The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences

Volume 29
Issue 3 *2005 (issue 3-4)*

Article 8

1-1-2005

In Vitro Inhibitory Effect of Turmeric Extract from Curcuma longa on Shrimp Pathogenic Vibrios(ผลของสารสกัดขมิ้นชันต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อวิบร...

Pomchai Rojsitthisak

Yanin Limpanon

Nutchanart Thipmongkolsilp

Bang-on Kongtong

Janenuj Wongtavatchai

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/tjps

Part of the Pharmacology Commons

Recommended Citation

Rojsitthisak, Pomchai; Limpanon, Yanin; Thipmongkolsilp, Nutchanart; Kongtong, Bang-on; and Wongtavatchai, Janenuj (2005) "In Vitro Inhibitory Effect of Turmeric Extract from Curcuma longa on Shrimp Pathogenic Vibrios(ผลของสารสกัดขมิ้นชันต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อวิบร...," *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*: Vol. 29: Iss. 3, Article 8.
DOI: https://doi.org/10.56808/3027-7922.2238
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/tjps/vol29/iss3/8

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

Original Article

In Vitro Inhibitory Effect of Turmeric Extract from *Curcuma longa* on Shrimp Pathogenic Vibrios

Pornchai Rojsitthisak[1], Yanin Limpanon[2], Nutchanart Thipmongkolsilp[2], Bang-on Kongtong[1] and Janenuj Wongtavatchai[2,*]

[1]*Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330*
[2]*Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330*
* *Corresponding author. Tel & Fax: 02-2189591, E-mail address: Janenuj.W@chula.ac.th*

Abstract

The commercially available turmeric extract from *Curcuma longa* L. was standardized and evaluated for antibacterial activity against shrimp pathogenic vibrios. High-performance liquid chromatographic determination of the extract revealed 99.42% of the total active compounds, namely curcuminoids, consisting of curcumin (72.29%), desmethoxycurcumin (23.50%) and bisdesmethoxy-curcumin (3.63%). The antibacterial activity of the extract was subsequently tested *in vitro* against twenty vibrio isolates. The vibrios were isolated from hepatopancreas of the diseased shrimps collected from different culture areas of Thailand and Vietnam, and identified by API-20 system (BioMerieux). Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of the extract determined by agar dilution method were ≤ 512 μg/ml (64-512 μg/ml). Analysis of MIC values indicated that 50% of the tested isolates were susceptible to the extract at 256 μg/ml (MIC_{50}) while 90% of the tested isolates were susceptible to 512 μg/ml (MIC_{90}). The study demonstrated the antivibrio activity of the standardized turmeric extract, thus, suggesting the potential use of the naturally extracted compound as an alternative to antimicrobial chemicals for the treatment of vibriosis in shrimp culture.

Key words

Turmeric, Curcumin, Minimum inhibitory concentration, Vibrio, Shrimp

นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของสารสกัดขมิ้นชันต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อวิบริโอก่อโรคในกุ้งทะเล

พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์ [1], ญาณิน ลิมปานนท์ [2], นุชนารถ ทิพย์มงคลศิลป์ [2], บังอร กงทอง [1] และ เจนนุช ว่องธวัชชัย [2,*]

[1] *ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 10330*

[2] *ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 10330*

* *ผู้เขียนที่สามารถติดต่อได้ โทรศัพท์และโทรสาร: 02-2189591, ที่อยู่ทางอิเลคโทรนิค : Janenuj.W@chula.ac.th*

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้นำสารสกัดจากขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L., Turmeric) ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดมาตรวจสอบหาปริมาณสารสำคัญ และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสกุลวิบริโอที่แยกได้จากกุ้งทะเลป่วย ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชันด้วยวิธี High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าสารสกัดขมิ้นชันมีสารสำคัญ curcuminoids ในปริมาณ 99.42% ซึ่งประกอบไปด้วยสาร 3 ชนิด ได้แก่ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin ในปริมาณ 72.29, 23.50 และ 3.63% ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันดังกล่าวในการยับยั้งการเจริญของเชื้อวิบริโอด้วยวิธี agar dilution method โดยทดสอบกับเชื้อวิบริโอที่แยกจาก hepatopancreas ของกุ้งทะเลป่วย ซึ่งเก็บจากเขตพื้นที่การเลี้ยงต่างๆ ของประเทศไทยและเวียตนาม จำนวน 20 isolates และที่ได้ผ่านการจำแนกชนิดของเชื้อวิบริโอตามคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API-20 (BioMerieux) ผลการทดสอบพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อวิบริโอ (Minimum Inhibitory Concentrations; MICs) ≤ 512 μg/ml (64-512 μg/ml) โดยความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อวิบริโอที่ทดสอบได้ 50% (MIC_{50}) และ 90% (MIC_{90}) เท่ากับ 256 μg/ml และ 512 μg/ml ตามลำดับ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ในการศึกษามีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเพื่อเป็นทางเลือกสำหรับใช้เป็นสารต้านจุลชีพเพื่อรักษาโรคติดเชื้อวิบริโอในกุ้งทะเล

กุญแจคำ

สารสกัดขมิ้นชัน, เคอร์คิวมินอยด์, ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ, วิบริโอ, กุ้งทะเล

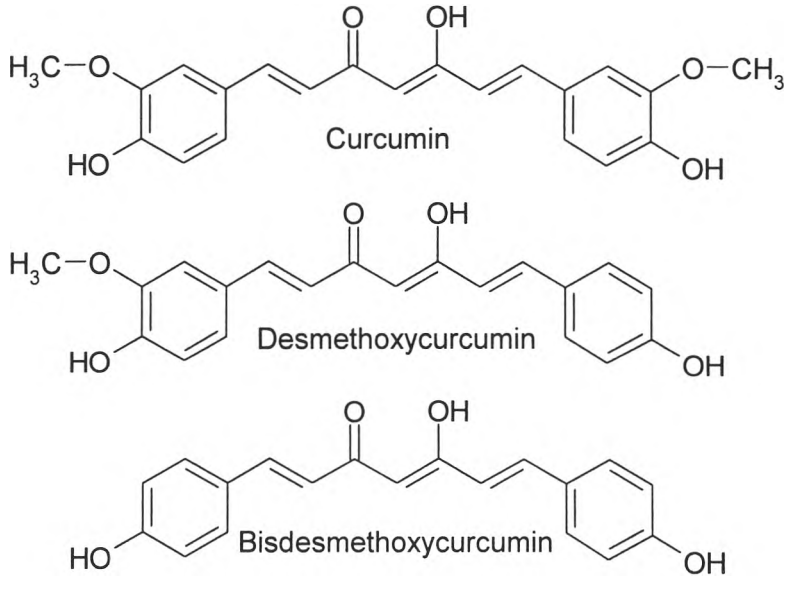
บทนำ

กุ้งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญต่อการส่งออกของประเทศไทย ในปีพ.ศ. 2547 ประเทศไทยส่งออกกุ้งปริมาณ 240,945.28 ตัน คิดเป็นมูลค่า 67,311.56 ล้านบาท (1) สำหรับการเลี้ยงกุ้งเป็นระบบอุตสาหกรรมต้องประสบกับการสูญเสียผลผลิตเนื่องจากการเกิดโรคติดเชื้อในบ่อเพาะเลี้ยง โดยการติดเชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กุ้งตายในระหว่างการเพาะเลี้ยงและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคในกุ้งที่เพาะเลี้ยง คือ แบคทีเรียในสกุลวิบริโอ ทำให้มีการใช้ยาต้านจุลชีพหรือสารเคมีชนิดต่างๆ ในการควบคุมการติดเชื้อวิบริโอในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง และพบว่าการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างไม่ถูกต้องก่อให้เกิดปัญหาทั้งในด้านการควบคุมโรคในกุ้ง เช่น แบคทีเรียเกิดความต้านทานต่อยาทำให้การใช้ยาต้านจุลชีพไม่ได้ผล เกิดการตกค้างของยาในเนื้อเยื่อกุ้งซึ่งอาจไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค (2-3) ดังเช่นปัญหา

เรื่องสารตกค้างในกุ้งที่ส่งออกไปยังสหภาพยุโรปและสหรัฐอเมริกาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 สารตกค้างที่เป็นปัญหาหลัก ได้แก่ ยาต้านจุลชีพในกลุ่มไนโตรฟูแรน (Nitrofurans) คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol) และอิมิดาโซล (Imidazole) ซึ่งห้ามใช้ในสัตว์เพื่อการบริโภค เนื่องจากการจำกัดชนิดของยาต้านจุลชีพที่ใช้ในสัตว์ที่เป็นอาหารและปัญหายาสัตว์ตกค้างในเนื้อกุ้ง ทำให้เกษตรกรและผู้วิจัยทำการทดสอบการใช้สมุนไพรไทยชนิดต่างๆ ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ โดยการผสมสมุนไพรในอาหารกุ้งทดแทนการใช้ยาต้านจุลชีพ (3)

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) เป็นพืชล้มลุกมีเหง้าอยู่ใต้ดิน เนื้อในของเหง้าขมิ้นชันมีสีเหลืองเข้มจนสีแสดจัด มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ใบรูปเรียวยาว ปลายแหลมคล้ายใบพุทธรักษา ดอกออกเป็นช่อ มีก้านช่อแทงจากเหง้าโดยตรง ออกตรงกลางระหว่างใบคู่ในสุด ดอกสีขาว มีแถบสีเหลืองคาด มีกลีบประดับสีขาวหรือเขียว สำหรับส่วนหัวและเหง้า (rhizome) ถูกนำมาใช้เป็นประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ใช้เป็นสารแต่งสีเหลือง เป็นเครื่องเทศ ปรุงแต่งกลิ่นและรสในอาหาร และนิยมใช้ในเครื่องสำอาง สบู่ ครีมนวดผิว แชมพูสระผม และโลชั่นต่างๆ ส่วนเหง้าทั้งแบบสดและแห้งสามารถนำมาทำเป็นยา โดยเหง้าของขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ลดการอักเสบ และมีฤทธิ์ในการขับน้ำดี น้ำมันหอมระเหยในขมิ้นชันมีสรรพคุณบรรเทาอาการปวดท้อง ท้องอืด แน่นจุกเสียด (4) สารสำคัญที่พบในเหง้าของขมิ้นชันประกอบด้วยสารหลัก 2 ประเภท คือ 1) น้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีสารประกอบหลัก ได้แก่ aromatic turmerone, α-turmerone และ β-turmerone และ 2) curcuminoids ซึ่งเป็นสารสีส้ม ประกอบด้วย curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin (5) (รูปที่ 1)

curcuminoids มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial) (6) ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) (7-9) ต้านอักเสบ (anti-inflammatory) (10-13) ต้านปรสิต (antiparasite) (14) ต้านการกลายพันธุ์ (antimutagenic) (15) ต้านและป้องกันมะเร็ง (chemoprotective และ anticancer) (16-19) และ ฤทธิ์ป้องกันความเป็นพิษต่อตับ (hepatoprotective) (20) จากการทดสอบความเป็นพิษของ curcuminoids นั้น ไม่พบความเป็นพิษเมื่อใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน (21) จากข้อมูลด้านเภสัชวิทยาและพิษวิทยาข้างต้น มีความเป็นไปได้อย่างสูงว่า curcuminoids จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อวิบริโอก่อโรคในกุ้ง นอกจากนี้ ความเป็นพิษที่ต่ำมากทำให้ curcuminoids มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้เป็นส่วนผสมในอาหารกุ้ง เพื่อการป้องกันหรือรักษาโรคติดเชื้อในกุ้ง



รูปที่ 1. โครงสร้างทางเคมีของ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin

เนื่องจากสารสกัดจากสมุนไพรมักประกอบไปด้วยสารเคมีหลายชนิด โดยสารแต่ละชนิดอาจมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และความเป็นพิษที่ไม่เท่ากันหรือแตกต่างกัน ทั้งนี้ หากสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดมีปริมาณไม่สม่ำเสมอในแต่ละครั้งของการผลิต เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาใช้เป็นยาหรืออาหารเสริมย่อมทำให้เกิดปัญหาด้านความไม่แน่นอนในการออกฤทธิ์ ด้วยเหตุนี้ การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดสมุนไพร จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทราบปริมาณที่แน่นอนของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดที่นำมาศึกษา โดยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่พบในสารสกัดหนึ่ง ๆ ก็จะเป็นฤทธิ์ของสารสกัดที่ประกอบไปด้วยสารสำคัญแต่ละชนิดในอัตราส่วนที่คงที่ ดังนั้น ข้อมูลด้านเคมีขององค์ประกอบในสารสกัดที่ศึกษาจึงมีความจำเป็นและมีประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัด การนำสารสกัดที่มีมาตรฐาน (standardized extract) ไปใช้จึงสามารถลดปัญหาด้านความไม่แน่นอนของการออกฤทธิ์ และสามารถใช้เป็นมาตรฐานอ้างอิงในการนำไปศึกษาและพัฒนาต่อไป

ในการศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อวิบริโอก่อโรคในกุ้งทะเลโดยมีการควบคุมคุณภาพของสารสกัดก่อนนำมาศึกษา โดยสารสกัดขมิ้นชันที่นำมาใช้ศึกษาเป็นสารสกัดที่มีจำหน่ายอยู่ในท้องตลาด โดยนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ curcuminoids 3 ชนิด ได้แก่ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin เพื่อให้สารสกัดที่นำมาใช้เป็นสารสกัดที่มีมาตรฐาน ซึ่งผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อวิบริโอก่อโรคในกุ้งอาจเป็นทางเลือกให้แก่เกษตรกรในการใช้ทดแทนยาต้านจุลชีพ และเนื่องจากสารสกัดขมิ้นชันได้จากสมุนไพรธรรมชาติ ที่มีรายงานว่ามีความปลอดภัยสูง จึงสามารถหลีกเลี่ยงจากปัญหาการตกค้างของยาต้านจุลชีพในเนื้อกุ้ง นอกจากนี้ยังเป็นการส่งเสริมการใช้ทรัพยากรของประเทศไทยโดยไม่ต้องนำเข้ายาหรือสารเคมีจากต่างประเทศ

วัสดุและวิธีวิจัย

สารเคมี

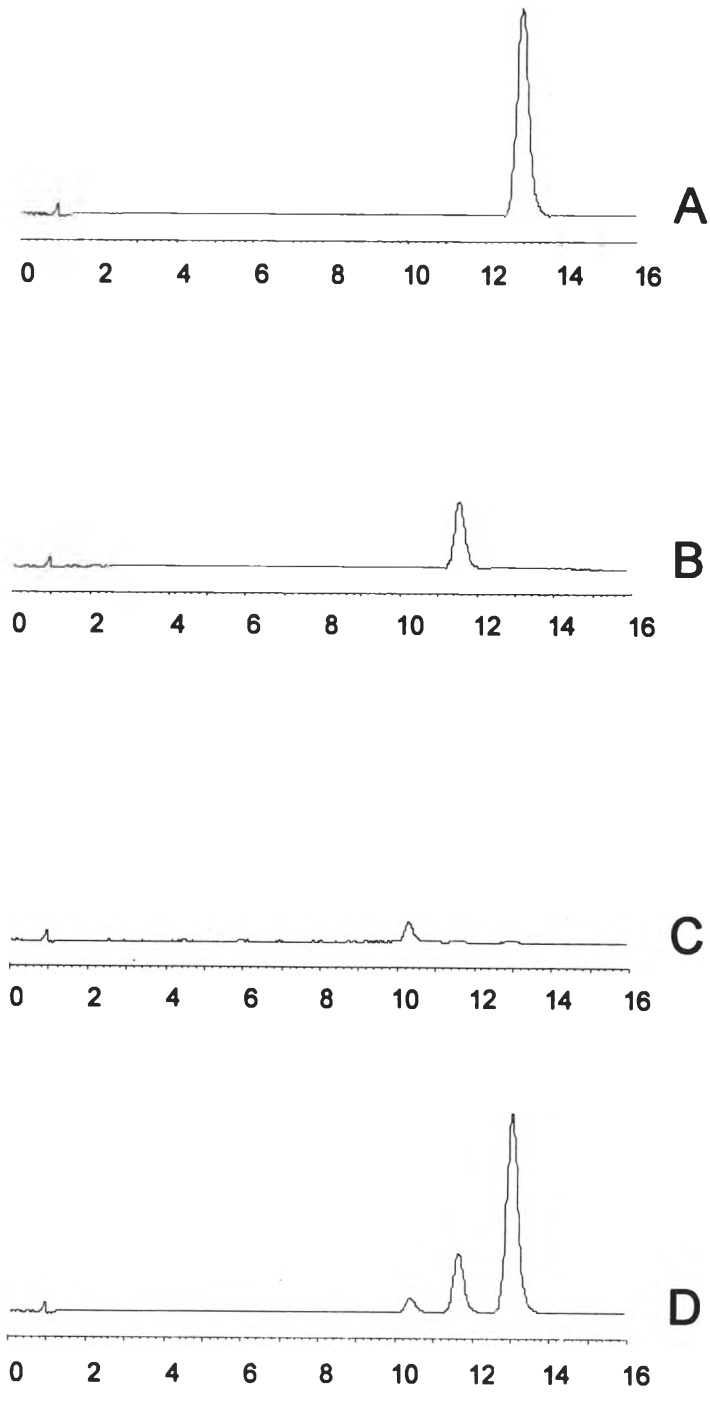
สารบริสุทธิ์ curcumin (99.56%), desmethoxycurcumin (98.77%) และ bisdesmethoxycurcumin (98.05%) ได้ถูกเตรียมขึ้นสำหรับใช้เป็นสารมาตรฐาน โดยแยกจากผงขมิ้นชันด้วยเทคนิค column chromatography และทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึก การพิสูจน์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของสารทั้ง 3 ชนิด ใช้เทคนิค spectroscopy และ high-performance liquid chromatography (HPLC) (22) สำหรับสารสกัดขมิ้นชันได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท อุตสาหกรรมไทย-จีนเครื่องหอม จำกัด Chloramphenicol เป็นของ Sigma และตัวทำละลายอื่น ๆ ได้แก่ methanol acetonitrile และ glacial acetic acid เป็นของ Labscan

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชัน

เตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin แต่ละชนิดใน methanol ให้มีความเข้มข้น 0.3, 0.2 และ 0.2 mg/ml แล้วเจือจางด้วย 50% methanol ให้มีความเข้มข้น 0.03, 0.01, 0.002 mg/ml ตามลำดับ สารละลายของสารสกัดขมิ้นชันนั้นเตรียมใน methanol ให้มีความเข้มข้น 0.40 mg/ml แล้วเจือจางด้วย 50% methanol ให้มีความเข้มข้น 0.04 mg/ml ฉีดสารละลายเข้า HPLC system (Shimadzu, Japan) โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (HiQsil®, 4.6 mm × 150 mm, 5μ) ควบคุมอุณหภูมิที่ 33°C มีวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น acetonitrile และ 2% acetic acid (40:60, v/v) ด้วยอัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 2.0 ml/min ใช้ UV-Visible detector ตรวจวัดสารที่ 425 nm โดยฉีดสารละลายตัวอย่างที่ปริมาตรเท่ากับ 20 μl บันทึก HPLC chromatogram (รูปที่ 2) และ peak area ของสารละลายที่ฉีด คำนวณหาปริมาณ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin

การแยกเชื้อวิบริโอที่ใช้ในการศึกษาจากกุ้งป่วย

เก็บตัวอย่างกุ้งป่วยจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีกุ้งแสดงอาการป่วย เช่น ว่ายเกยขอบบ่อ และกินอาหารลดลง จากนั้น



รูปที่ 2. HPLC chromatograms ของสารละลาย curcumin 0.03 mg/ml (A), desmethoxycurcumin 0.01 mg/ml (B), bisdesmethoxycurcumin 0.002 mg/ml (C) และสารสกัดขมิ้นชัน 0.04 mg/ml (D)

ทำการแยกเชื้อวิบริโอจากกุ้งดังกล่าว โดยการเพาะเชื้อจาก hepatopancreas ของกุ้งป่วยลงใน Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) agar ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับวิบริโอ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเลือกเฉพาะเชื้อที่ขึ้นได้โคโลนีที่เป็นสีเขียวหรือสีเหลืองมาพิสูจน์เชื้อโดยการย้อมแกรม oxidase test และวิธีทางชีวเคมีดังแสดงในตารางที่ 1 โดยใช้ API 20E® หรือ API 20NE® (Bio-Merieux)

การทดสอบระดับความไวรับของเชื้อมาตรฐานต่อยาต้านจุลชีพ

การควบคุมคุณภาพงานนั้น ทำโดยการทดสอบระดับความไวรับของเชื้อมาตรฐานต่อยาต้านจุลชีพ โดยการหาค่า MIC ของ chloramphenicol ต่อเชื้อมาตรฐาน 3 ชนิด คือ *Escherichia coli* ATCC® (American Type Culture Collection) 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 และ *Vibrio parahemolyticus* ATCC® 17802 ซึ่งทำตามขั้นตอนต่าง ๆ ที่ระบุใน NLCCS (23)

การทดสอบความไวรับของเชื้อวิบริโอต่อสารสกัดขมิ้นชัน

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดขมิ้นชันที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อวิบริโอ (Minimum Inhibitory Concentrations; MICs) ด้วยวิธี Antimicrobial Agar Dilution Susceptibility Tests ทำตามมาตรฐานของ National Committee of Clinical Laboratory Standard ปี ค.ศ. 2000 (23) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. การเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 ละลายสารสกัดขมิ้นชัน ด้วย 0.1 N NaOH จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 10240 μg/ml และทำ Two-Fold Dilution ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 10240-10 μg/ml

1.2 เจือจางสารสกัดที่เตรียมขึ้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วย Mueller-Hinton Agar (MHA) ในอัตราส่วน 1:10 โดยดูดสารละลายของสารมา 2 ml ใส่ลงใน MHA 18 ml จะได้ MHA ที่มีสารสกัดตามความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบที่ 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 และ 1 μg/ml

2. การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

2.1 เตรียมเชื้อมาตรฐาน 3 ชนิด สำหรับการ inoculate แต่ละครั้งเพื่อควบคุมคุณภาพของงาน เชื้อมาตรฐานที่ใช้ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 และ *Vibrio parahemolyticus* ATCC® 17802 โดยเพาะเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ลงใน Tryptic Soy Agar (TSA) ส่วนเชื้อ *V. parahemolyticus* จะต้องผสมเกลือ 1% ลงใน TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่ได้มาใส่ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ปรับให้ได้ความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland ซึ่งจะมีเชื้ออยู่ประมาณ 10^8 CFU/ml เจือจางในน้ำเกลือลงอีก 10 เท่า ได้ปริมาณเชื้อประมาณ 10^7 CFU/ml (23)

2.2 เพาะเชื้อวิบริโอลงใน TSA ที่ผสมเกลือ 1% เช่นเดียวกับการเตรียมเชื้อมาตรฐาน *V. parahemolyticus*

3. การทดสอบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารสกัดขมิ้นชัน

3.1 ใส่เชื้อที่เตรียมในหลุม multipoint inoculator ซึ่งใส่เชื้อได้ 25 isolates โดยแบ่งเป็นที่สำหรับใส่เชื้อมาตรฐานได้ 3 isolates และสำหรับใส่เชื้อวิบริโอทดสอบได้ 22 isolates

3.2 ถ่ายเชื้อจากหลุมลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันไว้แล้ว จะได้จุดเชื้อซึ่งมีเชื้อประมาณ 10^4 CFU/spot

3.3 เมื่อใช้ multipoint inoculator ถ่ายเชื้อลงใน MHA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันไว้แล้ว ทิ้งไว้จนจุดที่ถ่ายเชื้อแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดขมิ้นชันที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ บันทึกเป็นค่า MIC

3.4 วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม WHONET5 (24)

ตารางที่ 1. การจำแนกชนิดของเชื้อ vibrios ตามคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี (25-28)

	V. alginolyticus	*V. cholerae*	*V. damsela*	*V. fluvialis*	*V. parahaemolyticus*	*V. vulnificus*
Colony on TCBS	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Green	Green / Yellow
Growth at 42°C	+	+	-	v	+	+
Gram stain	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Cell morphology	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod
Catalase	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+
Decarboxylation of						
- arginine	-	-	+	+	-	-
- lysine	+	+	d[1] / v[2]	-	+	+
- ornithine	d[1] / +[2]	d[1] / +[2]	-	-	d[1] / +[2]	v[1] / +[2]
Citrate utilization	d	d	-	-	d	d
H_2S production	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+[1] / v[2]	+	-	-	-
Growth in NaCl						
- 0%	-	+	-	-	-	-
- 3%	+	+	+	+	+	+
- 6%	+	d[1] / -[2]	d[1] / v[2]	d[1] / +[2]	d[1] / +[2]	+
- 8%	+	-	-	v	+	-
- 10%	+	-	-	-	-	-
Acid production from						
- salicin	d	-	-	d	-	+
- lactose	-	-	-	-	-	+
- arabinose	-	-	-[1] / +[2]	+	d[1] / +[2]	-
- sucrose	d[1] / +[2]	+	-	+	-	-
- sorbitol	-	-	-	-	-	-
- mannitol	+	+	-[1] / +[2]	+	+	d[1] / v[2]
- mannose	+	+	+	+	+	+
- D-cellobiose	-	-	+	+	v	+
Synthesis indole	+	+	-	d	+	+
Synthesis urease	-	-	+	-	-[1] / v[2]	-
Synthesis gelatinase	+	+	-	+	+	+
ONPG	-	+	-	+	-	+
Susceptible to						
- 10 µg/kg O/129	R	S	S	R	R	S
- 150 µg/kg O/129	S	S	S	S	S	S

หมายเหตุ:

- ● = โคโลนีของเชื้อส่วนใหญ่มีสีเขียว
- \+ = 85-100% ที่ให้ผลบวก
- \- = 0-15% ที่ให้ผลบวก
- d = 16-80% ที่ให้ผลบวก
- v = ผลแปรผัน

1 = อ้างจาก (25-27)
2 = อ้างจาก (28)
S = มีความไวรับ
R = มีความต้านทาน
ONPG = o-nitro-beta-D-galactopyranoside hydrolysis by beta-galactosidase
O/129 = vibrio static agent: 2,4-diamino-6,7-di-isopropylpteridine

ผลการทดลอง

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชันโดยวิธี HPLC

จากการวิเคราะห์ปริมาณ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin ในสารสกัดขมิ้นชันด้วย HPLC ได้ chromatogram ดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่า สารสกัดขมิ้นชันให้พีคเกิดขึ้นที่ retention time ประมาณ 12.97, 11.58 และ 10.33 นาที สอดคล้องกับพีคของสารมาตรฐาน curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin ตามลำดับ จากการคำนวณพบว่าสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อวิบริโอก่อโรคในกุ้ง ประกอบไปด้วยปริมาณสารสำคัญคือ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdes-methoxycurcumin เท่ากับ 72.29%, 23.50% และ 3.63% ตามลำดับ และมีปริมาณของ curcuminoids รวมเท่ากับ 99.42%

การแยกเชื้อวิบริโอที่ใช้ในการศึกษาจากกุ้งป่วย

เมื่อเก็บตัวอย่างกุ้งป่วยจากพื้นที่การเลี้ยงในจังหวัดกระบี่ ระยอง นครศรีธรรมราช จันทบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ปัตตานี และชุมพร และจากเมือง Nha Trang ประเทศเวียตนาม พบว่าเชื้อวิบริโอที่แยกจากกุ้งป่วยจำนวน 20 isolates สามารถจำแนกได้เป็น *V. alginolyticus* 2 isolates, *V. cholerae* 1 isolate, *V. damsela* 2 isolates, *V. fluvialis* 8 isolates, *V. parahaemolyticus* 6 isolates และ*V. vulnificus* 1 isolate (ตารางที่ 1) นำเชื้อวิบริโอที่แยกไปใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อวิบริโอก่อโรคในกุ้ง

ผลการทดสอบระดับความไวรับของเชื้อมาตรฐานต่อยาต้านจุลชีพและสารสกัดขมิ้นชัน ได้แสดงในตารางที่ 2 โดยพบว่าค่า MIC ของ chloramphenicol เท่ากับ 2 μg/ml สำหรับเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* และ เท่ากับ 1 μg/ml สำหรับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ส่วนค่า MIC ของสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด มีค่าเท่ากัน คือ 625 μg/ml (ตารางที่ 2) สำหรับการศึกษาความไวรับของเชื้อวิบริโอที่เป็นสาเหตุของกุ้งป่วยต่อสารสกัดขมิ้นชัน พบว่าค่า MIC ของสารสกัดขมิ้นชันอยู่ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 64-512 μg/ml (ตารางที่ 3) โดยค่า MIC_{50} (Minimum Inhibitory Concentration 50%) และ MIC_{90} (Minimum Inhibitory Concentration 90%) เท่ากับ 256 และ 512 (g/ml ตามลำดับ (รูปที่ 3, ตารางที่ 4)

อภิปรายผล

การศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรแต่ละครั้งนั้นมักมีความแปรปรวนเนื่องจากความไม่แน่นอนของปริมาณสารออกฤทธิ์ที่เกิดจากตัววัตถุดิบในการศึกษา และกระบวนการในการสกัด กล่าวคือ 1) ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่มีในวัตถุดิบ และ 2) กระบวนการเตรียมสารสกัดหยาบแตกต่างกันในแต่ละการศึกษา ดังนั้น ในการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อวิบริโอในกุ้งทะเล จึงควรมีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ เพื่อให้สามารถระบุขนาดหรือปริมาณ (dose) ของสารสำคัญในการยับยั้งเชื้อ และเปรียบเทียบผลที่ได้กับการศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ

ตารางที่ 2. ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานของยา Chloramphenicol (positive control) และสารสกัดขมิ้นชัน

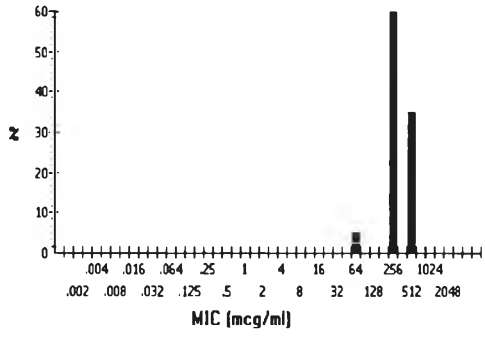
สารทดสอบ	เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน	MIC (μg/ml)	
		ผลการทดสอบ	ค่าอ้างอิง*
Chloramphenicol	*E. coli*	2	2-8
	S. aureus	2	2-8
	V. parahaemolyticus	1	-
สารสกัดขมิ้นชัน	*E. coli*	256	-
	S. aureus	256	-
	V. parahaemolyticus	256	-

* Acceptable quality control limits of MICs ตามมาตรฐาน NCCLS (23)

ตารางที่ 3. ค่า MIC ของสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อ vibrios ที่แยกจากกุ้งป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทยและเวียตนาม

No.	Isolation	Region	MIC (μg/ml)
1	*V. alginolyticus*	กระบี่	256
2	*V. alginolyticus*	ระยอง	256
3	*V. cholerae*	นครศรีธรรมราช	256
4	*V. damsela*	ระยอง	256
5	*V. damsela*	Nha Trang	256
6	*V. fluvialis*	กระบี่	512
7	*V. fluvialis*	จันทบุรี	512
8	*V. fluvialis*	นครศรีธรรมราช	512
9	*V. fluvialis*	ประจวบคีรีขันธ์	256
10	*V. fluvialis*	ประจวบคีรีขันธ์	256
11	*V. fluvialis*	ปัตตานี	512
12	*V. fluvialis*	ระยอง	256
13	*V. fluvialis*	Nha Trang	256
14	*V. parahaemolyticus*	กระบี่	512
15	*V. parahaemolyticus*	ชุมพร	64
16	*V. parahaemolyticus*	นครศรีธรรมราช	512
17	*V. parahaemolyticus*	ปัตตานี	256
18	*V. parahaemolyticus*	ปัตตานี	512
19	*V. parahaemolyticus*	ระยอง	512
20	*V. vulnificus*	ระยอง	256

รูปที่ 3 และ ตารางที่ 4. ค่า MIC_{50} และ MIC_{90} ของสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อ vibrios ที่แยกจากกุ้งป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทยและเวียตนาม



	MIC (μg/ml)		
	MIC_{50} [1]	MIC_{90} [2]	MIC Range [3]
Curcuminoids	256	512	64-512

[1]Minimum Inhibitory 50%

[2]Minimum Inhibitory 90%

[3]Range of MIC observed in 20 pathogenic vibrio isolates

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชันโดยวิธี reversed-phase HPLC ด้วยคอลัมน์ชนิด C18 พบว่า curcumin เคลื่อนที่ได้ช้าที่สุด (ค่า retention time สูงสุด) โดย desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin เคลื่อนที่ได้เร็วขึ้นและเร็วที่สุดตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin พบว่าสารแต่ละชนิดมีโครงสร้างต่างกันที่จำนวนหมู่ methoxy ($-OCH_3$) ในโมเลกุล ซึ่งหมู่ methoxy จัดเป็นหมู่ที่ non-polar ส่งผลให้ curcumin ซึ่งมี methoxy 2 หมู่ มีความชอบไขมัน (lipophilicity) มากกว่าสารอีก 2 ชนิด ทำให้มีความชอบต่อวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) บนคอลัมน์ได้ดีกว่า จึงทำให้สารเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้ช้ากว่า ในทำนองเดียวกัน desmethoxycurcumin ซึ่งมี methoxy 1 หมู่ ย่อมเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า bisdesmethoxycurcumin เนื่องจาก lipophilicity สูงกว่า ในขณะที่ bisdesmethoxycurcumin ไม่มีหมู่ methoxy ทำให้เคลื่อนที่ได้เร็วที่สุด

จาก chromatogram ของสารสกัดขมิ้นชันที่นำมาศึกษา พบว่า สารสกัดขมิ้นชันให้พีคจำนวน 3 พีค ที่มีค่า retention time สอดคล้องกับพีคบน chromatogram ของสารมาตรฐาน curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้เป็นสาร curcuminoids ซึ่งมีปริมาณรวมเท่ากับ 99.42% ประกอบไปด้วย curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin ในปริมาณเท่ากับ 72.29%, 23.50% และ 3.63% ตามลำดับ โดยฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อวิบริโอที่แยกจากกุ้งป่วยในการศึกษาครั้งนี้ จัดว่าเป็นฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันที่มีอัตราส่วนของ curcumin : desmethoxycurcumin : bisdesmethoxycurcumin เท่ากับ 72.29 : 23.50 : 3.63 ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนโดยประมาณเท่ากับ 20 : 6.5 : 1 ตามลำดับ

การควบคุมคุณภาพงานด้วยการทดสอบระดับความไวรับของเชื้อมาตรฐานต่อยาต้านจุลชีพนั้น ผลการทดสอบในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าค่า MIC ของ chloramphenicol ต่อเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* นั้นอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์มาตรฐานของ NCCLS (23) แต่สำหรับค่า MIC ของ chloramphenicol ต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ ค่า MIC ที่จะได้จากการทดสอบสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อมาตรฐานทั้ง

3 ชนิด นั้นยังไม่มีค่ามาตรฐาน ค่า MIC ที่ได้จึงถือเป็นการเก็บข้อมูลสำหรับใช้เป็นประโยชน์ในการอ้างอิงเปรียบเทียบกับการทดสอบสารสกัดขมิ้นชันในครั้งอื่น ๆ ต่อไป

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อวิบริโอ พบว่าค่า MIC_{50} ของสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อวิบริโอ มีค่าเท่ากับ 256 μg/ml หากพิจารณาค่าดังกล่าวให้อยู่ในหน่วยของ μmol/ml โดยการคำนวณมวลโมเลกุลของสารสกัดขมิ้นชันด้วยวิธีการหาค่าเฉลี่ยแบบถ่วงน้ำหนัก ซึ่งขึ้นกับปริมาณและมวลโมเลกุลของสารสำคัญแต่ละชนิดในสารสกัด โดย curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin มีปริมาณและมวลโมเลกุลเท่ากับ 72.29%, 368.39; 23.50%, 338.36; และ 3.63%, 308.34 ตามลำดับ จะได้ว่า มวลโมเลกุลเฉลี่ยของสารสกัดที่ใช้ในการศึกษา เท่ากับ 357.01 ดังนั้น ค่า MIC_{50} ของสารสกัดต่อเชื้อวิบริโอ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 256 μg/ml สามารถคิดได้เป็น 0.72 μmol/ml เมื่อเปรียบเทียบค่าดังกล่าวกับค่า MICs ที่ได้จากการศึกษาของ Mishra และคณะ (6) ซึ่งรายงานค่า MICs ของสารบริสุทธิ์ curcumin ต่อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *E. coli, S. aureus, S. epidermidis* และ *Enterococus* ในช่วง 10-20 μmol/ml แสดงให้เห็นว่า ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อวิบริโอโดยสารสกัดขมิ้นชันมีประสิทธิภาพที่สูง ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากฤทธิ์ที่ไม่เท่ากันของสารสำคัญแต่ละชนิดในสารสกัดขมิ้นชัน นอกจากนี้ยังอาจมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของเชื้อที่ใช้ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากไม่พบการรายงานของค่า MIC ต่อเชื้อวิบริโอที่แยกจากกุ้งทะเล ทำให้ไม่สามารถนำค่า MIC มาเปรียบเทียบกับผลการศึกษาในครั้งนี้

จากผลการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดขมิ้นชันมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นสารต้านเชื้อจุลชีพในกุ้ง รวมทั้งแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้สารสกัดขมิ้นชันสำหรับเป็นส่วนผสมในอาหารเพื่อป้องกันและยับยั้งการติดเชื้อวิบริโอก่อโรคในกุ้ง ผลการศึกษาเบื้องต้นในครั้งนี้ สนับสนุนให้สมควรทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันดังกล่าวต่อเชื้อวิบริโอก่อโรคในกุ้งต่อไปให้ได้รวมไม่น้อยกว่า 50 isolates เพื่อให้ได้ค่า MIC ที่มีความครอบคลุมมากขึ้น ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการคำนวณขนาดของสารสกัดที่เหมาะสมสำหรับเตรียมอาหารกุ้งที่มีสารสกัดขมิ้นชันเป็นส่วนประกอบ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.), สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ทุนวิจัยเลขที่ DBG 4880004 และ ทุนโครงการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองประมงระหว่างประเทศ กรมประมง. *ปริมาณและมูลค่าการส่งออกสินค้าประมงประเภทต่างๆ*. 2548. [Online] เข้าถึงโดย: http://www.fisheries.go.th
2. S. Gräslund, K. Karisson, and J. Wongtavatchai. Responsible use of antibiotics in shrimp farming. *Aquaculture Asia Magazine* **7**:3 (2002).
3. เจนนุช ว่องธวัชชัย. *ผลของยาและสารเคมีต่อสุขภาพกุ้ง*. รายงานการวิจัย การรวบรวมวิเคราะห์และสังเคราะห์งานวิจัยกุ้งทะเลของประเทศไทย, สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพมหานคร, 2547, หน้า 249-275.
4. องค์การเภสัชกรรม. *ขมิ้นชัน*. 2548. [Online]. เข้าถึงโดย : http:// www.gpo.or.th
5. G. K. Jayaprakasha, L. J. M. Rao, and K. K. Sakariah. Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 3668-3672 (2002).
6. S. Mishra, U. Narain, R. Mishra, and K. Misra. Design, development and synthesis of mixed bioconjugates of piperic acid-glycine, curcumin-glycine/alanine and curcumin-glycine-piperic acid and their antibacterial and antifungal properties. *Bioorg. Med. Chem.* **13**: 1477-1486 (2005).
7. L. N. Grinberg, O. Shalev, H. H. Tønnesen, and E. A. Rachmilewitz. Studies on curcumin and curcuminoids: XXVI. Antioxidant effects of curcumin on the red blood cell membrane. *Int. J. Pharm.* **132**: 251-257 (1996).
8. F. Bonte, M. S. Noel-Hudson, J. Wepierre, and A. Meybeck. Protective effect of curcuminoids on epidermal skin cells under free oxygen

radical stress. *Planta Med.* **63**: 265-266 (1997).

9. K. C. Das and C. K. Das. Curcumin (diferuloyl-methane), a singlet oxygen ($^1O_2$) quencher. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**: 62-66 (2002).
10. H. P. Ammon and M. A. Wahl. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med.* **57**: 1-7 (1991).
11. I. Brouet and H. Oshima. Curcumin, an anti-tumour promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**: 533-540 (1995).
12. B. Joe and B. R. Lokesh. Prophylactic and therapeutic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids, capsaicin, and curcumin on adjuvant induced arthritis in rats. *J. Nutr. Biochem.* **8**: 397-407 (1997).
13. V. Rajakrishnan, A. Jayadeep, O. S. Arun, P. R. Sudhakaran, and V. P. Menon. Changes in the prostaglandin levels in alcohol toxicity: Effect of curcumin and N-acetylcysteine. *J. Nutr. Biochem.* **11**: 509-514 (2000).
14. M. C. Heng, M. K. Song, J. Harker, and M. K. Heng. Drug-induced suppression of phosphorylase kinase activity correlates with resolution of psoriasis as assessed by clinical, histological and immunohistochemical parameters. *Br. J. Dermatol.* **143**: 937-949 (2000).
15. K. Polasa, A. N. Naidu, I. Ravindranath, and K. Krishnaswamy. Inhibition of B(α)P induced strand breaks in presence of curcumin. *Mutat. Res.* **557**: 203-213 (2004).
16. P. Limtrakul, S. Lipigorngoson, O. Namwong, A. Apisariyakul, and F. W. Dunn. Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer Lett.* **116**: 197-203 (1997).
17. H. Inano, M. Onoda, N. Inafuku, Y. Kubota, T. Osawa, H. Kobayashi, and K. Wakabayashi. Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis* **21**: 1835-1841 (2000).
18. A. Khafif, S. P. Schantz, T. C. Chou, D. Elderstein, and P. G. Sacks. Quantitation of chemopreventive synergism between (-)-epigallocatechin-3-gallate and curcumin in normal, premalignant and malignant human oral epithelial cells. *Carcinogenesis* **19**: 419-424. (1998).
19. S. Perkins, R. D. Verschoyle, K. Hill, I. Parveen, M. D. Threadgill, R. A. Sharma, M. L. Williams, W. P. Steward, and A. J. Gescher. Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics of curcumin in the Min/+ Mouse, a model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* **11**: 535-540 (2002).
20. E. K. Song, H. Cho, J. S. Kim, N. Y. Kim, N. H. An, J. A. Kim, S. H. Lee, and Y. C. Kim. Diarylheptanoids with free radical scavenging and hepatoprotective activity *in vitro* from *Curcuma longa*. *Planta Med.* **67**: 876-877 (2001).
21. R. A. Sharma, H. R. McLelland, K. A. Hill, C. R. Ireson, S. A. Euden, and M. M. Manson. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **7**: 1984-1900 (2001).
22. พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์ สุนิพนธ์ ภุมมางกูร สุวรรณา เหลืองชลธาร สุทธาทิพย์ จันทรสกุล ชำนาญ ภัตรพานิช มิตร ปทีปวณิช และ ดาราวัลย์ ธัญญะวุฒิ. รายงานการวิจัย *การวิเคราะห์คุณลักษณะวัตถุดิบสารสกัดและยาเม็ดสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์*. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพมหานคร, 2548, หน้า 12-14.
23. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, Approved Standard-Fifth Edition, 2000, 20 (2): 26.
24. World Health Organizationl (WHO), Department of Communicable Disease Surveillance and Response, 2000. WHONET 5 Laboratory Database Software, Geneva.
25. B. A. Forbes, D. F. Sahm, and A. S. Weissfeld. *Vibrio aeromonas, Plesiomonas shigelloides*, and *Chromobacterium violaceum*. In *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 10th ed., Mosby, St. Louis, 1998, pp. 488-500.

26. G. I. Barrow and R. K. A. Feltham (eds.), *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 3rd ed., Cambridge University Press, 1993, pp. 754-759.
27. L. K. Wachsmuth, G. K. Morris, and J. C. Feeley. Vibrio. In E. H. Lennette, A. Balows, W. J. Hausler Jr., and J. P. Truant (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 3rd ed., American Society for Microbiology, Washington D.C., 1980, pp. 226-234.
28. E. L. Elliot, A. Kaysner, and M. L. Tamplin. *FDA Bacteriological Analytical Manual*, 7th ed., 1992, pp. 111-120.