บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 วัสดุ

2.1.1 พันธุ์ปลากดเหลือง

ปลากดเหลืองวัยอ่อน น้ำหนักเฉลี่ย 2 กรัม นำมาจากสถานีประมงน้ำจืดสงขลา อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา

2.1.2 อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาก่อนเริ่มต้นการทดลอง

อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาในระยะแรกก่อนเริ่มต้นการทดลอง ใช้อาหารเม็ดสำหรับปลาดุกเล็กยี่ห้อไฮเกรด ซึ่งมีคุณค่าทางอาหาร คือ โปรตีนไม่ต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ไขมันไม่เกิน 6 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นไม่เกิน 12 เปอร์เซ็นต์ และเถ้าไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์

2.1.3 สารเคมี

สารเคมีระดับงานวิเคราะห์ (analytical grade) สำหรับใช้เตรียมอาหารทดลอง ประกอบด้วยวัตถุดิบอาหารกึ่งบริสุทธิ์ ได้แก่ เคซีน (casein) เป็นแหล่งโปรตีน เด็กซตริน (dextrin) เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต น้ำมันข้าวโพดและน้ำมันปลาเป็นแหล่งไขมัน (ตารางที่ 11) แร่ธาตุผสมเตรียมตามสูตรที่แสดงไว้ตอนท้ายของตารางที่ 11 ส่วนวิตามินผสมเตรียมตามสูตรในตารางที่ 12 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของอาหารและองค์ประกอบทางเคมีของปลา ตามวิธีมาตรฐาน AOAC (1985) (ภาคผนวก) และการศึกษาด้านเนื้อเยื่อวิทยาตามวิธีของ Humason (1972) และ Bancroft (1967) (ภาคผนวก)

2.2 อุปกรณ์

2.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงปลาทดลอง

2.2.1.1 ถังไฟเบอร์กลาสกลม ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เมตร

2.2.1.2 ตู้ทดลอง ใช้ตู้กระจกขนาด 100 x 50 x 47 เซนติเมตร ความจุน้ำ 200 ลิตร ปิดด้วยพลาสติกสีทึบทางด้านข้างและด้านหลัง

2.2.1.3 ชุดอุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วย เครื่องให้อากาศ สายยาง และหัวทราย

2.2.1.4 ชุดอุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำ ประกอบด้วย สายยางดูดตะกอน สายยางเปลี่ยนถ่ายน้ำ และปั๊มน้ำชนิดจุ่ม

2.2.2 อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง

2.2.2.1 เครื่องเตรียมอาหาร Hobart mixer รุ่น Model A 200T ประกอบด้วย ชุดเครื่องผสมอาหารแบบมีใบพัด และชุดเครื่องอัดเม็ดอาหาร

2.2.2.2 อุปกรณ์ชั่งตวงวัสดุอาหาร แร่ธาตุ และวิตามิน ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Research เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Basic บีกเกอร์ กระบอกตวง และถาดเตรียมอาหาร

2.2.2.3 ตู้แช่แข็ง สำหรับแช่อาหารทดลอง

2.2.3 อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ประกอบด้วย เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ถังน้ำบรรจุ 20 ลิตร ถังพลาสติกขนาด 3 ลิตร กะละมังพลาสติก และสวิงช้อนปลา

2.2.4 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปลา

2.2.4.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ได้แก่ ขวดชั่ง (bottle weight) ตู้อบ (hot air oven) ของ Memmert โถดูดความชื้น (desiccator) และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.2.4.2 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace) ของ Gallenkamp โถดูดความชื้น และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.2.4.3 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ได้แก่ เครื่องมือวิเคราะห์ไขมัน (fat extraction) ของ Soxtec System HT 6 ไส้กรองสาร ถ้วยสกัดสาร ตู้อบ โถดูดความชื้น และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.2.4.4 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) เครื่องย่อย (digestion apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Kjeldatherm เครื่องกลั่น (distillation) ของ Gerhardt รุ่น Vapodest 1 ขวดรูปชมพู่ กระบอกตวง และบิวเรต

2.2.5 อุปกรณ์ศึกษาพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ

2.2.5.1 ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด

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

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

2.2.5.4 กล้องถ่ายภาพของ Olympus รุ่น AX 70 และกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบของ Olympus รุ่น C-35 AD

2.3 วิธีการ

2.3.1 การเตรียมการทดลอง

2.3.1.1 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ใช้ตู้กระจกขนาด 100 ซ.ม. X 50 ซ.ม. X 47 ซ.ม. ขนาดบรรจุน้ำ 200 ลิตร (หน่วยทดลอง) ทำความสะอาดตู้ ปิดด้วยผ้าพลาสติกสีทึบ 3 ด้านเพื่อป้องกันการถูกรบกวนขณะทำการทดลอง และติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศ

2.3.1.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำปลากดเหลืองขนาดปลานิ้วจากสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดสงขลา น้ำหนักปลาเฉลี่ยเริ่มต้นตัวละประมาณ 2 กรัม จำนวน 3,000 ตัว อนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสกลมขนาด 1 ลบ.ม. โดยใส่น้ำในถังให้ได้ปริมาตรความจุ 0.5 ลบ.ม. ขณะอนุบาลลูกปลาให้อาหารลูกปลาดุกเล็ก ใช้เวลาอนุบาลประมาณ 1 เดือน ปลามีน้ำหนักเฉลี่ยตัวละประมาณ 3 กรัม ทำการคัดลงตู้ทดลอง

2.3.1.3 การเตรียมอาหารทดลอง

เตรียมอาหารทดลองทั้งหมด 5 สูตร ทุกสูตรมีวัสดุอาหารเหมือนกัน (ตารางที่ 11) มีองค์ประกอบของวิตามินและแร่ธาตุเหมือนกัน จะต่างกันเฉพาะสูตรที่ต้องการทดสอบวิตามินละลายไขมันแต่ละชนิด ซึ่งจะไม่เติมวิตามินละลายในไขมันชนิดนั้น เตรียมอาหารทดลองโดยผสมส่วนประกอบของวัสดุแห้งให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสมอาหาร (Hobart mixer) เติมแร่ธาตุตามปริมาณที่แสดงไว้ตอนท้ายของตารางที่ 11 โดยนำส่วนผสมต่าง ๆ มาบดให้ละเอียด จากนั้นจึงนำไปผสมกันโดยผสมจากส่วนที่มีปริมาณน้อยเข้ากันก่อนแล้วทะยอยผสมส่วนที่มีปริมาณมากขึ้นจนกระทั่งผสมทุกส่วนเป็นเนื้อเดียวกัน และวิตามินผสมตามปริมาณที่แสดงในตารางที่ 12 ยกเว้นวิตามินซีและวิตามินละลายในน้ำตัวอื่น ๆ นำมาละลายน้ำ 300 มล.ก่อน แล้วจึงนำไปผสมกับวัสดุแห้งในเครื่องผสมอาหาร เมื่อส่วนประกอบทุกอย่างผสมเข้ากันดีแล้ว จึงนำไปเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหารผ่านหน้าแว่นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม. ในการเลี้ยงปลาขนาดเล็กและเปลี่ยนเป็นขนาด 3 มม.เมื่อปลามีขนาดโตขึ้น ผึ่งอาหารให้แห้ง นำไปบรรจุในถุงพลาสติกแล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ นำอาหารไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้น ตามวิธีการมาตรฐานของ AOAC. (1985) ผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ พบว่ามีระดับโปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้น ใกล้เคียงกันทุกสูตรโดยมีค่าเฉลี่ยคือ 31.10 $\pm$ 0.82, 6.08 $\pm$0.67 , 5.12$\pm$0.02, 15.30$\pm$0.02 และ 47.61 $\pm$ 1.34 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อาหารทดลองทั้ง 5 สูตร ได้แก่

อาหารสูตรที่ 1 : เสริมวิตามินครบถ้วน

อาหารสูตรที่ 2 : ไม่เสริมวิตามินเอ

อาหารสูตรที่ 3 : ไม่เสริมวิตามินดี

อาหารสูตรที่ 4 : ไม่เสริมวิตามินอี

อาหารสูตรที่ 5 : ไม่เสริมวิตามินเค

ตารางที่ 11 ส่วนประกอบของอาหารทดลอง

วัสดุอาหาร	% ในอาหาร
เคซีนปราศจากวิตามิน (vitamin free casien)	29.0
เด็กซตริน (dextrin)	30.0
เซลลูโลส (cellulose)	18.5
สารเหนียว (ซี เอ็ม ซี) (carboxy methyl cellulose, CMC)	3.0
เจลลาติน (gelatin)	6.0
แร่ธาตุผสม[1]	5.5
วิตามินผสม	2.0
น้ำมันปลา	3.0
น้ำมันข้าวโพด	3.0

[1]ส่วนประกอบของแร่ธาตุผสม (กรัม/กิโลกรัมอาหาร) ประกอบด้วย $CaHPO_4.2H_2O$, 20.7; $CaCO_3$, 14.8; KH_2PO_4, 10; KCl, 0.1; NaCl, 6; $FeSO_4.7H_2O$, 0.5; $MgSO_4$, 3; KIO_3, 0.1; $CuSO_4.5H_2O$, 0.03; $ZnCO_3$, 0.15; $CoCl_2.6H_2O$, 0.0017; $NaMoO_4.2H_2O$, 0.0083; $Na_2SeO_3.5H_2O$, 0.0002

ตารางที่ 12 ส่วนผสมของวิตามินในอาหารทดลอง

ชนิดของวิตามิน	ปริมาณของวิตามินในอาหาร (กรัม/กิโลกรัม)				
	อาหารสูตร 1	อาหารสูตร 2	อาหารสูตร 3	อาหารสูตร 4	อาหารสูตร 5
1 **วิตามินเอปาลมิเตท*** (vitamin A-palmitate)	5000 IU	-	5000 IU	5000 IU	5000 IU
2 **วิตามินดี3**** (cholecalciferol)	1000 IU	1000 IU	-	1000 IU	1000 IU
3 **วิตามินอี***** (DL-alpha-tocopherol)	50 IU	50 IU	50 IU	-	50 IU
4 **วิตามินเค$_1$** (phylloquinone)	0.01	0.01	0.01	0.01	-
5 **โคลีนคลอไรด์** (choline chloride)	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
6 **กรดนิโคตินิค** (nicotinic acid)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
7 **วิตามินบี1** (thiamine hydrochloride)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
8 **วิตามินบี2** (riboflavin)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
9 **วิตามินบี6** (pyridoxine hydrochloride)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
10 **แพนโทเทนิค** (D-pantothenic acid calcium salt)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
11 **ไบโอติน** (biotin)	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
12 **กรดโฟลิก** (folic acid)	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
13 **วิตามินบี12** (cyanocobalbmin)	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
14 **ไมโออิโนซิทอล**(myo-inositol)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
15 **วิตามินซี** (ascorbyl monophosphate calcium)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10

* วิตามินเอปาลมิเตท 1 มิลลิกรัม = 1,750 IU

** วิตามินดี3 1 มิลลิกรัม = 40,000 IU

*** วิตามินอี 1 มิลลิกรัม = 1.1 IU

2.3.2 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ทดสอบวิตามินละลายในไขมัน 4 ชนิด คือ วิตามินเอ ดี อี และเค โดยกลุ่มควบคุมคือ กลุ่มที่ได้รับอาหารทดสอบที่เสริมวิตามินครบถ้วนทุกชนิด ระยะเวลาในการทดลองนาน 10 สัปดาห์ เริ่มการทดลองโดยสุ่มปลาที่มีน้ำหนัก 3.20–3.24 กรัม จำนวน 450 ตัวจากถังไฟเบอร์กลาสที่อนุบาลลูกปลาไว้ ใช้ปลา 30 ตัวต่อซ้ำ ทดลองในตู้กระจกขนาดความจุน้ำ 200 ลิตร โดยใช้ปริมาตรน้ำขณะทำการทดลอง 110 ลิตร ปิดตู้กระจกด้วยผ้าพลาสติกสีทึบ 3 ด้าน ป้องกันการถูกรบกวน ใช้น้ำประปาที่พักและให้อากาศเพื่อกำจัดคลอรีนไว้ 2-3 วัน ในระยะแรกของการทดลองเปลี่ยนถ่ายน้ำ 2 วันต่อครั้ง แต่เมื่อปลามีขนาดโตขึ้นจะเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ในช่วงเย็นหลังให้อาหารปลาประมาณ 2 ชั่วโมง ให้อาหารทดลองวันละ 2 ครั้งคือ ช่วงเช้าเวลา 8.30 น. และเย็นเวลา 16.30 น. โดยให้ปลากินจนอิ่ม

2.3.3 การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล

2.3.3.1 การตรวจสอบพฤติกรรม ความผิดปกติภายนอกและอวัยวะภายใน

ระหว่างการทดลองสังเกตพฤติกรรมที่ผิดปกติในปลาแต่ละกลุ่ม โดยตรวจสอบระหว่างการให้อาหาร และหลังการเปลี่ยนถ่ายน้ำ รวมทั้งสังเกตความผิดปกติภายนอก ได้แก่ สีของลำตัว การตกเลือด การเกิดบาดแผลที่อวัยวะภายนอก และผ่าดูอวัยวะภายใน

2.3.3.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ทำการชั่งน้ำหนักปลาทุก 2 สัปดาห์ เพื่อบันทึกน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น การชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละซ้ำด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่งโดยวิธีการแทนที่น้ำ (งดอาหารปลาก่อนชั่งน้ำหนักเป็นเวลา 1 วัน) นับจำนวนปลาที่เหลืออยู่ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำข้อมูลที่ได้มาคิดค่าเฉลี่ยของน้ำหนักปลาแต่ละตัว อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ตามวิธีการของ Mukhopadhyay และ Rout (1996) ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนตามวิธีการของ Zeitoun และคณะ (1973) อัตราการ กินอาหารตามวิธีการของ Yone และ Fujii (1975) และบันทึกอัตราการรอดตายของปลา แต่ละชุดการทดลองและคำนวณอัตรารอดตาย (%)

$$\text{อัตรารอดตาย (\%)} = \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้น}}$$

คำนวณอัตราการเจริญเติบโต โดยพิจารณาจาก

$$\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain \%)} = \frac{[\text{น.น.ปลาสุดท้าย} - \text{น.น.ปลาเริ่มต้น}] \times 100}{\text{น.น. ปลาเริ่มต้น}}$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR %/วัน)

$$= \frac{(\ln \text{ น.น.ปลาสุดท้าย} - \ln \text{ น.น.ปลาเริ่มต้น}) \times 100}{\text{เวลา (วัน)}}$$

คำนวณอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate) ตามวิธีการของ Dupree และ Sneed (1966) โดยสมการ

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR)} = \frac{\text{น.น.อาหารที่ปลากินทั้งหมด}}{\text{น.น.ปลาที่เพิ่มขึ้น}}$$

การคำนวณอัตราการกินอาหาร (rate of feed intake) โดยสมการ

อัตราการกินอาหาร (เปอร์เซ็นต์ต่อตัวต่อวัน)

$$= \frac{F \times 100}{\frac{Wo + Wt}{2} \times \frac{No + Nt}{2} \times t}$$

โดยที่ F คือ น้ำหนักอาหารแห้งที่ปลากิน

Wo คือ น้ำหนักปลาเฉลี่ยเริ่มต้น

Wt คือ น้ำหนักปลาเฉลี่ยสุดท้าย

No คือ จำนวนปลาเริ่มต้น

Nt คือ จำนวนปลาสุดท้าย

t คือ ระยะเวลาที่ปลาได้รับอาหารทดลอง

คำนวณประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio) ตามวิธีการของ Zeitoun และคณะ (1973) โดยสมการ

$$\text{ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER)} = \frac{\text{น.น.ปลาที่เพิ่มขึ้น}}{\text{น.น. โปรตีนที่ปลากิน}}$$

การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (apparent net protein utilization, ANPU) ตามวิธีของ Robinson และ Wilson (1985) โดยสมการ

$$\text{การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (\%)} = \frac{(\text{โปรตีนในตัวปลาสิ้นสุดการทดลอง-โปรตีนในตัวปลาเมื่อเริ่มต้น}) \times 100}{\text{น.น.โปรตีนที่ปลากินตลอดการทดลอง}}$$

2.3.3.3 การคำนวณค่าดัชนีตับต่อตัว (hepatosomatic index, HI)

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง สุ่มปลาจากทุกชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 6 ตัว นำปลาแต่ละตัวไปชั่งน้ำหนักตัว และน้ำหนักตับ นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าดัชนีตับต่อตัว ตามวิธีของ Anwar และ Jafri (1995)

$$\text{ดัชนีตับต่อตัว (\%HI)} = \frac{\text{น.น.ตับปลา} \times 100}{\text{น.น. ตัวปลา}}$$

2.3.4 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลา

สุ่มตัวอย่างปลาก่อนเริ่มการทดลองจำนวน 30 ตัว นำไปวิเคราะห์ความชื้นในร่างกายทันที และนำตัวอย่างปลาไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีการของ AOAC. (1985) บันทึกเป็นองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาเริ่มต้น เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มตัวอย่างปลาจากแต่ละตู้ทดลองตู้ละ 2 ตัว วิเคราะห์หาความชื้นของตัวปลา ปริมาณโปรตีน ไขมัน และเถ้า ของปลาตามวิธีมาตรฐานของ AOAC. (1985) แล้วบันทึกเป็นองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง จากนั้นจึงนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีน ตามวิธีการของ Zeitoun และคณะ (1973) การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ ตามวิธีการของ Robinson และ Wilson (1985)

2.3.5 การศึกษาองค์ประกอบเลือด

สุ่มปลาในตู้ทดลองตู้ละ 2 ตัว มาสลบด้วยน้ำยา 2-phenoxyethanol เจาะเลือดจากบริเวณโคนหาง โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ ของกรดเอทีลินไดอะมีนเตตราอะซีติก (ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA) เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพื่อศึกษาองค์ประกอบของเลือด คือ

2.3.5.1 Hemoglobin โดยวิธี Cyanmet-haemoglobin ของ Larsen และ Snieszko (1961)

2.3.5.2 Hematocrit โดยวิธีดัดแปลงจาก Blaxhall และ Daisley (1973)

2.3.5.3 Plasma protein โดยวิธีดัดแปลงจาก Lowry และคณะ (1951)

2.3.6 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา

เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการเก็บตัวอย่างโดยสุ่มเก็บเนื้อเยื่อตับ ไต เหงือก จากตัวอย่างปลาในตู้ทดลองตู้ละ 2 ตัว นำมาแช่ในสารละลายบูแอง (Bouin's fluid) 1 สัปดาห์ แล้วเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปผ่านกรรมวิธีเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีของ Humason (1972) เนื้อเยื่อถูกตัดให้มีความหนา 3-4 ไมโครเมตร แล้วย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) (Bancroft, 1967) จากนั้นนำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980)