรง (วีณา, 2557)

สาเหตุของการเกิดโรคในกุ้งนั้นเกิดได้จากหลายสาเหตุ และมีความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องกับปัจจัยการจัดการต่างๆ เช่น คุณภาพน้ำ หรือสภาะดินก้นบ่อ รวมถึงสุขภาพตัวกุ้งเองด้วย

***Vibrio* spp.**

โรคติดเชื้อวิบริโอพบได้ทั่วไปและเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของการเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะในกุ้ง เกิดจากเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*Vibrio spp.*) เช่น *V. parahaemolyticus, V. harveyi, V. vulnificus V. mimicus* เป็นต้น *Vibrio spp.* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนใหญ่มีรูปร่างแท่งจัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobe เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือ 1-8% ช่วง pH 7.6-9 เป็นเชื้อที่ไม่ทนความร้อนและสามารถถูกทำลายได้ด้วยกรดที่มีค่า pH ต่ำกว่า 4.5 สามารถพบเชื้อได้ทั่วไปในน้ำทะเล แม้แต่ในกุ้งที่แข็งแรงก็สามารถพบเชื้อวิบริโอหลายสปีชีส์ในทางเดินอาหารของกุ้งได้ กุ้งที่ติดเชื้อชนิดนี้จะมีอาการคือกินอาหารได้น้อยลง ตับและตับอ่อนผิดปกติ สีเนื้อจะขุ่น ลำตัวสกปรก และมีตะกอนเกาะตามผิว เมื่อนำตับและตับอ่อนมาทำการเพาะเชื้อจะพบเชื้อเป็นจำนวนมาก (Robert-pillot *et. al*., 2010) พบเนื้อตายในเฮปปาโตแพนเครียสเกิดจากการติดเชื้อวิบริโอ ซึ่งเชื้อวิบริโอหลายสปีชีส์เป็นเชื้อจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของกุ้งปกติ คาดการว่าสามารถติดเชื้อผ่านทางเดินอาหารเป็นส่วนใหญ่ เชื้ออาจเป็นสาเหตุโดยตรงของโรคหรือเป็นเชื้อฉวยโอกาส ซึ่งเกิดจากสภาวะต่างๆ เช่น ความเครียด หรือการติดเชื้อไวรัส อาการต่างๆ ที่แสดง เช่น การกินอาหารลดลง อัตราการตายสูง ไม่อุจจาระ และลอก

คราบช้าลง อาการและรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่อาจใช้ในการวินิจฉัยเบื้องต้น ได้แก่ ฮีโมลิมฟ์ หรือเลือดแข็งตัวช้า แบคทีเรียในฮีโมลิมฟ์หรือเนื้อเยื่อต่างๆ จุดดำโนดูลในเนื้อเยื่อ ไขมันในเฮปปาโตแพนเครียสต่ำ การเรืองแสงในตัวของกุ้ง การพบโคโลนีของแบคทีเรียที่มีสีเขียวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrated Bile Sucrose Agar (TCBS) (ทินรัตน์, 2551)

โรคขี้ขาวในกุ้งขาวแวนนาไม

ลักษณะภายนอกของกุ้งป่วยจากบ่อที่มีขี้ขาวลอยอยู่บริเวณผิวน้ำ พบว่ากุ้งจะตัวหลวม ลำตัวสกปรก กุ้งป่วยบางตัวจะตัวนิ่มเปลือกไม่แข็งหลังจากการลอกคราบ เมื่อนำขี้ขาวที่ลอยบริเวณผิวน้ำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบว่า มีไขมันจำนวนมาก และลักษณะขี้ขาวดังกล่าวที่มองเห็นนั้นเป็นส่วนของผนังลำไส้ของกุ้งที่หลุดลอกออกมา กุ้งในบ่อที่มีอาการขี้ขาวจะกินอาหารลดลง ถ้ามีขี้ขาวเกิดขึ้นเป็นเวลานานจะมีกุ้งบางส่วนทยอยตาย ซึ่งจะพบมีอาการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ได้แก่ *V. parahaemolyticus, V. fluvialis, V. alginolyticus, V. harveyi, V. vulnificus* และ *V. mimicus* โดยชนิดที่พบมากที่สุดคือ *V. parahaemolyticus* และ *V.fluvialis* (มณฑกานต์, 2552, รัตติยากร, 2549) โดยแบคทีเรียดังกล่าวสามารถพบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำธรรมชาติ บ่อเลี้ยง และในทางเดินอาหารตับและตับอ่อน และน้ำเลือดกุ้ง

อนุภาคซิลเวอร์นาโน

อนุภาคซิลเวอร์นาโน ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ มากมาย ทั้งในทางด้านการแพทย์และอุตสาหกรรม โดยวิธีการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนนั้นสามารถทำให้หลายวิธี ส่วนใหญ่เป็นวิธีการทางเคมีและวิธีการทางกายภาพ ด้วยวิธีทั้งสองนี้ยังมีข้อเสียด้านความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและต้นทุน ดังนั้นวิธีการทางชีวภาพจึงได้เป็นทางเลือกใหม่ที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน (กานต์พิมล, 2560) ซึ่งอนุภาคนาโนคืออนุภาคที่มีขนาดเล็กอยู่ในช่วง 1-100 นาโนเมตร มีสมบัติทางเคมีและทางกายภาพที่พิเศษแตกต่างไปจากอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ เนื่องจากขนาดอนุภาคที่เล็กส่งผลให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสที่สูง จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีบริเวณพื้นผิวได้ดี (Wang และคณะ, 2006) อนุภาคซิลเวอร์นาโนเป็นที่สนใจมากในปัจจุบัน เนื่องจากคุณสมบัติพิเศษ คือสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ ปัจจุบันจึงถูกนำประยุกต์ใช้ในหลายๆ ด้านไม่ว่าจะเป็นด้านสุขภาพ โดยมีการทดสอบแล้วว่าปลอดภัยต่อร่างกาย เนื่องด้วยปริมาณที่น้อยมากจึงไม่มีผลข้างเคียงต่อร่างกาย เนื่องจากซิลเวอร์เป็นธาตุเฉื่อยที่มีอยู่ในธรรมชาติ ดังนั้นจึงมีการนำมาใช้กับมนุษย์ เช่น ใช้ซิลเวอร์นาโนผสมในน้ำยาบ้วนปาก เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก ใช้เป็นส่วนผสมในวัสดุทำหน้ากากปิดปาก ปิดจมูก เครื่องกรองน้ำ เครื่องสำอาง และใช้ใน

อุตสาหกรรมต่างๆ เช่น เป็นส่วนผสมในสีทาบ้าน และเป็นส่วนผสมของเส้นใยในแผ่นกรองอากาศ (Xiu และคณะ, 2012)

การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน

การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนมีหลายวิธี ได้แก่ การสังเคราะห์โดยอาศัยปฏิกิริยารีดักชัน ปฏิกิริยาทางเคมีและเคมีโฟโตเคมิคัล การสลายตัวโดยใช้ความร้อน กระบวนการทางอิเล็กโตรเคมิคัล และการใช้ไมโครเวฟในการสังเคราะห์ เป็นต้น ถึงแม้ว่าวิธีการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนดังกล่าวจะใช้เวลาไม่มาก และได้อนุภาคที่มีคุณภาพดี แต่ใช้สารเคมีราคาแพงและมีพิษเป็นรีดิวซ์ซิงเอเจนต์ เพื่อให้ขนาดอนุภาคมีเสถียร ดังนั้นความต้องการในการใช้วิธีเคมีสีเขียวเพื่อสังเคราะห์ทางนาโนเทคโนโลยีจึงเพิ่มมากขึ้น (ปวีณา, 2016)

การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากพืช

กระบวนการในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากพืชมีขั้นตอนที่ไม่ซับซ้อน โดยการนำสารสกัดจากพืชมาผสมกับเกลือของโลหะ ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ ซิลเวอร์ไนเตรต ปฏิกิริยารีดักชันส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิห้องและใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาจนสมบูรณ์ไม่นาน ซึ่งสามารถสังเกตการทดลองได้จากสีของสารละลาย โดยในการสังเคราะห์นั้นตัวทำละลายที่ใช้คือน้ำ อะซิโตน เอทานอล และเมทานอล พืชที่สามารถนำมาใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนมีหลายชนิด ซึ่งสารที่มีบทบาทในการเกิดปฏิกิริยาจะแตกต่างกัน และส่งผลให้อนุภาคซิลเวอร์นาดนที่ได้สังเคราะห์ได้มีขนาด รูปร่าง และการนำไปใช้ประโยชน์ได้แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของพืชที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน (กานต์พิมล, 2560)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนประกอบของพืช	ขนาดและรูปร่าง	องค์ประกอบที่มีส่วนช่วยในเกิดปฏิกิริยารีดักชัน	การประยุกต์ใช้งาน	อ้างอิง
Allium cepa	หัวหอมใหญ่	Plant	33.67 nm; spherical	-	Antibacterial activity Anticancer activity against human lung epithelial A549 cells	(Saxena et al., 2010)
Allium sativum	กระเทียม	Clove	4–22 nm; spherical	-		(Ahamed et al., 2011)
Anacardium occidentale	มะม่วงหิมะพาน	Leaf	6–17 nm	Proteins, aromatic amines, and polyphenols	-	(Sheny et al., 2011)
Annona squamosal	น้อยหน่า	Leaf	20–100 nm; Spherical	Phenolic group, proteins, and carbohydrates	In-vitro cytotoxicity against MCF-7 and HBL-100	(Vivek et al., 2012)
Camellia Sinensis	ชา	Leaf	4 nm; spherical	Proteins	-	(Loo et al., 2012)
Catharanthus roseus	แพงพวย	Leaf	48–67 nm; cubic	Proteins	Antibacterial activity	(Mukunthan et al., 2011)
Chrysopogon zizanioides	หญ้าแฝก	Leaf	85–110 nm; cubic	Alkaloids and phytosterols	-	(Arunachalam and Annamalai., 2013)
Citrus sinensis	ส้ม	Peel	11–37 nm; spherical	Water-soluble fractions	Antibacterial activity	(Kaviya et al., 2011)
Coccinia grandis	ตำลึง	Leaf	20–30 nm; spherical	Alkaloids and terpenoids	-	(Arunachalam et al., 2012)
Curcuma longa	ขมิ้น	Tuber powder	6.30±2.64 nm; face-centered cubic	Proteins, alkaloid, or flavones	-	(Shameli et al., 2012)
Cynodon dactylon	หญ้าแพรก	Leaf	8–10 nm; spherical	Polyphenols	Antibacterial activity	(Sahu et al., 2013)
Dioscorea bulbifera	ว่านสามพันตึง	Tuber	8–20 nm; nanorods and triangles	Polyols	Antibacterial activity	(Ghosh et al., 2012)
Ficus religiosa	โพ	Leaf	5–35 nm; spherical	Polyphenols and proteins	In-vivo anticancer activity against DAL induced mice	(Antony et al., 2013)

บัวบก

บัวบก (ชื่อวิทยาศาสตร์: *Centella asiatica*) เป็นพืชสมุนไพรที่อยู่ในแถบเอเชีย ใบบัวบกสามารถช่วยรักษาแผลให้หายได้เร็วขึ้นและยังช่วยลดอาการอักเสบของแผลได้ดี เพราะมีกรดมาเดคาสสิก กรดอะเซียติก และสารอะเซียติโคไซด์ ยาแผนปัจจุบันทำเป็นรูปครีมผงโรยแผล ยาเม็ดรับประทาน เพื่อใช้รักษาแผลสดและแผลผ่าตัด ไม่ว่าจะเป็นแผลไฟไหม้ หรือแผลฝีหนองหรือแผลสด บัวบกมีประวัติการใชประโยชนในดานยารักษาโรค มาเปนระยะเวลามากกวา 50 ป โดยเฉพาะใบและราก สามารถนำมารักษาอาการต่างๆ เช่น ช้ำใน บำรุงหัวใจ บำรุงตับ ไต และสมอง บำรุงประสาทและความจำ ชวยขับปสสาวะ รักษาบาดแผล แผลเปอย แกโรค เรื้อน โรคบิด ลดอาการปวดศีรษะและไข (Kappor *et al*, 2005) สารสำคัญที่พบในบัวบกจัดอยูในกลุมไตรเทอปนอยด ไกลโคไซด (Triterpenoid glycoside) ประกอบดวยกรด เอเซียติก (Asiatic acid) สารเอเซียติโคไซด (Asiaticoside) กรดแมดิแคสซิค (Madecassic acid) หรือ สารแมดิแคส ซอล (Madecassol) (Rastog, R.P. *et al*, 1986, Singh, B., 1969) มีรายงานการใช้สารสกัดหยาบจากใบบัวบก สารสกัดด้วยน้ำของใบบัวบกที่มีความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรยับยั้งการเจริญของ *Flavobacterium columnaris* ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (พงศักดิ์, 2553) บัวบกที่สกัดด้วยเอทานอล มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง Vero cell โดยมีค่า CD50 เท่ากับ 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากต้นสดที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและต้านอนุมูลอิสระ (จินดาพร, 2551) และมีรายงานการวิจัยการสังเคราะห์อนาภาคซิลเวอร์นาโนโดยใช้สารสกัดจากใบบัวบกเป็นตัวรีดิวซ์ (Reducing agent)

จากรายงานการวิจัยในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา มีรายงานการใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ผลิตจากสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆในการทดลองยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีเมื่อใช้ความเข้มข้นน้อย ซึ่งในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลเวอร์สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ได้ด้วยสารสกัดจากพืชเช่น ชา และใบบัวบก ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ ทางคณะผู้วิจัยได้ใช้สารสกัดใบบัวบกเป็นตัวกระตุ้นการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนเนื่องจากสามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่น

การศึกษาและใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

Eldar *et al*. (1995) ได้ทดลองผลิตวัคซีนจาก *Streptococcus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมาฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลีนแล้วฉีดเข้าช่องท้องปลาเรนโบว์เทร้าท์ สามารถป้องกันโรคได้ดี โดยพบว่า ปลาที่ให้วัคซีนมีอัตราการตายจากการติดเชื้อโรคดังกล่าวเพียง 5% ในขณะที่ปลาที่ไม่ให้วัคซีน (ชุดควบคุม) มีอัตราการตายสูงถึง 50%

Supna และคณะ (2018) ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากต้นและแคลลัส (callus) ของบัวบก ที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture) พบว่าได้สารสกัดจากต้นและแคลลัสของบัวบกที่เลี้ยงในหลอดทดลองสามารถสังเคราะห์อนุภาพซิลเวอร์นาโน และสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ

Srinivasan และคณะ (2017) ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยใช้สารสกัดจากใบแห้งของบัวบก โดยใช้วิธี eco-friendly route พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ได้มีขนาด 420 นาโนเมตร และสามารถยับยั้ง *Klebcella pneumonae* และ *Steptococci aurous* ในหลอดทดลองได้

Kathiresan และคณะ (2013) ได้ทำการทดลองสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยใช้สารสกัดจาก coastal plant *Prosopis chilensis* พบว่าสารสกัดจากใบของพืชสามารถสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่มีขนาด 5-25 นาโนเมตรส่วนใหญ่มีรูปร่างกลมเฉลี่ย 11.3 นาโนเมตร และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรควิบริโอซิสในกุ้ง *Penaeus monodon* หลังจากมีการทำให้ติดเชื้อ 30 วัน แล้วให้สารสกัดซิลเวอร์นาโนพบว่ากุ้งมีอัตราการรวดสูงและเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันในส่วน hemocyte peroxidase และ antibacterial activity ของ hemolymph ของ *P. monadon*

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาการผลิตและลักษณะของอนุภาคนาโนซิลเวอร์จากสารสกัดหยาบใบบัวบก
2. ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio spp*. ที่ก่อโรคในกุ้ง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้กระบวนการและผลิตภัณฑ์อนุภาคนาโนซิลเวอร์จากสารธรรมชาติที่มีศักยภาพในป้องกันและควบคุมโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ลดอุบัติการณ์การเกิดโรคติดเชื้อในกุ้ง เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นสารสกัดจากสมุนไพรธรรมชาติ จึงไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างในกุ้ง อีกทั้งช่วยส่งเสริมสุขภาพกุ้งเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ ที่สำคัญลดการนำเข้ายาปฏิชีวนะจากต่างประเทศ และสามารถนำไปต่อยอดเพื่อพัฒนาเป็นเภสัชภัณฑ์มูลค่าสูงต่อไป
2. นิพนธ์ต้นฉบับ (Original article) จำนวน 1 เรื่อง ในวารสารซึ่งอยู่ในฐานข้อมูล TCI ขึ้นไป

บทที่ 2
วิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 สถานที่ทำการวิจัย

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช

2.2 วิธีการดำเนินการวิชัย

2.2.1 การสารสกัดจากใบบัวบก

เก็บตัวอย่างบัวบกในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช จากนั้นนำบัวบกมาแยกเอาเฉพาะส่วนใบ ล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง จากนั้นนำใบบัวบกแห้งมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดอาหารแห้ง นำผงใบบัวบกที่อบแห้งและบดแล้วมาสกัดด้วยน้ำ โดยชั่งผงใบบัวบก 20 กรัม ต้มในน้ำที่ปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองสารละลายใบบัวบกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บรักษาสารที่สกัดได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน (Sapna *et al*, 2018)

2.2.2 การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน

การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน ทำโดยนำสารสกัดใบบัวบก 10 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย $AgNO_3$ ความเข้มข้น 10^{-3} M จำนวน 90 มิลลิลิตร ในขวดชมพู่ (ทำ 3 ซ้ำ) วางบนเครื่องกวนสารที่อุณหภูมิ 60°C เก็บตัวอย่างทุกๆ 5 นาที, 15 นาที, 30 นาที, 1 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง สังเกตสีของสารละลายที่เปลี่ยนแปลงซึ่งแสดงถึงการเกิดของอนุภาคซิลเวอร์นาโน ซิลเวอร์ไอออนจะถูกรีดิวส์ไปเป็นอนุภาคซิลเวอร์นาโน ($AgNO_3$)

2.2.3 ศึกษาลักษณะของอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยวิธี UV-Visible, FT-IR และ TEM

การตรวจสอบเพื่อยืนยันการเกิดอนุภาคซิลเวอร์นาโน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 350 – 700 นาโนเมตร จากนั้นวิเคราะห์ด้วยวิธี Fourier-Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) spectroscopy เพื่อวัดการเกิดขึ้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโน โดยจะทำให้แห้งด้วยวิธี freeze-dried และละลายกลับด้วยโพรแทสเซียมโปรไมด์ในอัตราส่วน 1:100 ค่า FT-IR spectrum จะถูกบันทึกบนเครื่อง FT-IR ในช่วง 400-4000 cm^{-1} (Gudikandula *et al*, 2017) และอนุภาคซิลเวอร์นาโนจะถูกศึกษาด้วยวิธี Transmission Electron Microscope (TEM)

เพื่อตรวจสอบขนาดและรูปร่างของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ผลิตขึ้น ทำโดยการหยดสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน 3 ไมโครลิตลงบนแผ่นตะกั่ว ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วตรวจสอบด้วยเครื่อง TEM ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคซิลเวอร์นาโนจะถูกวัดและประมวณผลด้วยโปรแกรม (Shuba *et al*, 2017)

2.2.4 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อ *Vibrio spp.* จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (Department of Medical Sciences, Thailand) 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. parahaemolyticus, V. vulnificus, V. mimicus* และ *V. fluvialis* เลี้ยงบนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว เพื่อเลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ที่มี 1.5% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องบ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นด้วย TBS ให้ได้เท่ากับ McFarland No. 0.5 เพื่อเจือจางเชื้อมีประมาณ 1.0 x 10^{6} cells/ml (1:200) ก่อนนำไปทำการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

2.2.5 ทดสอบความสามารถในการยับยั้ง bacteria ในหลอดทดลอง

2.2.5.1 การทดสอบโดยวิธี Agar disc-diffusion

เพื่อหาความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยเตรียมแบคทีเรียทดสอบดังข้อ 4 หลังจากปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียได้แล้ว ใช้ sterile non-toxic swab จุ่มลงไปในหลอด วน swab ในหลอดไปมาหลายๆครั้ง แล้วบิดให้หมาดบริเวณข้างหลอด เพื่อไม่ให้เชื้อที่ใช้มีปริมาณมากเกินไป เพาะเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อ Muller-Hinton agar โดยใช้ swab streak ลงบนจานเลี้ยงเชื้อไปมา ทำซ้ำสองถึงสามครั้งโดยแต่ละครั้งหมุนจานเลี้ยงเชื้อทำมุม 60° พักให้จานเลี้ยงเชื้อแห้ง ประมาณ 3-5 นาที และเจาะวุ้นให้เป็นรูและเติมสารทดสอบ silver nanopaticle อย่างน้อย 3 ความเข้มข้น ปริมาตร 10 µl ไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสภายในเวลา 15 นาที จากนั้น 18-24 ชั่วโมง นำจานเลี้ยงเชื้อมาวัดค่า zone diameter โดยใช้ไม้บรรทัด หรือเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์

2.2.5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของ silver nanoparticle

โดยการหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) ทดสอบโดยวิธี agar microdilution method เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดของสาร silver nanopaticle ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (MIC; minimum inhibitory concentration) โดยเตรียมแบคทีเรียทดสอบดังข้อ 4 หลังจากปรับความขุ่นได้แล้ว ใส่เชื้อ Vibrio spp. จากหลอดเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปในแพลต จากนั้นจึงนำไปทดสอบกับสาร

silver nanopaticle ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เจือจางโดยวิธี 2-fold serial dilution ใน 96-microtiter plate นำแพลตที่ใส่เชื้อเรียบร้อยแล้ว ไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสภายในเวลา 15 นาที จากนั้น 18-24 ชั่วโมง นำจานเลี้ยงเชื้อมาอ่านค่าความเข้มข้นของยาในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นสีชมพูแสดงว่าเชื้อสามารถเจริญได้ แต่ถ้ายังคงเป็นสีน้ำเงินแสดงว่ามีการยับยั้งเชื้อได้ ซึ่งเกิดจากการทำงานของสารละลาย resazurin ที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ (Sarker *et al*., 2007)

2.2.5.3 การหาค่าความเข้นข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้ (Minimum Bactericidal Concentration; MBC)

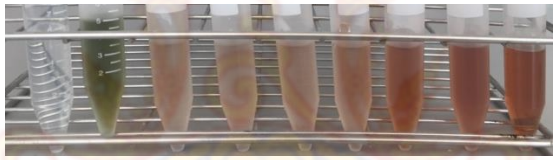
นำผลความเข้มข้นต่ำสุดของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ ในข้อ 5.2 มาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด (MBC) วิธีการคือนำหลอดทดลองที่ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบไปทำการเพาะเชื้อโดยเทคนิค streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงและบันทึกผลการทดลอง โดยที่ความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ก็จะไม่พบการเจริญขของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

บทที่ 3

ผลการวิจัย และอภิปลายผล

3.1 การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน

การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน ทำโดยนำสารสกัดใบบัวบก 10 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย $AgNO_3$ ความเข้มข้น 10^{-3} M จำนวน 90 มิลลิลิตร ในขวดชมพู่ (ทำ 3 ซ้ำ) วางบนเครื่องกวนสารที่อุณหภูมิ 60°C จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 5 นาที, 15 นาที, 30 นาที, 60 นาที, 120 นาที, 180 นาที และ 240 นาที พบว่าปฏิกริยาของการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนเริ่มต้นหลังจากเติมสารสกัดใบบัวบกลงไป ผลการทดลองพบว่าเมื่อนำสารสกัดหยาบใบบัวบกผสมกับสารละลาย $AgNO_3$ ความเข้มข้น 10 mM มีการเปลี่ยนแปลงของสีที่สังเกตเห็นได้เมื่อเวลาผ่านไปและเข้มที่สุดที่ 24 ชั่วโมง โดยจะเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลดังแสดงในภาพที่ 1 แสดงให้เห็นถึงการเกิดการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนเกิดขึ้น



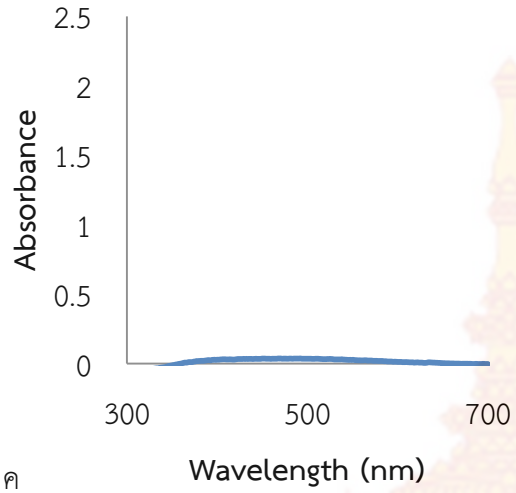
1 2 3 4 5 6 7 8 9

ภาพที่ 1 ลักษณะการเปลี่ยนสีของสารละลายที่รีดิวซ์ให้เกิดอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่เวลาต่างๆ 1 คือสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท, 2 คือสารสกัดบัวบก, 3 - 9 คือซิลเวอร์นาโนที่เวลา 5 นาที, 15 นาที, 30 นาที, 60 นาที, 120 นาที, 180 นาที และ 240 นาที

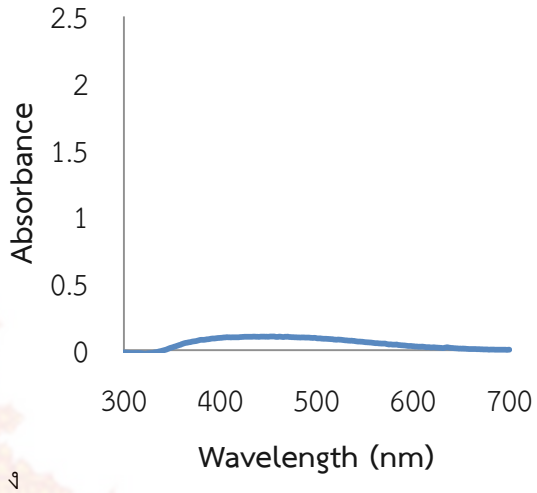
3.1.1 การศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยวิธี UV-Visible spectrophotometer

UV-Vis เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน จากการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคซิวเวอร์นาโน โดยนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบเพื่อยืนยันการเกิดอนุภาคซิลเวอร์นาโน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 300 – 700 นาโนเมตร พบว่าสารที่สังเคราะห์ขึ้นมามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 431 ถึง 433 nm ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Eze และคณะ (2019) ซึ่งทำการทดลองสังเคราะห์ซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดบัวบก โดยค่าการดูดกลืนแสงเริ่มเพิ่มสูงขึ้นที่เวลา 60 นาที และสูงสุดที่เวลา 240 นาที โดยที่เวลา 180 นาที และ 240 นาทีไม่มีการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงแสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนได้เกิดขึ้นและสิ้นสุดลง ดังแสดงในภาพที่ 2

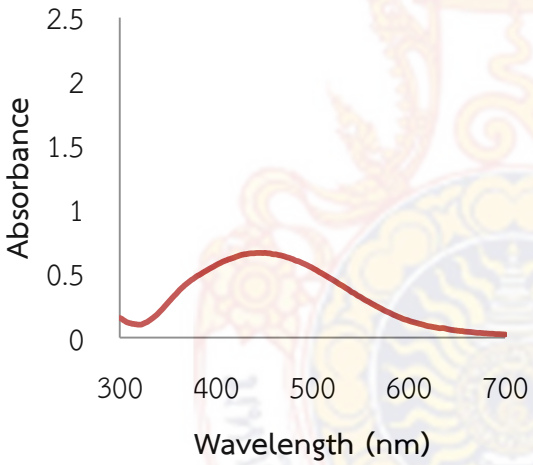
ก


2.5
2
1.5
1
0.5
0
Absorbance
300
500
700
Wavelength (nm)

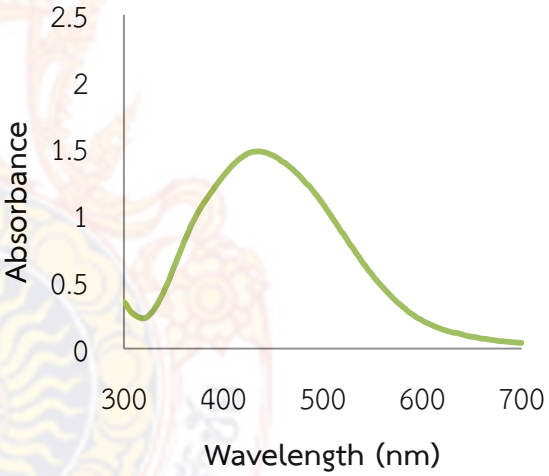
ข


2.5
2
1.5
1
0.5
0
Absorbance
300
400
500
600
700
Wavelength (nm)

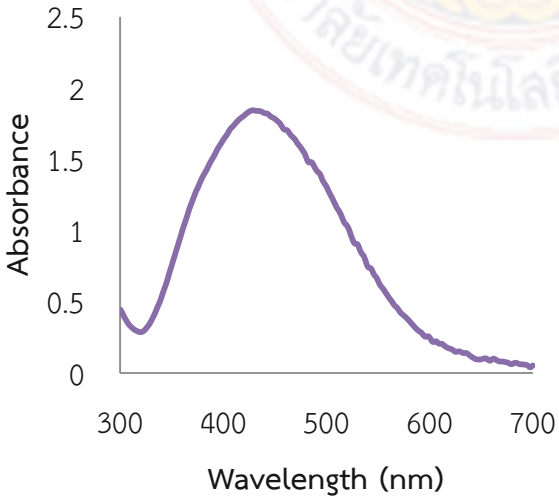
ค


2.5
2
1.5
1
0.5
0
Absorbance
300
400
500
600
700
Wavelength (nm)

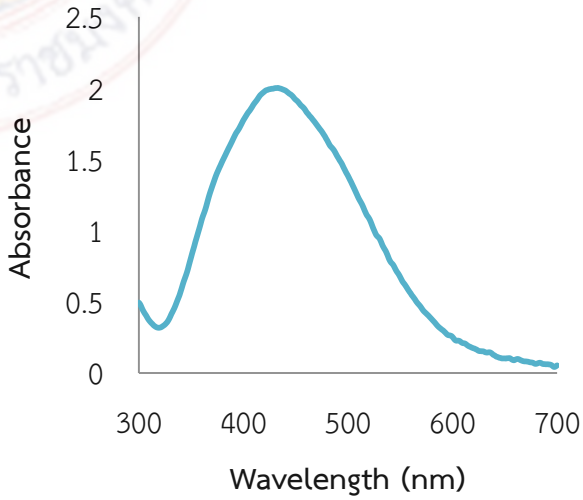
ง


2.5
2
1.5
1
0.5
0
Absorbance
300
400
500
600
700
Wavelength (nm)

จ


2.5
2
1.5
1
0.5
0
Absorbance
300
400
500
600
700
Wavelength (nm)

ฉ

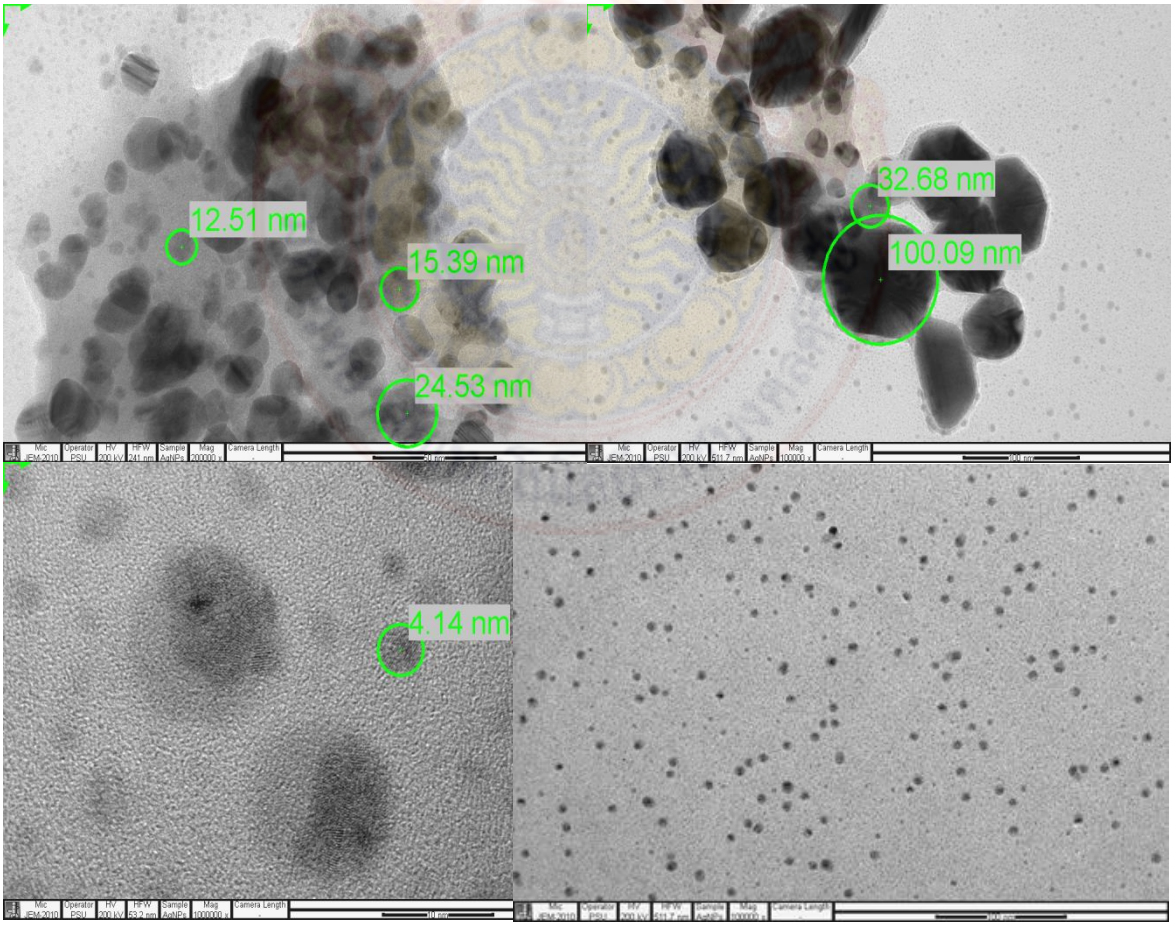

2.5
2
1.5
1
0.5
0
Absorbance
300
400
500
600
700
Wavelength (nm)

ภาพที่ 2 UV-Visible absorbance spectra ของการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดบัวบกที่เวลาการบ่ม 15 นาที (ก), 30 นาที (ข), 60 นาที (ค), 120 นาที (ง), 180 นาที (จ), 240 นาที (ฉ.) ในช่วงความยาวคลื่น 300 – 700 nm

3.2 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโน

3.2.1 การศึกษาลักษณะของอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยเทคนิค TEM

การศึกษาสมบัติทางกายภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโน ได้แก่ การศึกษาขนาด รูปร่าง และลักษณะการกระจายตัวของอนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยใช้วิธี TEM พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้มีรูปร่างกลม มีขนาดตั้งแต่ 4-100 นาโนเมตรดังแสดงในภาพที่ 3 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kathiresan1 et al. และคณะ (2013) ได้ทำการทดลองสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยใช้สารสกัดจาก coastal plant *Prosopis chilensis* พบว่าสารสกัดจากใบของพืชสามารถสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่มีขนาด 5-25 นาโนเมตรส่วนใหญ่มีรูปร่างกลมเฉลี่ย 11.3 นาโนเมตร และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรควิบริโอซิสในกุ้ง *Penaeus monodon* หลังจากมีการทำให้ติดเชื้อ 30 วัน

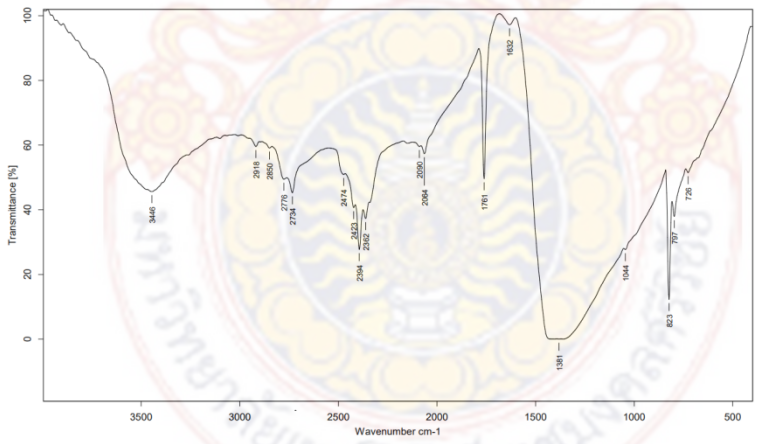


ภาพที่ 3 ภาพ TEM แสดงรูปร่างและขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์โดยใช้สารสกัดจากบัวบก

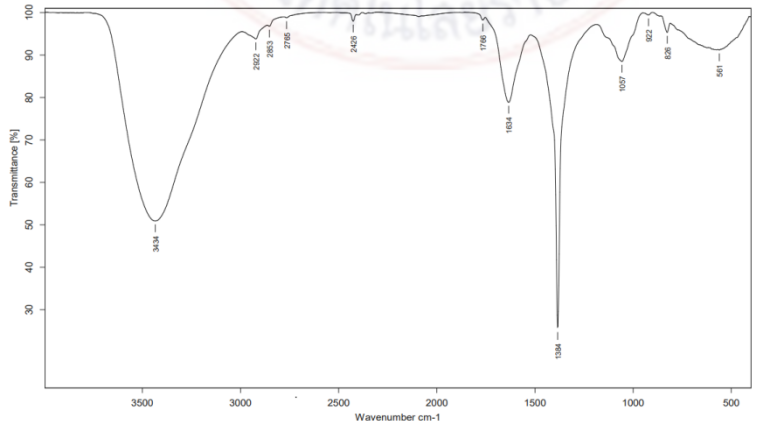
3.2.2 การศึกษาเอกลักษณ์ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยวิธี FTIR

สำหรับ FTIR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารพฤษเคมีที่มีเป็นองค์ประกอบของสารสกัดบัวบก จากผลการทดลองบันทึกสเปกตรัม FTIR ของสารสกัดบัวบก และอนนุภาคซิลเวอร์นาโนในช่วงคลื่น 4000 – 500 cm^{-1} พบว่า อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้มีการเปลี่ยนแปลงสเปกตรัมเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัม FTIR ของสารสกัดบัวบกดังแสดงในภาพที่ 4 ซึ่งพบว่าสเปกตรัมของอนุภาคซิลเวอร์นาโน มี %Transmittance ที่ตำแหน่งเลขคลื่นต่างๆ เกิดการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเล็กน้อย ในช่วงคลื่น 3434 – 3446 cm^{-1} แสดงถึงการยืดของพันธะ O-H stratching ของหมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งค่าเปอร์เซ็นต์การส่องผ่านของพีคหลังจากสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนแล้วมีค่าลดลงจากก่อนสังเคราะห์ แสดงถึงกลไกการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยมีการรีดิวซ์ซิวเวอร์ไอออน (Ag^{+}) ให้กลายเป็นอนุภาคซิลเวอร์นาโน (Ag^{0})

ก



ข



ภาพที่ 4 แสดง FTIR สเปกตรัม ก. FTIR สเปกตรัมของสารสกัดบัวบก, ข. FTIR สเปกตรัมของอนุภาคซิลเวอร์นาโน

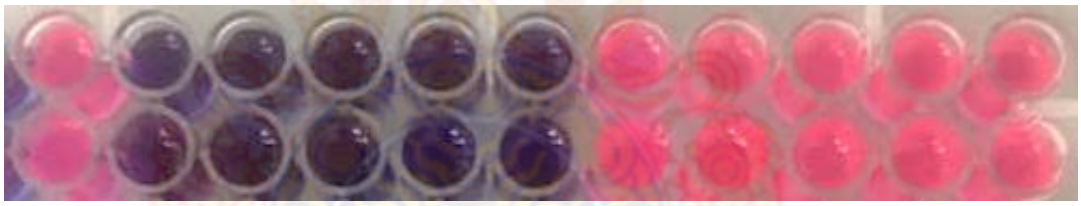
3.4 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียในหลอดทดลอง

3.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimum Inhibition Concentratio: MIC)

ผลการทดสอบหาค่า MIC โดยวิธี Broth microdilution และ Resazurin assay ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดบัวบกต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio spp.* 4 ชนิด ได้แก่ *V. parahaemolyticus, V. vulnificus, V. mimicus* และ *V. fluvialis* พบว่า ค่า MIC เท่ากับ 15.62, 31.26, 31.26, และ 15.62 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 5 และตารางที่ 1

ก

ng/ml + - 125 62.5 31.26 15.62 7.81 3.90 1.95 0.97 0.48

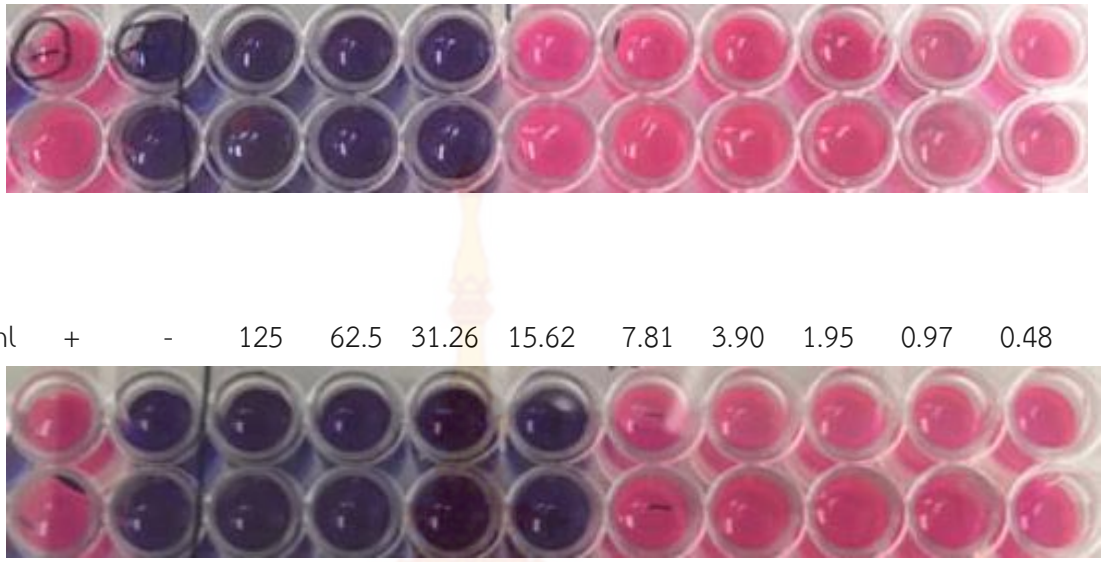


ข

ng/ml + - 125 62.5 31.26 15.62 7.81 3.90 1.95 0.97 0.48

ค

ng/ml + - 125 62.5 31.26 15.62 7.81 3.90 1.95 0.97 0.48



ภาพที่ 5 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคซิลเวอร์นาโน โดยวิธี Broth microdilution และ Rezazurin assay เปรียบเทียบกับชุดควบคุม tetracycline ความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ก.) *V.parahaemolyticus,* (ข.) *V. vulnificus*, (ค.) *V. mimicus*, (ง) *V. fluvialis*

3.4.3 การหาค่าความเข้นข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้ (Minimum Bactericidal Concentration; MBC)

ผลการทดสอบหาค่า MBC ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดบัวบกต่อเชื้อ *Vibrio spp.* 4 ชนิด คือ *V. parahaemolyticus, V. vulnificus, V. mimicus* และ *V. fluvialis* พบว่าที่ความเข้มข้น 31.26 , 62.5, 31.26, และ 15.62 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 มีความสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้า อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ได้จากสารสกัดพืชมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแม้ใช้ความเข้มน้อยและเพิ่มประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโน (กานต์พิมล, 2560)

ตารางที่ 1 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดบัวบก

แบคทีเรีย	**MIC** (ng/ml)	**MBC** (ng/ml)
V. parahaemolyticus	15.62	31.26
V. vulnificus	31.26	62.5
V. mimicus	15.62	31.26
V. fluvialis	15.62	15.62

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาระยะเวลาในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาดนจากสารสกัดหยาบใบบัวบกโดยการศึกษาเปรียบเทียบการสังเคราะห์ที่เวลาต่างๆ พบว่าสีของสารละลายเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งมีสีเข้มที่สุดที่ระยะเวลาการบ่ม 240 นาที และจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพบว่าค่าดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม โดยค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ระหว่างความยาวคลืน 431 ถึง 433 nm โดยอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีรูปทรงกลมชนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-100 นาโนเมตรเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TEM ซึ่งเอกลักษณ์ได้ทำการวิเคราะห์ด้วย FTIR พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio spp.* 4 ชนิด คือ *V. parahaemolyticus, V. vulnificus, V. mimicus* และ *V. fluvialis* พบอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้มีความสามารถในการยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียได้ทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างกัน ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาที่จะเป็นแนวทางในการนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดพืชมาเป็นสารต้านการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งต่อไป

บรรณานุกรม

กานต์พิมล กรไกร และรินา ภัทรามานนท์. 2560. อนุภาคเงินนาโนสังเคราะห์ด้วยสารสกัดจากพืชและความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์. วารสารวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ปีที่ 45 เล่มที่ 1

จินดาพร คงเดช. 2551. การผลิตสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชเพื่อใช้ในการผลิตเครื่องสำอาง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ์, คู่มือตการตรวจและวินิจฉัยโรคในกุ้งทะเล. ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์น้ำ สถาบันสัตว์แห่งชาติ. สืบค้นจาก www.dld.go.th/niah, V3 N2 (September – December 2008) หน้า 89 – 121. วันที่สืบค้น 9 พ.ค. 2562.

วีณา จิรัตฐิวรุตม์กุล ชัยสาร ดอกรัก ชัยสาร และณัฐพล เมฆแดง. 2557. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งขาว. สืบค้นจาก file:///C:/Users/dell/AppData/Local/Packages/Microsoft.MicrosoftEdge_8wekyb3d8bbwe/TempState/Downloads/Fulltext#1.pdf_402826%20(1).pdf. สืบค้นเมื่อ 15 พ.ค. 2562.

ปวีณา ปรวัฒน์กุล มณฑกานต์ ทองสม พรไพลิน ขาวสุข และตอยะบ๊ะ ดอเลาะหมิ. 2016. การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนแบบเคมีสีเขียวโดยใช้สารสกัดจากเปลือกมังคุดเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย. วารสารวิชชา. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช. V35. No.1

ฝ่ายบริการวิชาการอาหารสัตว์ บริษัท เบทาโกร จำกัด (มหาชน). 2014. คู่มือการเลี้ยงกุ้งขาว. เข้าถึงจาก http://betagrofeed.com/community/wp-content/uploads/2014/12/คู่มือการเลี้ยงกุ้งขาว.pdf. วันที่สืบค้น 9 พ.ค. 62.

สิริ ทุกข์วินาศ และชุติมา ขมวิลัย. (2545). แนวทางการพัฒนาอุตสาหกรรมกุ้งของประเทศไทย, วารสารกระประมง. 55, 3.

พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และ ปาริชาติ พุ่มขจร. 2553. การใช้สมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรคในปลา. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ปีที่12 ฉบับที่4 กรกฎาคม 2553 63 -71

มณฑกานต์ สมบูรณ์. 2552. ผลของแบคทีเรียสกุล Bacillus ชนิดต่างๆ ในการควบคุมแบคทีเรียวิบริโอ (*Vibrio* spp.) และคุณภาพน้ำในการอนุบาลลูกกุ้งและการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รัตติยากร อินทุใส. 2549. การศึกษาสาเหตุการเกิดอาการขี้ขาวในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abhilash M. Potential applications of Nanoparticles. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2010; V1(1):1-12.

Gudikandula, K., Vadapally, P. and Charya, M. A. S. 2017. Biogenic synthesis of silver nanoparticles from white rot fungi: Their characterization and antibacterial studies. OpenNana, Volume 2, 64-78.

Kappor, L.D. 2005. CRC Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants. CRC press LLC, Florida. pp. 208-209

Kathiresan, K., Nabeel, M. A., Gayathridevi, M., Asmathunisha, N. and Gopalakrisshnan, A. 2013. Synthesis of silver nanoparticles by coastal plant *Prosopis chilensis* (L.) and their efficacy in controlling vibriosis in shimp *Penaeus monodon*. Appl Nanosci. 3:65-73.

Rastog, R.P., Sarkar, B. and Dhar, M.L. 1960. "Chemical examination of Centella asiatica Linn. I, Isolation and the chemical constituents". J. Sci Ind Res sect B: 19: 252.

Sarker, S. D.*, Nahar, L. and Kumarasamy, Y. (2007) Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals, Methods 42, 321-324

Shaba, K. and A. K., D. 2017. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Centella asiatica* (L.) Urban. World journal of pharmaceutical research. Volume 6, issue3:1095-1105.

Singh, B. and Rastogi, R.P. 1969. "A reinvestigation of the triterpenes of Centella asiatica". Phytochem: 8: 917.

Nash, G., Nithimathachoke, C., Tungmandi, C., Arkarjamorn, A., Prathanpipat, P.,Ruamthaveesub, P. 1992. Vibriosis and its control in pond-reared Penaeus monodon in Thailand. In: Shariff, I. M.. Subasinghe, R. P.. Arthur, J. R.(eds.) Diseases in Asian aquaculture. I. Fish Health Section, Asian Fisheries Society. Manila. 143-155.

Ishimaru, K. M., Akagawa, M., and Muroga, K. Vibrio penaeicida sp nov.: A pathogen of kuruma shrimp (Penaeus japonicus). Int. J. Syst. Bacteriol. 1995; 1: 134–138.

Mendoza Uribe, Guadalupe, Rodríguez-López, José Luis. 2007.La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. Perfiles Latinoamericanos. 15(29):161-186.

Wang, J. C., Neogi, P., and Forciniti, D. 2006. On one-dimensional self-assembly of surfactantcoated nanoparticles. The Journalof Chemical Physics 125(19): 194717-6.

Xiu, Z. M., Zhang, Q. B., Puppala, H. L., Colvin, V. L. and Alvarez, P. J. 2012. Negligible particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. Nana Lett. 12, 4271-4275.