บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. สารเคมี

1.1 สารเคมีสำหรับทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของเชื้อ (ภาคผนวก ก)

1.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหาร (ภาคผนวก ข)

1.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ภาคผนวก ค)

1.4 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารทดลอง (ตารางที่ 2)

2. พันธุ์ปลานิล

2.1 ปลาขนาดเล็ก

ลูกปลานิลแดงแปลงเพศ ขนาด 2-3 นิ้ว จากสถานีเพาะเลี้ยงน้ำจืดลำปำ จังหวัดพัทลุง

2.2 ปลาขนาดใหญ่

ปลานิลแดงแปลงเพศ ขนาด 5-6 นิ้ว จากสถานีเพาะเลี้ยงน้ำจืดลำปำ จังหวัดพัทลุง

3. อาหารสำหรับปลานิลแดงแปลงเพศ

อาหารสำหรับอนุบาลปลาก่อนเริ่มการทดลองใช้อาหารชนิดลอยน้ำ 9961 ไฮเกร์ด มีคุณค่าทางอาหาร ได้แก่ โปรตีนไม่ต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ไขมันไม่ต่ำกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นไม่ต่ำกว่า 12 เปอร์เซ็นต์ และกากไม่ต่ำกว่า 4 เปอร์เซ็นต์

4. คุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาทดลอง

- ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	6.2-7.5	
- ออกซิเจนละลายน้ำ (DO)	3.0-5.5	พีพีเอ็ม
- ความเป็นด่าง (alkalinity)	50-100	พีพีเอ็ม
- ความกระด้าง	60-110	พีพีเอ็ม
- อุณหภูมิ	27-29	องศาเซลเซียส

5. สมุนไพร

5.1 สารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร 10 ชนิด คือ ขมิ้น ใบมะกรูด ผิวมะกรูด ตะไคร้หอม ตะไคร้ โหระพา กะเพรา พลู กานพลู และเปลือกอบเชยเทศ จากบริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอม ไทย-จีน จำกัด (Thai-China Flavours and Fragrances Industry Co., Ltd.) โดยการกลั่นด้วยไอน้ำ (stream distillation)

5.2 สารสกัดผงจากสมุนไพร 1 ชนิด คือสารสกัดขมิ้น จากบริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอม ไทย-จีน จำกัด (Thai-China Flavours and Fragrances Industry Co., Ltd.) โดยการสกัดหยาบ

5.3 สารสกัดหยาบสมุนไพร 8 ชนิด คือ เปลือกสะเดา ใบสะเดา หญ้าละออง ไพล น้ำนมราชสีห์ คำแสด ข่อย และมะกล่ำตาช้าง สกัดจากภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับเชื้อแบคทีเรีย

1.1 อุปกรณ์สำหรับแยกเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ ชุดผ่าตัด (มีดผ่าตัด กรรไกรผ่าตัด เล็ก–ใหญ่ กรรไกรตัดกระดูก และปากคีบ) ชุดแยกเชื้อ (ลูปเขี่ยเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ตู้บ่มเชื้อ (incubator) จานเพาะเชื้อ (plate) และอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแยกเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ Tryptic Soy Agar (TSA), Tryptic Soy Broth (TSB) Blood Agar (BA) หรือ Sheep Blood Agar (SBA) และชุดทดสอบคุณสมบัติของเชื้อทางชีวเคมี (API 20 STREP ยี่ห้อ bioMérieux, France) สำหรับแยกเชื้อสเตรฟโตคอคคัส

1.2 อุปกรณ์ทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ แผ่นยาทดสอบชนิดต่าง ๆ คือ เพนนิซิลิน (P ; 10 μg) นาลิไดสิค แอซิด (NA ; 30 μg) ซัลฟาเมททอกซาโซล/ไตรเมธโธพริม (SXT ; 25 μg) อีรีโทรมัยซิน (E ; 15 μg) ออกโซลินิค แอซิด (OA ; 2 μg) ไนโตรฟูแรนโทอิน (F ; 300 μg) นอร์ฟล๊อกซาซิน (NOR ; 10 μg) แอมพิซิลลิน (AMP ; 10 μg) คลอแรมเฟ็นนิคัล (C ; 30 μg) และออกซี่เตตร้าซัยคลิน (OT ; 30 μg) อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิด Mueller Hinton Agar (MHA)

2. อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงปลาทดลอง

2.1 ถังไฟเบอร์กลาสก์ขนาด 3 ตัน

2.2 ตู้กระจกทดลองขนาด 44x19x20 นิ้ว ปิดด้านข้างให้มีสีทึบเพื่อลดการรบกวนจากภายนอกด้วยแผ่นพลาสติกสีดำทั้ง 3 ด้าน

2.3 อุปกรณ์ระบบให้อากาศได้แก่ เครื่องให้อากาศ สายยาง หัวทราย

2.4 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำ ได้แก่ สายยางดูดตะกอน

2.5 อุปกรณ์ขนย้ายปลา ได้แก่ สวิงช้อนปลา ขันพลาสติก

3. อุปกรณ์สำหรับทดสอบความรุนแรงของเชื้อ

3.1 ไซริงก์ขนาด 1 ซีซี พร้อมเข็มฉีดยาสำหรับฉีดเชื้อ ขนาด 25 Gx1 นิ้ว

3.2 เครื่องมือสำหรับวัดค่า OD (เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS Spectrophotometer รุ่น UV -1201 ยี่ห้อ Shimadzu)

3.3 ตู้กระจกขนาด 44x19x20 นิ้ว ปิดด้วยพลาสติกสีทึบทางด้านข้างและด้านหลัง อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วย เครื่องให้อากาศ สายยางและหัวทราย

4. อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

4.1 อุปกรณ์วัดอุณหภูมิน้ำ คือ เทอร์โมมิเตอร์

4.2 อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (dissolved oxygen, DO) คือ เครื่อง DO meter ของ YSI model 57

4.3 อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) คือ เครื่อง pH meter ของ Mettler Delta รุ่น 340

4.4 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าความเป็นด่าง (alkalinity) ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต ลูกยาง ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ บิวเรตและชุดจับบิวเรต

5. อุปกรณ์การศึกษาพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ

5.1 ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด

5.2 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ของ Technicon Corporation รุ่น Autotechnicon Mono MOD. 2A

5.3 เครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อ ของ Jung AG Heidelberg ตู้อบ อ่างน้ำอุ่น (warm bath) เตาร้อน (hot plate) สไลด์

5.4 กล้องถ่ายภาพของ Olympus รุ่น AX 70 พร้อมกล้องบันทึกภาพ DP-10

6. อุปกรณ์สำหรับศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพร

6.1 หลอดทดลอง ขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมด้วยไมโครปิเปต (micropipette) ปริมาตร 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

6.3 อุปกรณ์ฆ่าเชื้ออุปกรณ์ทดลอง หม้อนึ่งความดัน (Tomy Seiko Co.,Ltd, SS-325) ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven)

6.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ MHA สำหรับทดสอบประสิทธิภาพสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อ พร้อมเครื่องแก้วและจานเพาะเชื้อ

7. อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง

7.1 เครื่องเตรียมอาหารทดลอง Hobart Model A 200T ประกอบ ชุดผสมอาหารแบบมีใบพัดและชุดเครื่องอัดเม็ดอาหาร

7.2 อุปกรณ์ชั่งตวงวัสดุอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง Satorius รุ่น Basic เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง Satorius รุ่น Research กระบอกตวง บีกเกอร์ ถาดเตรียมอาหาร

7.3 ตู้อบอาหาร

7.4 ตู้แช่แข็งใช้สำหรับเก็บอาหารระหว่างทดลอง

8. อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง

8.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ได้แก่ ขวดชั่ง (weighing bottle) ตู้อบ (hot air oven) ของ Memmert โถดูดความชื้น (desiccators) เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

8.2 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ เครื่องย่อย (digestion apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Kjeldatherm เครื่องกลั่น (distillation apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Vapodest I หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) กระบอกตวง บีกเกอร์ บิวเรต และขวดรูปชมพู่

8.3 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace) ของ Gallenkamp โถดูดความชื้น เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

8.4 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ไขมัน รุ่น Soxtec System HT6 ไส้กรองสาร ถ้วยสกัดสาร ตู้อบ โถดูดความชื้น เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติของเชื้อสเตรฟโตคอคคัส

1.1 แยกเชื้อแบคทีเรียจากปลาป่วยที่เลี้ยงในระบบธรรมชาติ

แยกเชื้อแบคทีเรียจากปลาป่วยที่แสดงลักษณะอาการลำตัวสีคล้ำและตกเลือดที่บริเวณลำตัวโดยทำการผ่าท้องปลาด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ (aseptic technique) เขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากตับ ไต สมอง และตา มาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) หรือ Blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สุ่มเลือกโคโลนีจากจานเพาะเชื้อมาย้อมสีแกรม เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อและทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) และออกซิเดส (oxidase) เพื่อแยกว่าเป็นเชื้อสเตรฟโตคอคคัสหรือไม่ จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วทำการเก็บรักษาเชื้อ (stock) ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) ที่มีกลีเซอร์รีน (glycerin) ผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity)

1.2 ทดสอบคุณสมบัติของเชื้อสเตรฟโตคอคคัส

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) เอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase) การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic) บน Sheep blood agar (SBA) ทดสอบการย่อยเจลาติน แป้ง (starch), แอสคูลิน (esculin) อาร์จินีน (arginine) โซเดียมฮิปปูเรต (sodium hippurate) ทดสอบความสามารถใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้แก่ อะราบิโนส (arabinose) กลูโคส (glucose) กลีเซอรอล (glycerol) แลคโตส (lactose) มอลโตส (maltose) แมนนิทอล (mannitol) ซูโครส (sucrose) ทรีฮาโลส (trehalose) และ ไซโลส (xylose) โดยใช้ชุดทดสอบ Api 20 strep (bioMérieux, France) การทนต่อสภาวะความเป็นด่าง (pH 9.6) และการเจริญเติบโตในความเค็ม 6.5 การทนต่ออุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ Bergey' s manual (Sneath *et al*., 1986)

1.3 ทดสอบความไวของเชื้อสเตรฟโตคอคคัสต่อยาปฏิชีวนะ

นำเชื้อสเตรฟโตคอคคัส ที่มีการเจริญเป็นลักษณะโคโลนีเดี่ยว ๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มาเขี่ยลงในน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับ McFarland No. 0.5 ใช้สำลีที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อสเตรฟโตคอคคัส แล้วนำไปเกลี่ย

ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA จนทั่วจานอาหารเพาะเชื้อ วางแผ่นยา (disc) ชนิดต่าง ๆ ทั้งหมด 10 ชนิด ดังนี้ เพนนิซิลิน (P ; 10 μg) นาลิไดสิค แอซิด (NA ; 30 μg) ซัลฟาเมธทอกซาโซล/ไตรเมธโธพริม (SXT ; 25 μg) อีรีโทรมัยซิน (E ; 15 μg) ออกโซลินิค แอซิด (OA ; 2 μg) ไนโตรฟูแรนโทอิน (F ; 300 μg) นอร์ฟล๊อกซาซิน (NOR ; 10 μg) แอมพิซิลลิน (AMP ; 10 μg) คลอแรมเฟ็นนิคัล (C ; 30 μg) และออกซี่เตตร้าซัยคลิน (OT ; 30 μg) วางลงบนอาหาร MHA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง วัดวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น จากนั้นแปลผลความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะโดยใช้ตารางมาตรฐาน (MacFaddin, 1980)

2. ศึกษาความรุนแรงของเชื้อสเตรฟโตคอคคัส (LD_{50} ที่ 10 วัน)

2.1 เตรียมปลาทดลอง

นำปลานิลแดงแปลงเพศ 2 ขนาด ที่ได้จากพ่อแม่พันธุ์เดียวกันมาเลี้ยง โดยน้ำหนักประมาณ 2 กรัม และ 90 กรัม ในถังไฟเบอร์มีน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนและให้อากาศตลอดเวลา ให้อาหารทุกวัน ๆ ละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) เพื่อปรับสภาพให้ปลาชินกับสภาพการทดลอง ประมาณ 1 สัปดาห์ และงดอาหาร 1 วัน ก่อนเริ่มทำการทดลอง

2.2 เตรียมเชื้อสเตรฟโตคอคคัส

นำเชื้อสเตรฟโตคอคคัสบริสุทธิ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หรือ SBA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง นำมาละลายในน้ำที่มีเกลือผสมอยู่ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ Standard Mcfarland No. 0.5 แล้วฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้องปลานิลแดงแปลงเพศ ทิ้งไว้จนปลามีลักษณะอาการคือ ลำตัวมีสีซีดและว่ายน้ำควงสว่าน ทำการแยกเชื้อจากปลามาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน จากนั้นให้ฉีดกลับเข้าสู่ตัวปลาใหม่อีก 2-3 ครั้ง เพื่อเพิ่มความรุนแรงของเชื้อ แล้วนำเชื้อที่ได้ครั้งสุดท้ายละลายด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร มีค่า OD เท่ากับ 1 ซึ่งมีปริมาณเชื้อ 10^9 โคโลนี/มิลลิลิตร นำเชื้อเริ่มต้นที่ได้มาทำการเจือจางให้ลดลง 10 เท่า (ten-fold steps) แล้วคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร โดยวิธี drop method (Collins and Lyne, 1976)

2.3 การทดลองหาค่า LD_{50} ที่ 10 วัน

การทดลองนี้เพื่อหาปริมาณของเชื้อสเตรฟโตคอคคัส โดยให้มีปริมาณเชื้อ 5 ระดับ ซึ่งอยู่ในช่วงปริมาณเชื้อมากสุดที่ทำให้ปลาตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ไม่สามารถทำให้ปลาตาย ซึ่งใช้ปลานิลแดงแปลงเพศ 10 ตัว ในแต่ละระดับฉีดเชื้อสเตรฟโตคอคคัสเข้าทาง

ช่องท้องในปริมาณที่เท่ากันทุกกลุ่มคือ 0.1 มิลลิลิตร/ตัว รวมทั้งกลุ่มควบคุมให้ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยงปลาในตู้ที่มีขนาด 44x19x20 นิ้ว ที่บรรจุน้ำปริมาณ 20 ลิตร บันทึกข้อมูลการตายของปลาแต่ละวันและนำข้อมูลมาคำนวณหาค่า LD_{50} ที่ระยะเวลา 10 วัน ตามวิธีของ Reed และ Muench (1938)

3. ศึกษาการใช้สมุนไพรต่อการต้านทานเชื้อสเตรฟโตคอคคัสในปลานิลแดงแปลงเพศ

ทำการคัดเลือกสารสกัด ที่ให้ผล MIC ดีที่สุด มา 1 ชนิด จาก 19 ชนิด เพื่อนำมาศึกษาต่อในสัตว์ทดลอง โดยมีลักษณะของสารสกัดดังนี้

- การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

ส่วนที่ 1 การสกัดน้ำมันหอมระเหย พืชสมุนไพร 10 ชนิด คือ ขมิ้น ใบมะกรูด ผิวมะกรูด ไคร้หอม ตะไคร้ โหระพา กะเพรา พลู กานพลู และเปลือกอบเชยเทศ

นำพืชสมุนไพรที่ได้คัดส่วนแล้วนำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น ชั่ง แล้วสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง แล้วนำไปบดให้เป็นผงละเอียด ชั่งน้ำหนัก แล้วหมักด้วยน้ำ แล้วมาสกัดโดยให้ไอน้ำผ่านพืชสมุนไพรที่จะสกัดน้ำมันหอมระเหยที่อยู่ในหม้อกลั่น ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจะถูกสกัดออกมาพร้อมกับไอน้ำผ่านไปตามท่อและถูกทำให้เย็นตัวเป็นของเหลวเก็บไว้ในขวด น้ำมันหอมระเหยจะแยกตัวออกจากชั้นน้ำ แล้วทำการแยกเอาน้ำมันหอมระเหยเก็บไว้ในตู้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไว้สำหรับทดลอง (บริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอม ไทย-จีน จำกัด)

ส่วนที่ 2 การสกัดหยาบสมุนไพร พืชสมุนไพร 9 ชนิดมาสกัด คือ ขมิ้น เปลือกสะเดาอินเดีย ใบสะเดาบ้าน หญ้าละออง ไพล น้ำนมราชสีห์ คำแสด ข่อย และมะกล่ำตาช้าง ดังนี้

นำพืชสมุนไพรที่ได้คัดส่วนแล้วนำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น ชั่ง สับเป็นชิ้นเล็ก ๆ อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง แล้วนำไปบดให้ละเอียดและชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำผงแห้งมาสกัดด้วยเอทานอล โดยทำการแช่เป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วกรองเอาส่วนสกัดไประเหยให้แห้ง ภายใต้ความดัน นำกากมาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง ระเหยแห้งแล้วรวบรวมสารสกัดทั้งหมดมาชั่ง แล้วเก็บสารสกัดไว้ในตู้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไว้สำหรับทดลอง

3.1 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อสเตรฟโตคอคคัส โดยใช้วิธี Agar dilution method

3.1.1 เตรียมสารสกัดสมุนไพร 19 ชนิด โดยนำแต่ละชนิดมาละลายด้วยสารทำละลาย dimethylsulphoxide (DMSO) (Hili *et al*., 1997) แล้วนำมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Agar (MHA) ในอัตราส่วน 1:100 (สารสกัด 0.2 มิลลิลิตร : MHA 19.8 มิลลิลิตร) ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลง 2 เท่า (2-fold serial dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 1,000, 500, 250, 125 และ 62.5 พีพีเอ็ม ดัดแปลงจาก Washington (1974) ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลอง นำมาเทลงในจานเพาะเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ส่วนชุดควบคุมใช้ MHA ผสมกับ DMSO

3.1.2 นำเชื้อสเตรฟโตคอคคัส ที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมง ละลายในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ฆ่าเชื้อแล้วให้มีความขุ่นเท่ากับ Standard Mcfarland No. 0.5 ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 1.5×10^{8} โคโลนี/มิลลิลิตร (มาลิน, 2540) หลังจากนั้นใช้วิธีการหยด (drop plating techniques) ดัดแปลงจาก Straka and Stokes (1957) ลงบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมอาหารผสมสารสกัดสมุนไพรไว้ในขั้นต้น แล้วนำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

อ่านผลโดยดูความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อสเตรฟโตคอคคัสโดยเทียบกับชุดควบคุม

3.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดสมุนไพร

คัดเลือกสมุนไพรที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดคือ น้ำมันเปลือกอบเชยเทศ นำมาตรวจสอบหาสารสำคัญด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ GC-MS ด้วยวิธี WI-RES-GC/MS-001 ใช้เครื่อง HP 5890 Gas Chromatograph คอลัมน์ HP-INNOWAX โดยการฉีดตัวอย่างน้ำมันเปลือกอบเชยเทศที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ภายใต้สภาวะคอลัมน์ที่อุณหภูมิเริ่มต้น 65 องศาเซลเซียส เพิ่มขึ้นจนถึง 200 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 5 องศาเซลเซียส/นาที โดยมีแก๊สฮีเลี่ยม (He) เป็นตัวพา (mobile phase) ที่อัตราเร็ว (flow rate) เท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที โดยสารที่ผ่านการแยกด้วย GC จะถูกนำเข้า Mass Spectrometry เพื่อศึกษาโครงสร้างและมวลโมเลกุลของน้ำมันเปลือกอบเชยเทศ ด้วยเครื่อง HP 5972 Mass Selective Detector โดยผ่านฟิลเตอร์เพื่อทำให้เข้มข้นขึ้น จากนั้นโมเลกุลของน้ำมันเปลือกอบเชยเทศจะถูกทำให้แตกตัวเป็นไอออนด้วยการให้โมเลกุลรับพลังงานที่มากพอที่ทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออน ด้วยอุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส และติดตามประจุบวกที่เกิดขึ้นที่มีน้ำหนักระหว่าง 35-350 เอเอ็มยู โดยเปรียบเทียบสเปกตรัมกับสารตัวอย่างมาตรฐาน

3.3 การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเจริญเติบโตและการต้านทานเชื้อสเตรฟโตคอคคัสในปลานิลแดงแปลงเพศ

3.3.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 5 ซ้ำ (replication) (ซึ่งแบ่ง 3 ซ้ำ เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต อีก 2 ซ้ำ นำไปศึกษาความต้านทานโรคและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อปลานิลที่ได้รับสารสกัดน้ำมันอบเชย) โดยแต่ละซ้ำจะใช้ปลาจำนวน 20 ตัว โดยน้ำหนักเฉลี่ยของปลาต่อตู้เท่ากับ 46.40-47.19 กรัม แต่ละตู้ทดลองบรรจุน้ำ 20 ลิตร ในระบบเลี้ยงให้อากาศตลอดระยะเวลาการเลี้ยงและให้อาหารวันละ 2 ครั้งเวลาเช้า 9.00 น. และเย็น 16.00 น. (วิมล และกิจจา, 2535) โดยให้ปลากินอาหารตามเปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัว (กรมประมง, 2541) เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งชุดการทดลองที่แบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลองตามความเข้มข้นของน้ำมันเปลือกอบเชยและการคำนวณหน่วยปริมาณสารดังตารางที่ 2

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารชุดควบคุม	0	พีพีเอ็ม
ชุดการทดลองที่ 2 อาหารผสมน้ำมันเปลือกอบเชยเทศ	250	พีพีเอ็ม
ชุดการทดลองที่ 3 อาหารผสมน้ำมันเปลือกอบเชยเทศ	500	พีพีเอ็ม
ชุดการทดลองที่ 4 อาหารผสมน้ำมันเปลือกอบเชยเทศ	1,000	พีพีเอ็ม

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบหน่วยความเข้มข้นของน้ำมันเปลือกอบเชยเทศ

ชุดการทดลองที่	หน่วย (พีพีเอ็ม)	หน่วย (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
1	0	0
2	250	259.25
3	500	518.5
4	1,000	1,037

หมายเหตุ : ค่าความถ่วงจำเพาะของน้ำมันเปลือกอบเชยเทศ เท่ากับ 1.0370 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร

3.3.2 การเก็บรวมข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980) ชั่งน้ำหนักทุก 2 สัปดาห์ สังเกตพฤติกรรมการกินอาหาร แล้วนำข้อมูลมาคำนวณการเจริญ

เติบโตตามวิธีการของ Jantrarotai และคณะ (1994) และประสิทธิการย่อยอาหาร โดยการคำนวณอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate) คำนวณตามวิธีการของ Dupree and Sneed (1966)

3.4 การศึกษาความต้านทานโรคปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารผสมสมุนไพรที่ระดับต่าง ๆ

สุ่มตัวอย่างปลาทุก 2 สัปดาห์ หลังได้รับอาหารผสมน้ำมันเปลือกอบเชยเทศที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อสเตรฟโตคอคคัส โดยนำปลา 10 ตัว จากแต่ละชุดการทดลองที่แยกไว้ 2 ซ้ำ โดยวิธีการฉีดเชื้อมีความเข้มข้นเท่ากับค่า LD_{50} (3.59×10^{3} โคโลนี/มิลลิลิตร) เข้าช่องท้องของปลาตัวละ 0.1 มิลลิลิตร บันทึกการตายของปลาในแต่ละวันแล้วนำไปหาค่า Relative Percent Survival (RPS) (วีณา, 2534 ; Ellis, 1988)

3.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารผสมสารสกัดสมุนไพร

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของปลา 2 ตัว จากแต่ละชุดการทดลองที่แยกไว้ 2 ซ้ำข้างต้น ทุก 2 สัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์ โดยเก็บเนื้อเยื่อเหงือก และอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ ไต และม้าม ดองเนื้อเยื่อในน้ำยาฟอร์มาลินเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาสภาพของเนื้อเยื่อ นำอวัยวะทั้งหมดผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ โดยใช้เครื่อง Automatic Tissue Processor นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราพลาสก์ แล้วนำมาตัดด้วยเครื่องไมโครโตม (sliding microtome) หนา 3 ไมครอน ตามวิธีของ Humason (1979) และย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin ตามวิธีของ Bancroft (1967) เพื่อนำมาทำเป็นสไลด์ถาวรและนำไปตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ โดยกล้องจุลทรรศน์