การใช้สารสกัดใบหูกวางชนิดผงเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลากัด

Application of India Almond (*Terminalia catappa* L.) Leaves Extract Powder to Inhibit Bacteria (*Aeromonas hydrophila*) in Siamese Fighting Fish (*Betta Splendens* Regan)

ศิวพงษ์ โกสิงห์[1], ภัทรียา พลซา[1], กัลย์กนิต พิสมยรมย์[1], พรพิมล แสงจันทร์[1] และ สุพัฒน์ พลซา[1*]

Siwapong Ko-sing[1], Pattareeya Ponza[1], Kankanit Pisamayarom[1], Pornpimon Sangjun[1] and Supat Ponza[1*]

[1]คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

[1]Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000 Thailand

*Corresponding author: supatp@nu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำสกัดใบหูกวางมาทำให้เป็นผง โดยยังคงรักษาฤทธิ์สภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลากัดไว้ได้ เริ่มจากการศึกษาเพื่อหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ได้ ด้วยการใช้กระดาษกรองปราศจากเชื้อจุ่มในสารละลายสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน วางลงไปบนเชื้อที่กำลังเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA พบว่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อคือ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ระดับความเข้มข้น 600, 900, 1,200 และ 2,400 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถสร้างพื้นที่ยับยังเชื้อขนาด 1.0.±0.0, 1.0.±0.0, 1.5±0.5 และ 2.5±0.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ผลการศึกษาระดับความเป็นพิษ (LC_{50}) ของสารสกัดใบหูกวางชนิดผงต่อปลากัดเพศผู้อายุ 2 เดือน (ขนาดความยาว 2.5 เซนติเมตร) พบว่าระดับความเข้มข้นของสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่ทำให้ปลากัดตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 96 ชั่วโมง (LC_{50} 96 hrs) มีค่าเท่ากับ 1,789 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 1,430 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าสูงสุดเท่ากับ 2,155 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่ก่อโรคในปลากัดได้ แต่ควรใช้ในระดับที่ต่ำกว่า 1,430 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อป้องกันไม่ให้เป็นพิษต่อปลากัดจนอาจก่อให้เกิดความเสียหายได้

คำสำคัญ: สารสกัดใบหูกวางชนิดผง, การยับยั้ง, แบคทีเรีย, ความเป็นพิษ, ปลากัด

ABSTRACT

This research was conducted to study the feasibility of application of India almond (*Terminalia catappa* L.) leaves extract powder to inhibit bacteria (*Aeromonas hydrophila*) in Siamese fighting fish (*Betta Splendens* Regan). Effective Minimal Inhibitory Concentration (EMIC) was determined using sterile filter paper soak in different India almond leaves extract powder concentration before placing on NA media with *A. hydrophila* thrive on. Result showed that EMIC of India almond leaves extract powder for *A.* hydrophila was

600 mg/L. Which, concentration of 600, 900, 1,200, and 2,400 mg/L showed 1.0.±0.0, 1.0±0.0, 1.5±0.5 and 2.5±0.5 mm. inhibitory clear zone, respectively. Whereas, results from acute toxicity test (LC_{50}) of India almond leaves extract powder showed that 1,789 mg/L was the average concentration which induced 50% mortality of 2 months age male Siamese fighting fish (total length 2.5 cm.) within 96 hours (LC_{50} 96 hrs) with 1,430 and 2,155 mg/L are the lowest and highest concentration, respectively. From this research findings, it could be concluded that India almond leaves extract powder concentration more than 600 mg/L can inhibit *A. hydrophila* growth. However, the concentration more than 1,430 mg/L might affect Siamese fighting fish health and mortality.

Keywords: India Almond leaves extract powder, Inhibition, Bacteria, Toxicity, Siamese fighting fish

บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงปลากัด (*Betta splendens* Regan) เพิ่มมากขึ้นเนื่องจากเลี้ยงง่าย และยังเป็นปลาสวยงามชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการส่งออกไปต่างประเทศ โดยส่งออกไปยังประเทศต่างๆ ในทวีป อเมริกาและแถบแคนาดา ยุโรป เอเชีย ลาตินอเมริกา ออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ และแอฟริกา มีมูลค่าการส่งออกปีละหลายร้อยล้านบาท (Suvarnabhumi Airport Fish Inspection Office, 2016)

ในการเลี้ยงปลากัดนั้นปลากัดมักเป็นแผลหรือแสดงอาการที่ผิดปกติ เช่น ว่ายน้ำเฉื่อยชา ไม่กินอาหาร ครีบกร่อนและมีการตกเลือด (Vanichkul, 2003) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ปลาตายเป็นจำนวนมากส่งผลให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่อธุรกิจการเลี้ยงปลากัด ทำให้จำเป็นจะต้องใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีต่างๆ ในการป้องกันรักษาโรค เพราะให้ผลในการรักษาค่อนข้างเร็ว แต่ยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่มักมีราคาแพง (Chitmanat, 2013) ในกรณีที่ใช้ในปริมาณมากและไม่ถูกต้องอาจจะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้ได้ ผู้เลี้ยงปลากัดจึงได้นำใบหูกวางมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรค โดยใช้เพื่อการรักษาแผล ยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และลดต้นทุนเนื่องจากใบหูกวางสามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่น ในการใช้ใบหูกวางนั้นผู้เลี้ยงปลากัดมักนำใบหูกวางมาใส่ให้กับปลากัดโดยตรงทำให้ใบหูกวางเกิดการย่อยสลายเป็นตะกอนบริเวณใต้พื้นโหลและทำให้ตะกอนไปติดที่บริเวณเหงือกของปลากัดเป็นต้นเหตุให้ปลากัดตาย จึงมีการนำใบหูกวางมาหมักกับน้ำแล้วนำน้ำหมักที่ได้มาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคปลากัด (Purivirojkul and Areechon, 2006; Seedabuth, 2006; Puttamat and Suwannasarn, 2007; Tummarongkongsatit and Rojtinnakorn. 2007) แต่การใช้น้ำสกัดหรือน้ำหมักใบหูกวางยังมีปัญหาในเรื่องของการนำไปใช้และการเก็บรักษา เนื่องจากเป็นของเหลวที่มีน้ำหนักมากและไม่สามารถเก็บไว้เป็นเวลานานๆ ได้

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการที่จะนำน้ำหมักใบหูกวางมาทำให้เป็นผง เพื่อสะดวกต่อการนำไปใช้งานและไม่เป็นอันตรายต่อปลากัด โดยศึกษาหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. hydrophila* ที่ก่อให้เกิดโรคในปลากัด และศึกษาผลกระทบและระดับความเป็นพิษของสารสกัดใบหูกวางชนิดผงในการนำมาใช้กับปลากัด เพื่อเพิ่มอัตราการรอดตายของปลากัดที่เกิดโรค ลดผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ยาปฏิชีวนะ และลดค่าใช้จ่ายในการใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีต่างๆ ในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย และยังเป็นการนำใบหูกวางที่สามารถหาได้ในท้องถิ่นมาใช้ให้เกิดประโยชน์อีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมน้ำสกัดใบหูกวาง

นำใบหูกวางไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบหมัก โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ในอัตราส่วนใบหูกวาง 1 ส่วนต่อน้ำ 2.5 ส่วน หมักเป็นเวลา 3 วัน (Purivirojkul and Areechon, 2006) เพื่อให้สารออกฤทธิ์ต่างๆ ละลายออกมาจากใบหูกวาง โดยทำการกวนอย่างน้อย 2 ครั้งต่อวัน นำน้ำสกัดใบหูกวางที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวบางจนได้น้ำสกัดสีน้ำตาลใสปราศจากตะกอน ก่อนที่จะนำไปทำให้เป็นผงด้วยเครื่องทำอาหารแห้งแบบพ่นฝอย (Spray Dryer)

วิธีการทำสารสกัดใบหูกวางชนิดผง

นำน้ำสกัดใบหูกวางไปใส่ในเครื่องทำอาหารแห้งแบบพ่นฝอย (Spray Dryer) โดยใช้อุณหภูมิที่ 170 องศาเซลเซียส และความดันลมออก 80 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเปลี่ยนสถานะจากของเหลวไปเป็นของแข็งโดยใช้การฉีดพ่น จนได้เป็นผลิตภัณฑ์สารสกัดใบหูกวางชนิดผง (Chaovanalikit and Itthisoponkul, 2011) นำผงสารสกัดใบหูกวางมาวิเคราะห์หาปริมาณสารแทนนิน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณสารแทนนินโดยใช้สมการจากกราฟมาตรฐาน ด้วยวิธีมาตรฐานของ AOAC 952.03 (Vorasuntharosot, 2001)

การทดลองที่ 1 เพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*

หาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* โดยการละลายสารสกัดใบหูกวางชนิดผงกับน้ำให้มีความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นทำการเจือจางสารละลายสารสกัดใบหูกวางให้ได้ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 300, 600, 900, 1,200, และ 2,400 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของแทนนิน 0, 1.90, 3.80, 5.70, 7.60, และ 15.21 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แล้วนำสารละลายปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบกระดาษกรองวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) ที่ทำการ Spread เชื้อ *A. hydrophila* เตรียมไว้แล้ว (ปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/ml) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บข้อมูลโดยการใช้ไม้บรรทัดวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่ยับยั้งเชื้อ (clear zone) แล้วบันทึกหน่วยเป็นมิลลิเมตร เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดประสิทธิภาพในการยั้งเชื้อต่อไป (Rojtinnakorn and Tummarongkongsatid, 2006)

การทดลองที่ 2 เพื่อหาระดับความเป็นพิษของสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่ทำให้ปลากัดตายครึ่งหนึ่งในเวลา 96 ชั่วโมง

ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดใบหูกวางชนิดผงต่อปลากัด โดยเตรียมขวดทดลองที่บรรจุสารละลายสารสกัดใบหูกวางชนิดผงความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 1,250, 2,500, 5,000, 7,500, และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นำปลากัดเพศผู้อายุ 2 เดือนขนาดความยาว 2.5 เซนติเมตร มาใส่ขวดทดลอง ขวดละ 1 ตัว ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง สังเกตอาการและจดบันทึกจำนวนปลากัดที่ตาย ในชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่ทำให้ปลาตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 96 ชั่วโมง โดยวิธี Probit Analysis ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS Statistics 17.0

ผลการทดลองและวิจารณ์

ระดับความเข้มข้นของสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*

จากการศึกษาเพื่อหาระดับความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ของสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่ได้จากการสกัดโดยวิธีการหมักในอัตราส่วน ใบหูกวาง 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 2.5 ลิตร แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ได้ โดยเมื่อพิจารณาจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่ยับยั้งเชื้อ (clear zone) พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 2,400 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* สูงที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่ในการยับยั้งเชื้อ ขนาด 2.5±0.5 มิลลิเมตร รองลงมาคือระดับความเข้มข้น 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร มี clear zone ขนาด 1.5±0.5 มิลลิเมตร ระดับความเข้มข้น 900 มิลลิกรัมต่อลิตร มี clear zone ขนาด 1±0.0 มิลลิเมตร ระดับความเข้มข้น 600 มิลลิกรัมต่อลิตร มี clear zone ขนาด 1±0.0 มิลลิเมตร และระดับความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร มี clear zone ขนาด 0.0±0.0 มิลลิเมตร เท่ากับชุดควบคุมที่ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Table 1) ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับผลการวิจัยของ Ponpompisit (2006) ที่รายงานว่าสารสกัดใบหูกวางที่สกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการใช้สารสกัดใบหูกวางชนิดผงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสามารถใช้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าได้ เนื่องจากสารสกัดใบหูกวางชนิดผงมีปริมาณของสารแทนนินเป็นองค์ประกอบ 3.95 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งมากกว่าที่พบในสารสกัดใบหูกวางชนิดน้ำ ที่มีปริมาณของสารแทนนินเป็นองค์ประกอบ 1.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ระดับความเป็นพิษของสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่ทำให้ปลากัดตายครึ่งหนึ่งในเวลา 96 ชั่วโมง

จากการวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารสกัดใบหูกวางชนิดผงต่อปลากัดเพศผู้ที่มีอายุ 2 เดือน ขนาดความยาว 2.5 เซนติเมตรต่อตัว ด้วยวิธี Probit Analysis โดยใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป พบว่าค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่ทำให้ปลากัดตายครึ่งหนึ่ง (50 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลา 96 ชั่วโมง (LC_{50} 96 hrs) เท่ากับ 1,789 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 1,430 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าสูงสุดเท่ากับ 2,155 มิลลิกรัมต่อลิตร (Table 2) ปลากัดที่ได้รับสารสกัดใบหูกวางชนิดผงในปริมาณที่สูงเกินกว่าระดับ LC_{50} จะแสดงอาการผิดปกติ โดยการว่ายขึ้นมาที่ผิวน้ำเพื่อฮุบอากาศในอัตราความถี่สูงขึ้น บางตัวนอนนิ่งที่ผิวน้ำ พบตะกอนสีดำและสีน้ำตาลเกาะติดบริเวณผิวหนัง ครีบและเหงือก ซึ่งระดับความเป็นพิษของสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีค่าที่สูงกว่าที่ Ponpompisit (2006) ได้รายงานไว้ว่า สารสกัดใบหูกวางที่สกัดด้วยน้ำมีความเป็นพิษ (LC_{50} 96 hr) ต่อปลากัดและปลาหางนกยูง ที่ระดับความเข้มข้น 6,761 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 5,281 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยอธิบายว่าปลาที่ได้รับพิษจากการใช้ใบหูกวางในปริมาณที่สูงเกินกว่าระดับ LC_{50} จะแสดงอาการผิดปกติโดยการว่ายขึ้นมาที่ผิวน้ำเพื่อฮุบอากาศในอัตราความถี่ที่มากขึ้น บริเวณลำตัวมีเมือกมาก และอาจพบตะกอนสีดำเกาะติดผิวหนัง เกล็ดพอง บางตัวนอนนิ่งที่พื้นตู้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีค่าสูงกว่าผลการศึกษาของ Purivirojkul and Areechon (2006) ที่รายงานว่า สารสกัดใบหูกวางที่สกัดด้วยน้ำมีค่าความเป็นพิษ (LC_{50} 96 hr) ต่อลูกปลากัดที่ระดับความเข้มข้น 2,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการที่สารสกัดใบหูกวางชนิดผงมีปริมาณของสารแทนนินเป็นองค์ประกอบสูงกว่าในสารสกัดใบหูกวางชนิดน้ำ (3.95 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 1.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) จึงทำให้มีระดับความเป็นพิษสูงกว่า

สรุป

สารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นไป สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ได้ โดยพบว่าสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่ระดับความเข้มข้น 600, 900, 1,200 และ 2,400 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่ยับยั้งเชื้อ (inhibitory clear zone) เท่ากับ 1.0±0.0 ,1.0±0.0, 1.5±0.5 และ 2.5±0.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่ทำให้ปลากัดตายครึ่งหนึ่ง (50 เปอร์เซ็นต์) ในเวลา 96 ชั่วโมง (LC_{50} 96 hrs) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1,789 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 1,430 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าสูงสุดเท่ากับ 2,155 มิลลิกรัมต่อลิตร

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดใบหูกวางชนิดผงที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นไป มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่ก่อโรคในปลากัดได้ แต่ควรใช้ในระดับที่ต่ำกว่า 1,430 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดผลกระทบและเป็นพิษต่อปลากัด จนอาจก่อให้เกิดความเสียหายตามมาได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณสาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้การสนับสนุนสถานที่ รวมทั้งวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Chaovanalikit A. and T. Itthisoponkul. 2011. Natural Colorants from Mangosteen Rinds. Research Report, Srinakharinwirot University, Bangkok. (in Thai)

Chitmanat, C. 2013. Effects of herbal products on fish immunity. KKU Res. J. 18(2): 257-269. (in Thai)

Ponpompisit, A. 2006. The Study of India Almond Leaves (*Terminalia catappa* L.) on Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*) and Guppy (*Poecilia reticulata*) diseases treatment. Research Report,Chulalongkorn University, Bangkok. (in Thai)

Purivirojkul, W. and N. Areechon. 2006. Antibacterial Activity and Toxicity of Indian Almond (*Terminalia catappa*) Extract in Siamese Fighting Fish (*Betta splendens* Regan). In Proc. the 44th Kasetsart University Annual Conference, 30 January - 2 February 2006, p. 644. (in Thai)

Puttamat, S. and W. Suwannasarn. 2007. Study of chemical composition of dried leaves of Indian almond (*Terminalia catappa* L.) and its effect on water quality and anti aquatic bacteria activity. In Proc. the 45th Kasetsart University Annual Conference, 30 January - 2 February 2007, p. 746. (in Thai)

Rojtinnakorn, J. and A. Tummarongkongsatid. 2006. Bath Treatment of Motile Aeromonas Septicaemia (MAS) in Aquatic Animal Using Pomegranate (*Punica granatum* L. var.) and Indian Almond (*Terminalia catappa* L.) Extracts. In Proc. the Conference on Fisheries 2006, 25 - 27 July 2006, Abstract book, p. 180-181. (in Thai)

Seedabuth, S. 2006. Effects of Tropical Almond Leaf Extract on Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*) Culture. MS Thesis, Khon Kaen University, Khon Kaen. (in Thai)

Suvarnabhumi Airport Fish Inspection Office. 2016. Report of Import and Export of Ornamental fish. Available Source: https://www.fisheries.go.th/aquaorna/web2/, July 4, 2018. (in Thai)

Tummarongkongsatit, A. and J. Rojtinnakorn. 2007. Effective of Thai herbs extracts to inhibit bacterial pathogens in Giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). J. Fish. Tech. Res. 1(2): 192-200. (in Thai)

Vanichkul, K. 2003. Study on Bacteria and Parasites in Siamese Fighting Fish (*Betta splendens* Regan) in Nakhon Pathom Province. MS Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)

Vorasuntharosot, P. 2001. Plant Resource of South-East Asia: PROSEA 3 - Dye and tannin-producing plants. Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Bankok, Thailand. 233 pp. (in Thai)

Table 1. Effect of India almond leaves extract powder concentrations on growth inhibition of *Aeromonas hydrophila*

	India almond leaves extract powder concentration (mg/L)					
	0	300	600	900	1,200	2,400
Tannin concentration (mg/L)	0.00	1.90	3.80	5.70	7.60	15.21
Inhibitory clear zone (mm.)	0.0±0.0	0.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.5±0.5	2.5±0.5

Table 2. Probit values calculation table to determine the value of LC_{50} 96 hrs. India almond leaves extract powder on Siamese fighting fish

	Probability	Confidence Limits				
		95% Confidence Limits for c			95% Confidence Limits for log(c)a	
		Average	Lowest	Upper Bound	Estimate	Lower Bound
PROBIT	0.30	1666.6902	1281.4090	1986.4233	3.221854869	3.1076878
	0.35	1698.2747	1320.5608	2027.8565	3.230007928	3.1207584
	0.40	1728.7985	1357.9514	2069.2904	3.237744383	3.1328842
	0.45	1758.8528	1394.2639	2111.5015	3.245229493	3.1443450
	0.50	1788.9406	1430.0520	2155.2345	3.252595929	3.1553518
	0.55	1819.5432	1465.8142	2201.2907	3.259962365	3.1660789
	0.60	1851.1750	1502.0511	2250.6208	3.267447475	3.1766847
	0.65	1884.4470	1539.3232	2304.4500	3.275183930	3.1873298
	0.70	1920.1581	1578.3286	2364.4804	3.283336989	3.1981974

a. Logarithm base = 10.