RESEARCH ARTICLE

Effects of turmeric oil on mononuclear cell function of Nile tilapia by feed medication

Raktham Maktrirat[1] Siriporn Okonogi[2] and Surachai Pikulkaew[3*]

Abstract

Objective - To determine the chemical composition of tumeric oil and the cytotoxic and phagocytic effects on Nile tilapia's mononuclear cells (MN).

Materials and Methods - The essential oil was isolated from fresh rhizomes of *Curcuma longa* Linn. using simultaneous steam-distillation. Chemical characterization of turmeric oil were analyzed using gas chromatograph (GC) coupled to a mass spectrometer (MS). The turmeric dispersions was formulated by using 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5% turmeric oil (v/v) in distilled water together with Tween20. Cytotoxic effect of six turmeric dispersions was tested on healthy Nile tilapia MN by XTT reduction assay. Fish feed pellets were added with 1, 3 and 6 of turmeric dispersions and experimental fish were feed for 4 weeks. The immunostimulating potential of turmeric oil in Nile tilapia was assessed by phagocytosis assay on MN using NBT reduction.

Results - The result demonstrated that the major compound of turmeric oil was beta- turmerone (39.64%). The mild effect of turmeric oil induced Nile tilapia-isolated MN cytotoxicity was observed with 6th dispersion (39.24±1.59). The effect of turmeric oil on phagocytic activity of MN was showed in a concentration-dependent manner, the percentage of phagocytosis on MN of 1, 3 and 6 turmeric dispersions were 57.92±0.01, 49.18±0.01 and 25.90±0.03, respectively.

Conclusion - The present study revealed the potential use of turmeric oil dispersion as an alternative attractive immunostimulant for routine use in Nile tilapia, since using of antibiotic and chemical agents in food-fish production will be restricted in near future.

KKU Vet J. 2014;24(2):156-168. *http://vmj.kku.ac.th*

Keywords: turmeric oil, mononuclear cells, cytotoxicity, phagocytosis, Nile tilapia

[1]Department of Veterinary Biosciences and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, [2]Department of Pharmaceutical Science, Faculty of Pharmacy, [3]Department of Food Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100, Thailand.

[*]**Corresponding author** E-mail: surapikulkaew@gmail.com

ผลของน้ำมันขมิ้นชันต่อการทำงานของเซลล์โมโนนิวเคลียร์ในปลานิล โดยวิธีการผสมอาหาร

รักธรรม เมฆไตรรัตน์[1] ศิริพร โอโกโนกิ[2] และ สุรชัย พิกุลแก้ว[3*]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันขมิ้นชัน และศึกษาความเป็นพิษ และกระบวนการเก็บกินต่อเซลล์โมโนนิวเคลียร์ที่แยกจากปลานิล

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ สกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าสดของขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันขมิ้นชันด้วยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโทเมตรี จากนั้นเตรียมน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยในน้ำกลั่นและ tween20 ด้วยความแรงร้อยละปริมาตรต่อปริมาตรที่ 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 ตามลำดับ จากนั้นทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โมโนนิวเคลียร์ที่แยกจากปลานิลปกติในหลอดทดลอง ด้วยวิธี XTT reduction assay จากนั้นทำการผสมน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยตำรับที่ 1 ตำรับที่ 3 และ ตำรับที่ 6 ในอาหารเม็ดสำเร็จรูป ให้ปลานิลกินนาน 4 สัปดาห์ จากนั้นทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของน้ำมันขมิ้นชันในปลานิล จากการทดสอบกระบวนการเก็บกินของเซลล์โมโนนิวเคลียร์ด้วยวิธี NBT reduction assay

ผลการศึกษา พบว่าองค์ประกอบทางเคมีหลักของน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชัน คือ สาร beta-turmerone ที่ร้อยละ 39.64 ส่วนการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โมโนนิวเคลียร์ที่แยกจากปลานิลปกติในหลอดทดลอง พบว่าน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยตำรับที่ 6 มีความเป็นพิษเพียงเล็กน้อย (ร้อยละ 39.24±1.59) ส่วนผลกระบวนการเก็บกินของเซลล์โมโนนิวเคลียร์พบว่า เมื่อได้รับความเข้มข้นของน้ำมันขมิ้นชันเพิ่มขึ้นจะสามารถเพิ่มกระบวนการเก็บกินได้ โดยตำรับที่ 1 ตำรับที่ 3 และตำรับที่ 6 มีอัตราการเก็บกินของเซลล์โมโนนิวเคลียร์เท่ากับร้อยละ 57.92 ± 0.01, 49.18 ± 0.01 และ 25.90 ± 0.03 ตามลำดับ

ข้อสรุป น้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยสามารถใช้เป็นสารกระตุ้มภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจในปลานิล เนื่องจากการใช้สารปฏิชีวนะและเคมีภัณฑ์ในปลาที่เลี้ยงสำหรับบริโภคจะจำกัดมากขึ้นในอนาคตอันใกล้

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2557;24(2):156-168. *http://vmj.kku.ac.th*

คำสำคัญ: น้ำมันขมิ้นชัน เซลล์โมโนนิวเคลียร์ ความเป็นพิษ กระบวนการเก็บกิน ปลานิล

[1]ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ [2]ภาควิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ [3]ภาควิชาคลินิกสัตว์บริโภค คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100

[*]**ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ** อีเมล์: surapikulkaew@gmail.com

บทนำ

สัตว์น้ำจืดที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะปลานิลดำ (*Oreochromis niloticus*) โดยในปี 2555 กรมประมงรายงานว่าประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงปลานิลจำนวนประมาณสองแสนตันสร้างมูลค่าหลายพันล้านบาท [1] การเลี้ยงปลานิลนิยมเลี้ยงกันในบ่อดินและในกระชัง โดยเฉพาะการเลี้ยงในกระชังได้รับความนิยมในปัจจุบัน การเพาะเลี้ยงปลาในกระชังมีข้อดีเนื่องจากไม่ต้องลงทุนสูง สามารถวางกระชังได้ในแม่น้ำธรรมชาติหรืออ่างเก็บน้ำ อย่างไรก็ตามข้อเสียของการเลี้ยงปลาในกระชังคือ เกษตรกรไม่สามารถควบคุมคุณภาพน้ำได้ รวมทั้งง่ายต่อการเกิดโรคต่างๆ ที่มากับสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมโรคด้วยการใช้ยาและสารเคมีอันจะก่อให้เกิดผลเสียต่อระบบการผลิต ในปัจจุบันสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจึงเข้ามามีบทบาทในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ตัวอย่างเช่น สารไคติน สารกลูแคน สารแลกโตเฟอริน รวมทั้งสารสกัดจากพืชสมุนไพร [2] โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการควบคุมและป้องกันโรคของสัตว์น้ำ

สารสกัดจากพืชสมุนไพรหลายชนิดมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำได้ โดยเฉพาะส่วนของน้ำมันหอมระเหย เช่น น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกของต้นอบเชย ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Streptococcus iniae* (*S. iniae*) ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ซึ่งจัดเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงในอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลานิลทั่วโลก และปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมด้วยน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวในอัตราส่วน 0.4% (w/w) มีอัตราการตายเนื่องจากการติดเชื้อ *S. iniae* ต่ำกว่าปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ โดยคาดว่าสารออกฤทธิ์ คือ cinnamaldehyde [3] นอกจากนี้ยังมีรายงานการต้านเชื้อ *Flavobacterium columnaris* ที่ก่อโรคในปลาด้วยน้ำมันหอมระเหยจากกุยช่าย (*Allium tuberosum*) [4] เป็นต้น ขมิ้นชันมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* Linn. มีชื่อสามัญว่า turmeric เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เป็นสมุนไพรพืชล้มลุกที่ปลูกขึ้นทั่วไปในประเทศไทย การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ของขมิ้นชันพบว่ามีสารสำคัญส่วนมากพบที่เหง้า (rhizome) โดยมีสารสีเหลืองที่เรียกว่าเคอร์คูมินอยด์ แป้ง และ oleoresin [5] พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชันมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเซลล์โมโนนิวเคลียร์ของมนุษย์ [6] ส่วนการศึกษาในสัตว์น้ำพบรายงานว่า สารสกัดจากขมิ้นชันสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* Boone ที่ได้รับในขนาด 25-50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม [7] อีกทั้งมีการพัฒนาสูตรพรีมิกซ์ที่มีสารสกัดขมิ้นชันเพื่อนำไปเลี้ยงปลานิล [8] อย่างไรก็ตามยังไม่รายงานการศึกษาน้ำมันหอมระเหยของขมิ้นชันในปลานิล

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการเตรียมน้ำมันขมิ้นชันให้อยู่ในรูปแบบสารแขวนลอย ซึ่งข้อดีของรูปแบบสารแขวนลอย คือ ขนาดหยดอนุภาคหรือน้ำมันภายในเล็กมาก มีความคงสภาพสูง สามารถกักเก็บตัวยาได้ในปริมาณที่มากกว่า โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

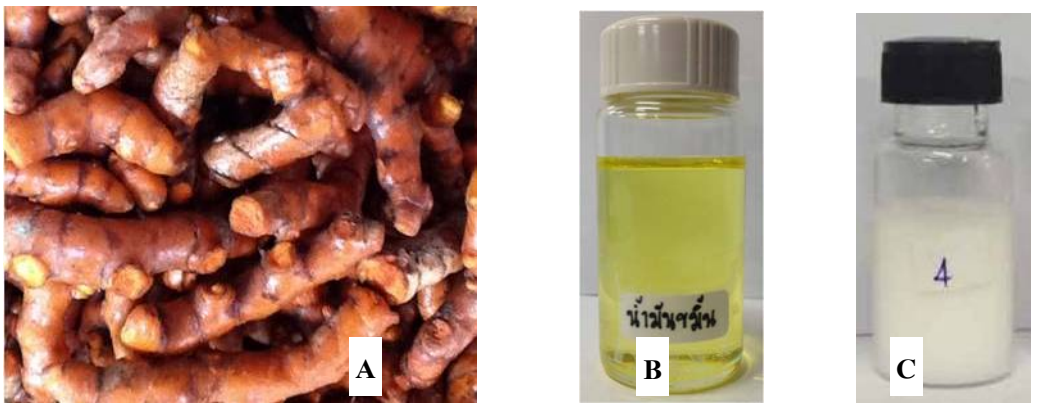
ความเป็นพิษและกระบวนการเก็บกินของเซลล์โมโนนิวเคลียร์ในปลานิล เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเพิ่มศักยภาพของน้ำมันสมุนไพรพื้นบ้านอันจะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงปลานิล รวมถึงการศึกษาต่อไปในอนาคต

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การสกัดน้ำมันหอมระเหยและการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

ทำการรวบรวมเหง้าขมิ้นชันแก่นำมาล้างน้ำให้สะอาด โดยเลือกเก็บส่วนเหง้าที่มีลักษณะสมบูรณ์เนื้อในเหง้ามีสีส้มแดง (Figure 1A) ทำการกลั่นด้วยระบบ stream-distillation โดยให้น้ำเดือดนาน 3 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำมันหอมระเหยถูกไอน้ำพาขึ้นไปควบแน่น จากนั้นทำการเก็บน้ำมันหอมระเหยที่แยกโดย cleventure apparatus เก็บน้ำมันหอมระเหยที่ได้ไว้ในที่เย็นและป้องกันแสงเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป (Figure 1B) การควบคุมมาตรฐานของน้ำมันหอมระเหย โดยนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโทเมตรี (GC-MS) (GC Agilent system 6890 m/แมสสเปคโทรมิเตอร์ MS 5973 ใช้คอลัมน์ HP-5 MS (30.0 µm x 250 µm x i.d.,0.25 µm)) และเปรียบเทียบกับแมสสเปคตรัมของสารมาตรฐาน การเตรียมน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอย (Figure 1C) โดยใช้ Tween20 เป็นสารช่วยทำให้เกิดน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นกระจายวัฏภาคน้ำมันในวัฏภาคน้ำโดยใช้ magnetic stirrer หลังจากนั้นนำสารผสมไปผ่านเครื่อง high speed homogenizer (Ultra-Turrax T25, IKA-WERKE, Germany) ที่ 10,000 rpm นาน 2 นาที โดยทำการผสมน้ำมันขมิ้นในขนาดความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยจะทำการเรียกชื่อเป็นตำรับต่างๆ (Table 1)

Figure 1. Fresh rhizome of Curcuma longa Linn. (A) Tumeric essential oil (B) Tumeric dispersion (C)



2. ความเป็นพิษของน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยต่อเซลล์โมโนนิวเคลียร์ของปลา

ปลานิลดำเพศผู้ล้วน สุขภาพแข็งแรง ขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 545.16±9.17 กรัม และความยาวทั้งสิ้นเฉลี่ย 29.25±0.47 เซนติเมตร จากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิลในเขตจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 10 ตัว ทำการสลบปลานิลด้วยน้ำมันดอกกานพลูในขนาด 50 พีพีเอ็ม ละลายลงในน้ำ เมื่อปลานิลทดลองอยู่ในระยะ 3 เพลน 2 จากนั้นเก็บเลือดจากเส้นเลือดใต้แนวกระดูกสันหลัง ปริมาณเลือด 1 ซีซีต่อตัว ใส่เลือดในหลอดสะอาดปราศจากเชื้อและมีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Lithium heparin; BD Vacutainer®) ทำการแยกเซลล์โมโนนิวเคลียร์ออกจากเลือดปลานิลด้วยการปั่นกับ Lymphoprep™ (Fresenius Kabi Norge AS) (ความหนาแน่น 1.077±0.001 g/ml) ที่ 400xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วตรวจวัดอัตราการรอดชีวิต (มากกว่าร้อยละ 90) ด้วยการย้อมสี 0.4% Trypan blue จากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของเซลล์ด้วย Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco) ประมาณ $5x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วเติมสารแขวนลอยเซลล์ลงใน 96-well plate จำนวน $5x10^5$ เซลล์/หลุม ร่วมกับน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยทั้ง 6 ตำรับ โดยใช้ตัวทำละลาย tween20 ร้อยละ 10 (v/v) และ DMEM เป็นกลุ่มควบคุมนำส่ง (vehicle control) และกลุ่มควบคุมลบ (negative control) ตามลำดับ โดยปล่อยให้เซลล์สัมผัสกับตำรับนาน 1 ชั่วโมงสภาวะคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการปั่นล้างด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง จึงเติมสาร PMS-XTT (Sigma) (ความเข้มข้น 0.025 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มนาน 4 ชั่วโมง จึงทำการตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวแสง 450 นาโนเมตร แล้วคำนวณร้อยละของความเป็นพิษต่อเซลล์ [9,10]

3. ทดสอบคุณสมบัติการเก็บกินของเซลล์โมโนนิวเคลียร์จากปลาหลังจากสัมผัสน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอย

ปลานิลดำเพศผู้ล้วน ขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 42.85±2.67 กรัม และความยาวทั้งสิ้นเฉลี่ย 14.51±0.54 เซนติเมตร จากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิลในเขตจังหวัดเชียงใหม่ ถูกแบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลอง กลุ่มการทดลองละ 10 ตัว เนื่องจากทำการศึกษาในปลาทดลองจึงทำการเลือก 3 ระดับความเข้มข้นของขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยดังนี้ โดยกลุ่มที่ 1 ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปปกติ (ฟิชเฟิร์ส; INTEQC) ผสมน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยตำรับที่ 1 กลุ่มที่ 2 ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปปกติผสมน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยตำรับที่ 3 กลุ่มที่ 3 ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปปกติผสมน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยตำรับที่ 6 และกลุ่มที่ 4 ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปปกติผสมตัวทำละลายที่ไม่มีน้ำมันขมิ้นชัน ทำการผสมน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยกับอาหารเม็ดสำเร็จรูปปกติแต่ละกลุ่มจากนั้นปล่อยให้แห้งนาน 30 นาที ในอุณหภูมิห้องและป้องกันแสง จากนั้นบรรจุอาหารผสมในถุงสูญญากาศ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ก่อนให้ปลาทดลอง โดยทำการเตรียมอาหารทุกๆ 3 วันของการทดลอง ทำการให้อาหารดังกล่าวคิดเป็นร้อยละ 5 ของน้ำหนักตัว ให้ 2 ครั้งต่อวัน ติดต่อกันนาน 4 สัปดาห์

หลังสิ้นสุดการทดลอง ทำการสลบปลานิลด้วยน้ำมันดอกกานพลูในขนาด 50 พีพีเอ็ม ละลายลงในน้ำ เมื่อปลานิลทดลองอยู่ในระยะ 3 เพลน 2 จึงทำการเก็บเลือดจากเส้นเลือดใต้แนวกระดูกสันหลังปริมาณเลือด 0.5 ซีซีต่อตัว นำเลือดใส่ในหลอดสะอาดปราศจากเชื้อและมีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Lithium heparin; BD Vacutainer®) จากนั้นทำการแยกเซลล์โมโนนิวเคลียร์จากเลือดของปลาด้วยการปั่นกับ Lymphoprep™ ที่ 400xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของเซลล์ด้วย DMEM ประมาณ $5x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (อัตราการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ90) แล้วเติมสารแขวนลอยเซลล์ลงใน 96-well plate จำนวน $5x10^5$ เซลล์/หลุม แล้วเติมสารไซโมซาน (zymosan) (800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) กับสาร NBT (600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มไว้เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยเมธานอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตรจำนวน 3 ครั้งแล้วเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide) (2 โมลาร์) ปริมาตร 120 ไมโครลิตรกับสารไดเมธิลซัลฟ็อคไซด์ (dimetyl sulfoxide) ปริมาตร 140 ไมโครลิตรจึงทำการตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวแสง 570 นาโนเมตร แล้วคำนวณร้อยละของการเกิดการเก็บกิน [11] การเลี้ยงสัตว์ทดลองภายในห้องปฏิบัติการสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และการดำเนินการกับสัตว์ทดลองได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจรรยาบรรณสัตว์ทดลอง ของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Ref. NO. S15/2556)

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบร้อยละความเป็นพิษและร้อยละการเก็บกินของเซลล์โมโนนิวเคลียร์หลังจากได้รับสัมผัสน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยความแรงต่างๆ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบ One way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Duncan's multiple rang test ที่ระดับนัยสำคัญ $P<0.05$

ผลการศึกษา

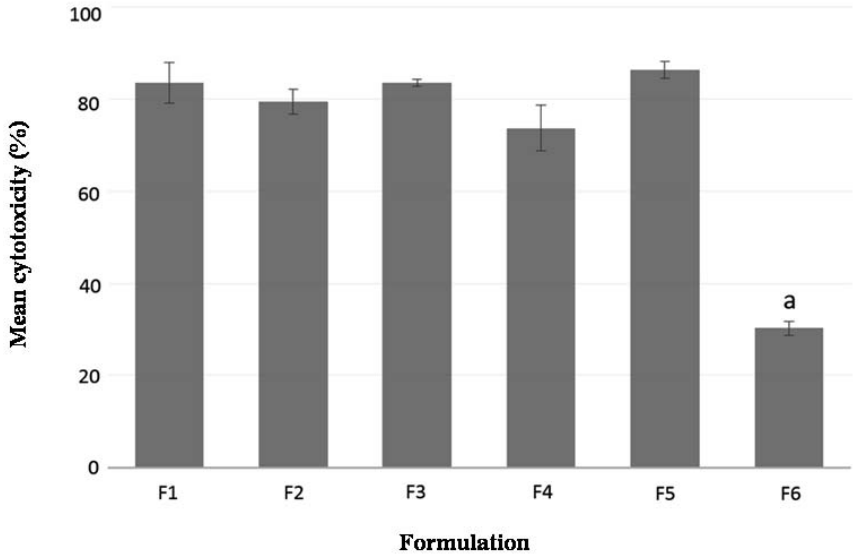
1. การสกัดน้ำมันหอมระเหยและการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

การสกัดน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันด้วยวิธี stream-distillation พบว่าได้ร้อยละของ yield เท่ากับ 0.1 ลักษณะน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันที่ได้มีสีเหลืองอ่อนใสไม่แยกชั้น (Figure 1B) และเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันที่ได้ไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี GC-MS พบว่าน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชันมีสารองค์ประกอบหลัก คือ beta-turmerone ที่ retention time เท่ากับ 31.46, 31.51

และ 31.56 นาที มีปริมาณสูงสุดคิดเป็นร้อยละของ Area รวมเท่ากับ 39.64 (w/w) (Table 2)

2. ความเป็นพิษของน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยต่อเซลล์โมโนนิวเคลียร์ของปลา การทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยต่อเซลล์โมโนนิวเคลียร์ที่แยกจากปลานิลด้วยวิธี XTT reduction assay โดยเซลล์สัมผัสกับน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยนาน 1 ชั่วโมงโดยผลการทดลองพบว่าน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยตำรับที่ 6 มีความเป็นพิษน้อย (ร้อยละ 30.24±1.59) ส่วนตำรับที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 มีความเป็นพิษค่อนข้างมาก โดยมีค่าพิสัยอยู่ระหว่างร้อยละ 73.76±4.86 ถึง 86.35±1.78 อัตราความเป็นพิษต่อเซลล์โมโนนิวเคลียร์ของปลาเป็นแบบไม่แปรผันตามความเข้มข้น (concentration independent manner) (Figure 2)

Figure 2. Mean cytotoxicity percent of mononuclear cells after exposed with various concentrations of turmeric oil. (N=3, Mean ±SD)



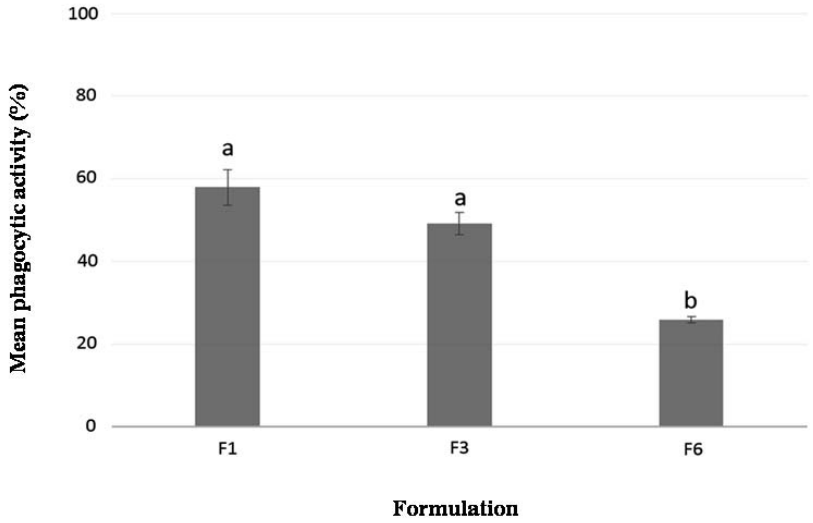
Different letter indicates statistical difference (P<0.05)

3. ทดสอบคุณสมบัติการเก็บกินของเซลล์โมโนนิวเคลียร์จากปลาหลังจากสัมผัสน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอย

ศึกษาคุณสมบัติการเก็บกินของเซลล์โมโนนิวเคลียร์ของปลานิลด้วยวิธี NBT reduction assay โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์โมโนนิวเคลียร์ที่แยกจากปลานิล ซึ่งได้รับอาหารผสมน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยขนาดร้อยละ 5 ของน้ำหนักตัว นาน 4 สัปดาห์

จำนวน 3 ตำรับ (ตำรับที่ 1 ตำรับที่ 3 และ ตำรับที่ 6) โดยและกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติผสมตัวทำลาย (ไม่มีน้ำมันขมิ้นชัน) โดยผลการทดลองพบว่า ตรวจพบอัตราการเก็บกินของเซลล์แปรผันตามขนาดของน้ำมันขมิ้นชันที่ผสมในสูตรอาหาร โดยปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันขมิ้นชันรูปแบบสารแขวนลอย ตำรับที่ 1 ตำรับที่ 3 และตำรับที่ 6 มีอัตราการเก็บกินของเซลล์โมโนนิวเคลียร์เท่ากับร้อยละ 57.92±0.01, 49.18±0.01 และ 25.90±0.03 ตามลำดับ (Figure 3)

Figure 3. Mean phagocytic activity percent of mononuclear cells after exposed with various concentrations of turmeric oil. (N=3, Mean ±SD)



Different letter indicates statistical difference (P<0.05)

วิจารณ์

การศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าสารกลุ่ม turmorone เป็นสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักภายในน้ำมันที่สกัดจากเหง้าขมิ้นชัน (turmeric oil) ซึ่งมีสัดส่วนอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 30-60 [12-15] โดยผลการทดสอบความเป็นพิษของสารแขวนลอยที่เตรียมจากน้ำมันขมิ้นชันต่อเซลล์โมโนนิวเคลียร์ที่แยกจากปลานิลพบว่าน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยตำรับที่ 6 (0.05% v/v turmeric oil) มีความเป็นพิษเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารกลุ่ม turmerone ที่สกัดแยกจากเหง้าขมิ้นชัน โดยได้รายงาน IC_{50} ต่อเซลล์ HepG2, MCF-7 และ MDA-MB231 เท่ากับ 32.9, 41.8 และ 30.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ [15] อีกทั้งเซลล์ LS174T และ MCF7 เท่ากับ 19.3 และ 14.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ [13]

ส่วนน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยตำรับที่ 1-5 มีความเป็นพิษค่อนข้างมาก และอัตราความเป็นพิษไม่แปรผันตามความเข้มข้นนั้น เนื่องมาจากมีความเข้มข้นของสารสำคัญในตำรับสูงกว่า IC_{50} มาก แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อเซลล์ของน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยเป็นเพียงการทดลองนอกกาย (*in vitro*) โดยจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยทางเภสัชจลนศาสตร์ของสารสำคัญในกรณีที่บริหารยาด้วยการผสมอาหาร (feed medication) ซึ่งมักส่งผลให้ปริมาณสารสำคัญในเลือดมีความเข้มข้นต่ำกว่าระดับความเป็นพิษต่อเซลล์

การศึกษาพบว่าเซลล์โมโนนิวเคลียร์จากปลานิลในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันขมิ้นชันในรูปแบบสารแขวนลอยมีคุณสมบัติการเก็บกินของเซลล์เพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าเคอร์คูมินมีผลต่อเซลล์ภูมิคุ้มกันอย่างเช่นนิวโทรฟิล และในหลายการศึกษาพบว่าเคอร์คูมินมีความสามารถในการกระตุ้นแมคโครฟาจได้ [17] กระบวนการเก็บกินของเซลล์ RAW264.7 เมื่อทดลองบ่มด้วยเคอร์คูมินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าผลจากขนาดของเคอร์คูมินยิ่งสูงขึ้นยิ่งทำให้กิจกรรมการกลืนกินของเซลล์เพิ่มสูงขึ้น [18] ในการศึกษานี้พบว่ามีลักษณะการกระตุ้นกระบวนการเก็บกินเป็นแบบแปรผันตามขนาดของน้ำมันขมิ้นชันที่ผสมในสูตรอาหารโดยมีความสอดคล้องกับการศึกษาสารสกัดขมิ้นชันผสมอาหารในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ซึ่งพบการแสดงออกของยีนไลโซไซม์ (lysozyme gene) แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งไลโซไซม์จัดเป็นเอนไซม์ที่มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติการเก็บกินของเซลล์ฮีโมซัยต์ (hemcyte) [19] ขณะที่การศึกษาสารสกัดขมิ้นชันที่ผสมอาหารในกุ้งขาวแปซิฟิค (*Litopenaeus vannamei* Boon) และกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) พบว่าจำนวนของเซลล์ฮีโมซัยต์ และคุณสมบัติการเก็บกินไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม [20, 21] ทั้งนี้เนื่องมาจากสัดส่วนของสารสำคัญในสารสกัดหยาบขมิ้นชันที่แตกต่างกัน ได้แก่ เคอร์คูมิน, desmethoxycurcumin, bisdesmethoxycurcumin และน้ำมันหอมระเหย โดยงานวิจัยฉบับนี้ มุ่งเน้นศึกษาผลของน้ำมันขมิ้นชันซึ่งมี turmerone เป็นสารออกฤทธิ์หลักถึงแม้ว่ายังไม่เคยมีการศึกษาฤทธิ์กระตุ้นคุณสมบัติเก็บกินของเซลล์โมโนนิวเคลียร์ในปลานิล มีรายงานฤทธิ์กระตุ้นคุณสมบัติเก็บกินของเซลล์โมโนนิวเคลียร์ของน้ำมันหอมระเหยจากยูคาลิปตัส (*Eucalyptus globulus*) ทั้งการทดลองนอกกาย และการทดลองในกาย (*in vivo*) [22] อีกทั้งมีรายงานสนับสนุนฤทธิ์ของสาร turmerone ในกระตุ้นการทำงานของเซลล์โมโนนิวเคลียร์ในมนุษย์โดยสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน (proliferation) และการผลิตสารไซโตไคน์ (cytokine production) ได้ในหลอดทดลอง [16] จึงเป็นที่น่าเชื่อว่าฤทธิ์กระตุ้นคุณสมบัติเก็บกินของเซลล์โมโนนิวเคลียร์เป็นผลมาจากน้ำมันหอมระเหย จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า การนำสารสกัดขมิ้นชันไปใช้ผสมอาหารในสัตว์น้ำควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น การศึกษาสารออกฤทธิ์ ช่วงอายุของปลาทดลอง รวมทั้งนำไปทดลองในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจริง เพื่อนำมาทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมี และสามารถส่งเสริมให้สัตว์น้ำมีสุขภาพที่ดีได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับทุนสนับสนุนการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างด้วยวิธี GC-MS และ เภสัชกรหญิงกัณฐภรณ์ จันทร์เงิน สำหรับความช่วยเหลือในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Thailand fisheries statistics and national fisheries products imports and exports statistics [Internet]. Bangkok: Department of fisheries, Thailand. c2012 [cited 2012 Feb 22]. Available from: http://www.fisheries.go.th/it-stat/
2. Magnadottir B. Immunological control of fish diseases. *Mar Biotechnol (NY).* 2010;12(4): 361-379.
3. Rattanachaikunsopon P and Phumkhachorn P. Potential of cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil in controlling *Streptococcus iniae* infection in tilpia (*Oreochromis niloticus*). *Fisheries Sci.* 2010; 76: 287-293.
4. Rattanachaikunsopon P and Phumkhachorn P. Potential of Chinese chive oil as a natural antimicrobial for controlling *Flavobacterium columnare* infection in Nile tilapia *Oreochromis niloticus. Fisheries Sci.* 2009; 75: 1431-1437.
5. Leung AY. (1980). Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Foods, Drugs and Cosmetics. John Wiley & Sore, New York, pp. 313-314.
6. Yue GG, Chan BC, Hon PM, Lee MY, Fung KP, Leung PC, Lau CB. (2010) Evaluation of in vitro anti-proliferative and immunomodulatory activities of compounds isolated from Curcuma longa. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48: 2011-2020.
7. Kittima Vanichkul , Nontawith Areechonl, Ngampong Kongkathip, Prapansak Srisapoome and Niti Chuchird. Immunological and bactericidal effects of turmeric (*Curcuma longa* Linn.) extract in Pacific White Shrimps (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Kasetsart J. (Nat. Sci.).* 2010; 44: 850-858.
8. Wongtavatchai J, Rojsitthisak P, Lukkana M. Development of curcumin premix for the use to promote health in farmed tilapia [Internet]. Bangkok: Chulalongkorn University; 2009 [cited 2012 May 12]. Available from: http://www.research.chula.ac.th/web/Govevnment/libraly/Gov52_03.pdf
9. Jost LM, Kirkwood JM, Whiteside TL. Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *J Immunol Methods.* 1992; 147(2): 53-65.
10. Lu JH, Chiu YT, Sung HW, Hwang B, Chong CK, Chen S.P., Mao SJ, Yang PZ, Chang Y. XTT-colorimetric assay as a marker of viability in cryoprocessed cardiac valve. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; 29(4): 1189-1194.
11. Segal AW and Levi AJ. Cell damage and dye reduction in the quantitative nitrobluetetrazolium (NBT) test. *Clin Exp Immunol.* 1975; 19: 309-318.
12. Raina VK, Srivastava SK, Ahmad A, Syamasundar KV, Aggarwal KK. Essential oil composition of *Curcuma longa* L.cv. Roma from the plains of northern India. *Flavour Frag J.* 2002; 17(2): 99-102.

13. Zaeoung S, Plubrukarn A, Keawpradub N. Cytotoxic and free radical scavenging activities of Zingiberaceous rhizomes. *Songklanakarin J Sci Technol.* 2005; 27(4): 799-812.
14. Awasthi PK and Dixit SC. Chemical composition of *Curcuma Longa* leaves and rhizome oil from the plains of Northern India. *J Young Pharm.* 2009; 1: 312-316.
15. Tsai SH, Huang SJ, Chyau CC, Tsai CH, Weng CC, Mau JL. Composition and Antioxidant Properties of Essential Oils from Curcuma rhizome. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 2011; 2(1): 57-66.
16. Yue GG, Chan BC, Hon PM, Lee MY, Fung KP, Leung PC, Lau CB. Evaluation of in vitro anti-proliferative and immunomodulatory activities of compounds isolated from *Curcuma longa. Food Chem Toxicol.* 2010; 48(8-9): 2011-2020.
17. Jagetia CG and Aggarwal, BB. Spicing up of the immune system by curcumin. *J Clin Immunol.* 2007; 27(1): 19-35.
18. Bisht K, Choi WH, Park SY, Chung MK, Koh WS. Curcumin enhances non-inflammatory phagocytic activity of RAW264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 379: 632-636.
19. Alambra JR, Alenton RRR, Gulpeo CPR, Mecenas CL, Miranda AP, Thomas RC, Velando MKS, Lawrence DV, Maningas MBB. Immunomodulatory effects of turmeric, *Curcuma longa* (Magnoliophyta, Zingiberaceae) on *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea, Palaemonidae) against *Vibrio alginolyticus* (Proteobacteria, Vibrionaceae). *AACL Bioflux.* 2012; 5(1): 13-17.
20. Vanichkul K, Areechon N, Kongkathip N, Srisapoome P, Chuchird N. Immunological and bactericidal effects of turmeric (*Curcuma longa* Linn.) extract in Pacific White Shrimps (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Kasetsart J.* 2010; 44: 850–858.
21. Malar HLV and Chartles PM. Effect of Turmeric, *Curcuma longa* linn extract on immunity and resistance to *Vibrio harveyi* in Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon. Int J Zool Res.* 2013; 3(2): 21-26.
22. Serafino A, Sinibal di Vallebona P, Andreola F, Zonfrillo M, Mercuri L, Federici M, Rasi G, Garaci E, Pierimarchi P. Stimulatory effect of Eucalyptus essential oil on innate cell-mediated immune response. *BMC Immunol.* 2008; 9: 17.

Table 1. The formulation of turmeric dispersions (F1-F6 = 1st turmeric dispersion-6th turmeric dispersion, respectively).

Formulation	Composition		
	Turmeric oil (gram)	**Tween20 (gram)**	**Distilled water**
1 (F1)	0.5	0.25	qs 100 mL
2 (F2)	0.4	0.2	qs 100 mL
3 (F3)	0.3	0.15	qs 100 mL
4 (F4)	0.2	0.1	qs 100 mL
5 (F5)	0.1	0.05	qs 100 mL
6 (F6)	0.05	0.025	qs 100 mL

Table2. Chemical compositions of essential oil for tumeric oil

Name	IUPAC name	Retention time (min)	Area (%)
b-turmerone	2-methyl-6-(4-methylidenecyclohex-2-en-1-yl)hept-2-en-4-one	31.46, 31.51, 31.56	23.91, 6.44, 9.29 = 39.64
alpha-turmerone	2-methyl-6-(4-methylcyclohexa-2,4-dien-1-yl)hept-2-en-4-one	32.62	13.87
ar-turmerone	(6S)-2-methyl-6-(4-methylphenyl)hept-2-en-4-one	31.62	5.87