บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำหนูแรทพันธุ์ Wistar เพศผู้ ที่สุขภาพดี สามารถสืบพันธุ์ได้ และมีอายุเฉลี่ยประมาณ 6 สัปดาห์ จำนวน 62 ตัว มาเลี้ยงในกรงด้วยอาหารเลี้ยงหนู (KMP Feedmills PTE Ltd) และน้ำ (*ad libitum*) ภายใต้อุณหภูมิ 26 ± 1 °ซ (ห้องปรับอากาศ) และแสงตลอด 24 ชั่วโมง (Dixit and Joshi, 1986) เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้หนูแรทมีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม จากนั้นทำการแบ่งหนูออกเป็นกลุ่มใหญ่ 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มแรก ศึกษา in vivo ทำการแบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มควบคุมจำนวน 12 ตัว และกลุ่มทดลองจำนวน 40 ตัว โดยแบ่งศึกษาออกเป็น 20 ตัว/35 วัน และ 20 ตัว/70 วัน ตามข้อ 3.1

กลุ่มหลัง ศึกษา in vitro ใช้หนู 10 ตัว ทำการศึกษาตามข้อ 3.2

2. วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับสัตว์ทดลอง

Animal cages 14" x 28"

Animal food (KMP Feedmills PTE Ltd) and water bottle

Triple beam balance (OHaus, USA.)

Electric balance (Libror FB 330 H, Shimadzu, Japan)

Plastic syringe 1 ml (Nipro Medical Instrument, Japan)

เครื่องมือผ่าตัดที่ประกอบด้วย : กรรไกรปลายมน 1 อัน

กรรไกรปลายโค้ง 1 อัน

Tooth forceps 1 อัน

Arterial fine forceps 1 อัน

2.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลาย Phosphate buffer saline

Sodium Chloride (NaCl: Merck, Germany)

Potassium chloride (KCl: BDH Chemical, England)

Calcium Chloride 2-hydrate cryst ($CaCl_2.2H_2O$: Merck, Germany)

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4: Merck, Germany)

Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4: Sigma, USA.)

Magnesium chloride cryst ($MgCl_2.6H_2O$: May & Baker, England)

D(+)-glucose monohydrate ($C_6H_{12}O_6.H_2O$: Merck, Germany)

Sodium pyruvate ($NaOOCCOCH_3$: Merck, Germany)

2.3 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้เตรียมสารสกัดและสารละลายสกัดจากกระเทียม

สารเคมี: Fresh garlic cloves (พันธุ์เชียงใหม่)

Chloroform (Standard lab)

Povidone (PVPK 30)

Siliga Gel 60 GF_{254}

Methyl alcohol

อุปกรณ์: Blender (Sear Roebuck and Co., USA.)

Rota vapour (Buchi, Switzerland)

UV detector (Model UVSL-58, San gabriel, USA.)

Harvard Trip balance (OHaus, USA.)

Thin-layer chromatography

Gas-chromatography

Glass-seperator

Filter paper No. 1

2.4 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ศึกษาการเคลื่อนที่ จำนวน และตัวอสุจิที่มีชีวิต

สารเคมี: 1 % Eosin Y

10 % Nigrosin

0.9 % Sodium chloride (NSS)

อุปกรณ์: Makler's counting chamber (Seffi-Medical Instrument, Haifa, Israel)

Hand counter (Clay Adams, Dickinson, USA.)

Inverted microscope (Diaphot-TMD, Nikon, Japan)

Magnetic sterror (USA.)

Vortor mixer (Model Genie II, USA.)

Water bath (Precision scientific, USA.)

Plastic tissue culture dish (Dickinson, USA.)

Plastic tissue culture tube (Dickinson, USA.)

Slide with frosted end and Cover glass

Micropipette

Stop Watch

2.5 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ศึกษาลักษณะรูปร่างของตัวอสุจิ

สารเคมี : Mayer's Haematoxylin

Orange G solution (OG-6)

EA-50 solution

Acid ethanol

Xylene

Ethyl alcohol(50%, 70%, 80%, 95% and 99.5%)

อุปกรณ์ : Inverted Microscope (Diaphot-TMD, Nikon, Japan)

Staining jar and rack

Slide with frosted end

Stop watch

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางวิทยาฮีสโตของอวัยวะที่เกี่ยวกับการสืบพันธุ์

สารเคมี : 10 % Formalin

Harris's Haematoxylin

Eosin solution

Acid alcohol

Saturated lithium carbonate

Absolute ethyl alcohol

Ethyl alcohol (20%, 80% and 95%)

Tissue embedding medium (paraplast)

Paraffin wax

Gelatin (48722 from porcine skin)

Xylene

อุปกรณ์ : Autotechnicon (Citadel 2000, Shandon, USA.)

Rotary microtome (Lipshaw 45, USA.)

Electric tissue float (Lipshaw 375, USA.)

Tissue embed (Shandon, USA.)

Hot owen (Lipshaw 21822, USA.)

Light microscope (Olympus, Japan)

Slide with frosted end and cover glass

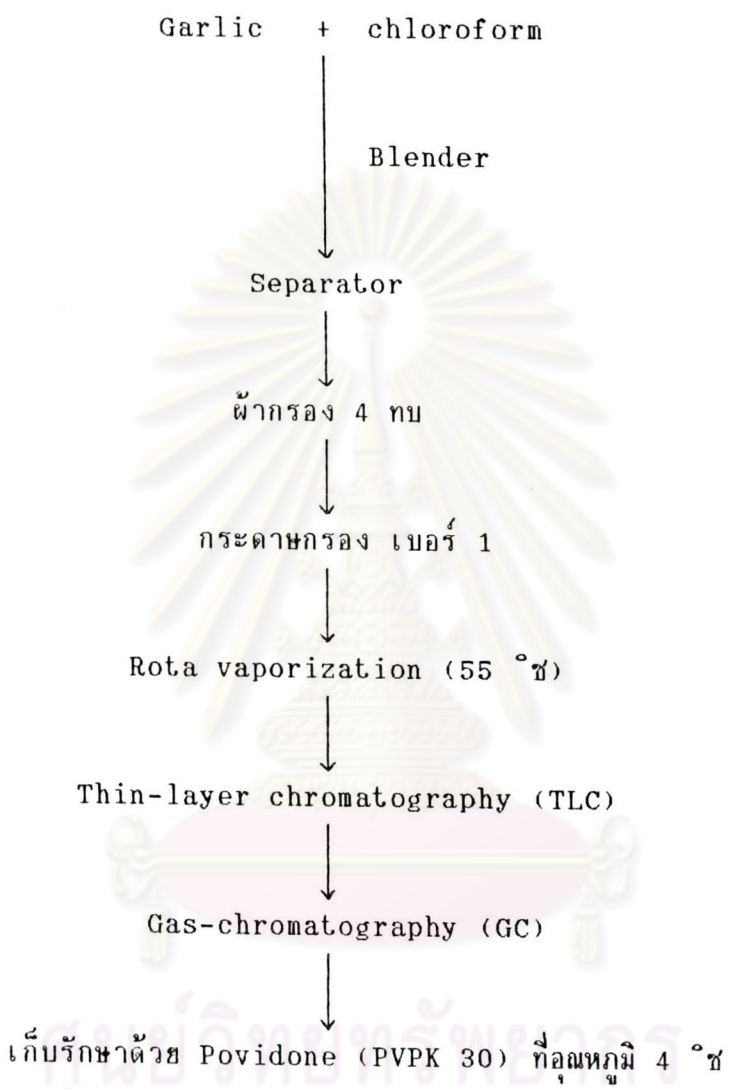
Staining jar and rack

3. การเตรียมสารสกัดจากกระเทียม

สกัดสารจากกระเทียมโดยใช้วิธีของโรงงานเภสัชกรรมทหาร (2527) ดังนี้

3.1 นำกระเทียมสดแกะกลีบ แยกส่วนที่ฝอทิ้งไป นำไปล้างน้ำให้สะอาดและผึ่งทิ้งไว้ให้แห้ง

3.2 นำกระเทียม 100 กรัม ผสมรวมกับคลอโรฟอร์ม 120 มิลลิลิตร นำไปปั่นรวมกันด้วยเครื่องปั่นนานจนเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน



รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารจากกระเทียม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019434

3.3 แยกส่วนกากและตะกอนออกโดยการกรองด้วยผ้ากรองพับหนา 4 ทบ, separator และกระดาษกรอง เบอร์ 1 ตามลำดับ

3.4 ระเหยไล่คลอโรฟอร์มออกโดยวิธี Rota vaporization ที่อุณหภูมิ 55 °ซ จะได้ crude oil สีเหลืองเข้มออกมา

3.5 ทดสอบความบริสุทธิ์ของ crude oil ด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน allyl sulfide (Sigma) โดยใช้แผ่นกระจกขนาด 24x4.5x0.5 ซม. ฉาบด้วย Siliga Gel 60 GF_{254} ของ Merck (5524) และใช้ solvent system ที่ประกอบด้วย methanol: chloroform (3:1) เป็นตัวชะ จากนั้นตรวจสอบหาตำแหน่งของสารที่เคลื่อนที่ด้วย UV detector พบว่าสารสกัดจากกระเทียมเคลื่อนที่ได้ระยะทางมี R_f เท่ากับ 0.74 ซึ่งเท่ากับสาร allyl sulfide นอกจากนี้นำ crude oil มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน allyl sulfide อีกครั้งด้วยวิธี Headspace Gas-chromatographic analysis (GC) ภายใต้สภาพเดียวกันตลอด พบว่าได้ค่า retention time ของ peak เท่ากับ 4.29 จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาหาปริมาณของ allyl sulfide พบว่ามีปริมาณของ allyl sulfide อยู่ร้อยละ 96

3.6 สารสกัดที่ได้นี้เป็นสารอัลลิซิน (allicin) และเพื่อให้คงสภาพอยู่ได้นานก็ทำการเก็บรักษาสารสกัดที่ได้โดยการเติม Povidone (PVPK 30) แล้วจึงนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ซึ่งการเก็บรักษาด้วยวิธีนี้จะทำให้สารสกัดมีความคงตัวประมาณ 1 ปี (โรงงานเภสัชกรรมทหาร, 2527; สุคนธ์ พูนพัฒน์ และคณะ, 2529) และการสกัดโดยใช้คลอโรฟอร์มนี้จะได้สารอัลลิซินประมาณ 5 % ของน้ำหนักกระเทียม

4. <u>วิธีดำเนินการวิจัย</u>

4.1 <u>in vivo</u>

แบ่งหนูแรทออกเป็นกลุ่ม ๆ ดังนี้

<u>กลุ่มควบคุม</u> ใช้หนูจำนวน 12 ตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกให้อาหารและน้ำตามปกติ และกลุ่มหลังให้น้ำเกลือ (NSS) เพิ่มโดยการป้อน (force feeding) วันละ 1 มล. นานเป็นเวลา 35 วัน และ 70 วัน จากนั้นจึงนำไปศึกษาตามขั้นตอนต่อไป

กลุ่มทดลอง ใช้หนูจำนวน 40 ตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามจำนวนวันทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ศึกษา 35 วัน มี 20 ตัว แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย ตามขนาดของสารสกัดจากกระเทียม ดังนี้

กลุ่มที่ 1.1 จำนวน 5 ตัว ป้อนสารสกัดจากกระเทียมที่มีความเข้มข้น 20 มก./มล. ต่อ น้ำหนักตัว 1 กก.

กลุ่มที่ 1.2 จำนวน 5 ตัว ป้อนสารสกัดจากกระเทียมที่มีความเข้มข้น 40 มก./มล. ต่อ น้ำหนักตัว 1 กก.

กลุ่มที่ 1.3 จำนวน 5 ตัว ป้อนสารสกัดจากกระเทียมที่มีความเข้มข้น 80 มก./มล. ต่อ น้ำหนักตัว 1 กก.

กลุ่มที่ 1.4 จำนวน 5 ตัว ป้อนสารสกัดจากกระเทียมที่มีความเข้มข้น 160 มก./มล. ต่อ น้ำหนักตัว 1 กก.

โดยทำการป้อนทุกวัน เป็นเวลานาน 35 วัน หลังจากครบกำหนด ให้หยุดการให้สารสกัดจากกระเทียม 24 ชั่วโมง แล้วจึงทำการ sacrifice หนู โดยทำ cervical dislocation เพื่อนำเอาอวัยวะที่ต้องการจะศึกษาออกมาศึกษาตามขั้นตอนต่อไป

กลุ่มที่ 2 ศึกษา 70 วัน มี 20 ตัว โดยทำการแบ่งศึกษาเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1

4.1.1 ศึกษาผลของสารสกัดจากกระเทียมต่อการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (sperm motility) และความหนาแน่นของตัวอสุจิ (sperm count or sperm density)(Orawan Ruangsomboon and Pachara visutakul, 1985; เอนก อารีพรรค และคณะ, 2531)

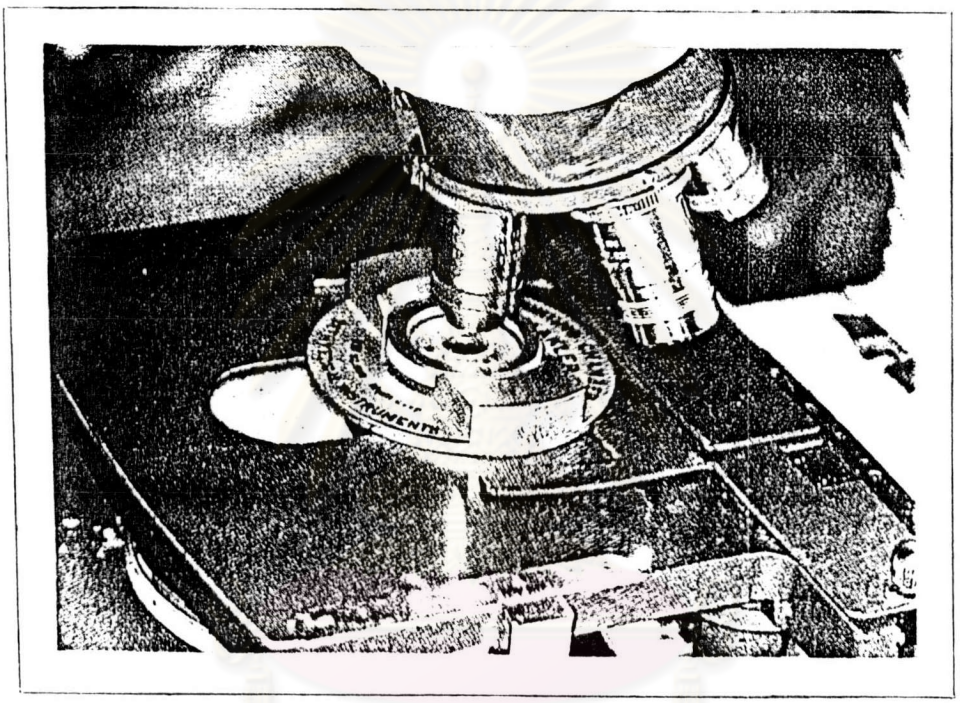
นำหนูมา sacrifice ผ่าเปิดช่องเชิงกรานเอาส่วนของ caudal epididymis ล้าง ใน 0.9 % NaCl (NSS) แล้วทำการตัดออกเป็น 3 ส่วนใส่ในจานแก้วที่มี Phosphate buffered saline (ดังตารางที่ 1) อยู่ 1 มิลลิลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิ 35 °ซ เพื่อ release เอาตัวอสุจิออกมา ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำมาดูการเคลื่อนที่ (กำหนดให้การเคลื่อนที่ออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ และมีการเคลื่อนที่เป็นแบบรุดหน้า (progressive) หรือ อยู่กับที่ (nonprogressive) หลังจากนั้นทำการนับจำนวนอสุจิ โดยนำน้ำเชื้ออสุจิใส่หลอดทดลองแล้วนำไปจุ่มใน beaker

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS)*

Component	mM	g/l
NaCl	136.89	8.00
KCl	4.77	0.36
$CaCl_2.2H_2O$	1.70	0.25
KH_2PO_4	1.19	0.16
$Na_2HPO_4.12H_2O$	4.29	1.54
$MgCl_2.6H_2O$	0.49	0.09
$C_6H_{12}O_6.H_2O$	5.05	1.00
$NaOOCCOCH_3$	0.25	0.03
pH 7.2 , T 35 °ซ		

* (WHO, 1987)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 แสดงการนับตัวอสุจิใน Makler counting chamber ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (หทัย เทพพิสัย และอุรุษา เทพพิสัย, 2533)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บรรจุน้ำร้อน เพื่อให้ตัวอสุจิตายแล้วใช้ปลายไม้เล็กแตะน้ำอสุจิลงบน Makler's counting chamber (Makler, 1978; 1980) ครอบฝากระจกลง ปรับมุมจนเข้าที่แล้ว จึงนับจำนวนตัวอสุจิในแต่ละ field (10 ช่องสี่เหลี่ยม) ด้วย hand-counter แล้วหาค่าเฉลี่ย (จำนวนตัวอสุจิx10^6)

4.1.2 ศึกษาผลของสารสกัดจากกระเทียมต่อตัวอสุจิที่มีชีวิต (sperm viability) (เอนก อารีพรรค และ คณะ, 2531)

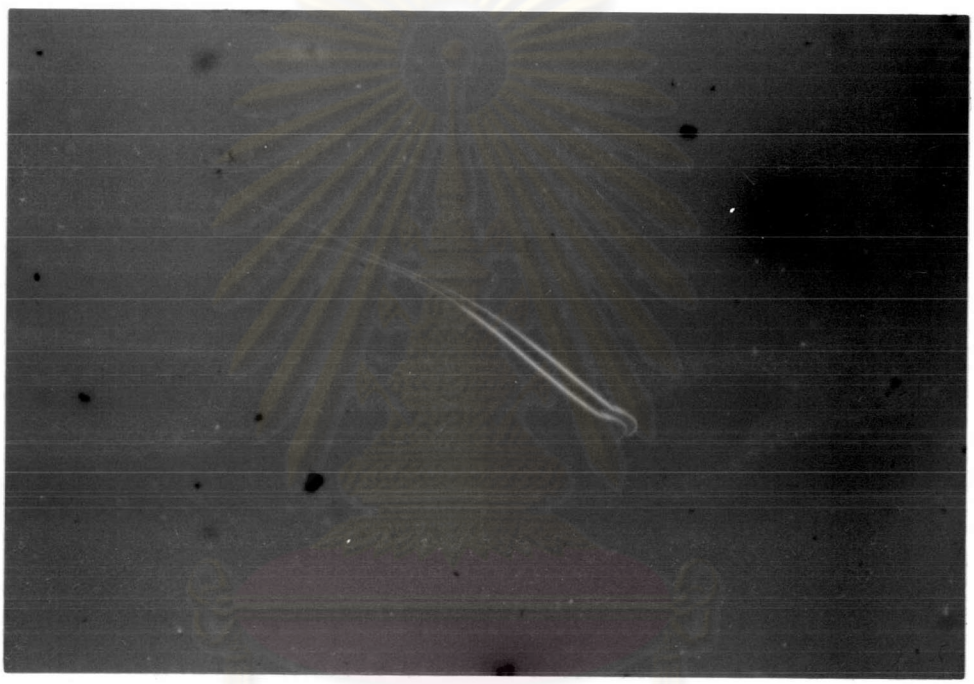
ใช้วิธีของ Supra-vital staining method โดยทำการหยดน้ำเชื้ออสุจิ 1 หยด แล้วตามด้วย 1 % Eosin Y 1 หยด ลงบนถาดหลุมหรือแผ่น slide ที่สะอาดผสมให้เข้ากันด้วยแท่งแก้ว ทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วหยด 10 % Nigrosin 2 หยด คนให้เข้ากัน หยดลงบนแผ่น slide ที่สะอาด แล้วใช้ cover slip ลาก ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทำการนับตัวอสุจิที่มีชีวิตใน 5 พื้นที่ คิดเป็นร้อยละ แล้วหาค่าเฉลี่ย (ตัวอสุจิเป็นจะไม่ติดสีในขณะที่ตัวอสุจิตายจะดูดสีแดงของ Eosin Y เข้าไป ส่วน Nigrosin จะเป็นตัวช่วยทำให้สีของพื้น slide เข้มขึ้น)

4.1.3 ศึกษาผลของสารสกัดจากกระเทียมต่อน้ำหนักตัวและอวัยวะสืบพันธุ์ (body and reproductive organs weight)

ทำการชั่งหนูในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่มไว้ เมื่อครบกำหนด จึงทำการ sacrifice หนูโดยการทำ cervical dislocation หรือทำให้สลบอย่างลิกโดยการให้ diethyl ether (Evans, et al., 1972; Gupta, Sanyal and Kanwar, 1989) แล้วผ่าเปิดช่องเชิงกรานเพื่อเอา testis, epididymis, seminal vesicle and coagulating gland, dorsal prostate gland และ ventral prostate gland ออกมาชั่ง จากนั้นทำการเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว และอวัยวะที่เกี่ยวกับการสืบพันธุ์ของหนูระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง หลังจากการให้สารสกัดจากกระเทียมทุกวัน เป็นเวลา 35 วัน และ 70 วัน ตามลำดับ

4.1.4 ศึกษาผลของสารสกัดจากกระเทียมต่อลักษณะรูปร่างของตัวอสุจิ (sperm morphology) (Eliasson, 1977 ; WHO, 1987)

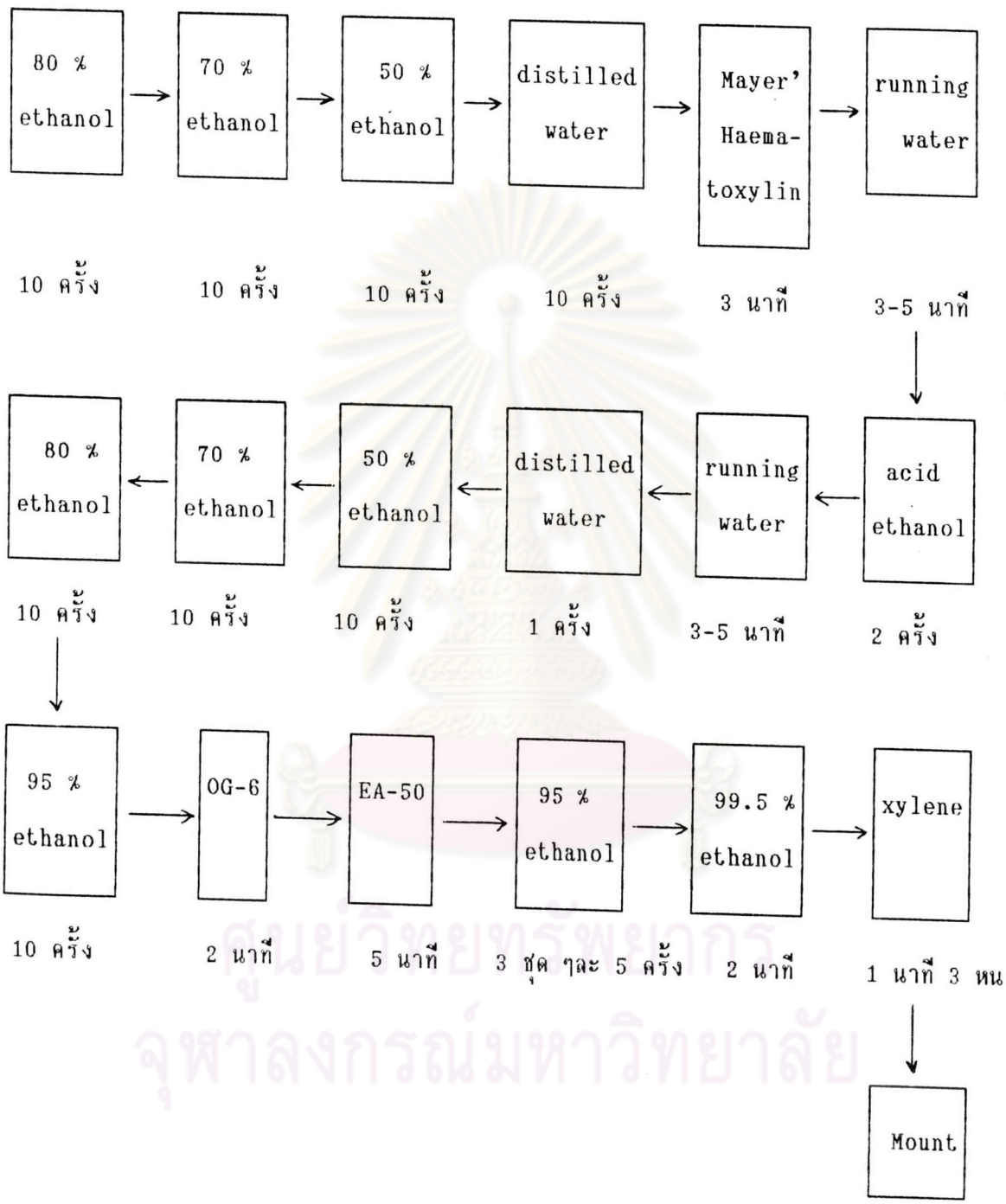
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 ภาพแสดงลักษณะตัวอสุจิของหนูแรทที่เจริญเต็มที่แล้ว
(Supra-vital; magnification: x400)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 แสดง " Step in Papanicoloau staining (Pap's) " *



* (เวคิน นพนิตย์, 2524)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

smear น้ำเชื้ออสุจิลงบนแผ่น slide ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วจึงทำการ fix ด้วย ethanol 95 % : ether (50:50) นานเป็นเวลา 5-15 นาที

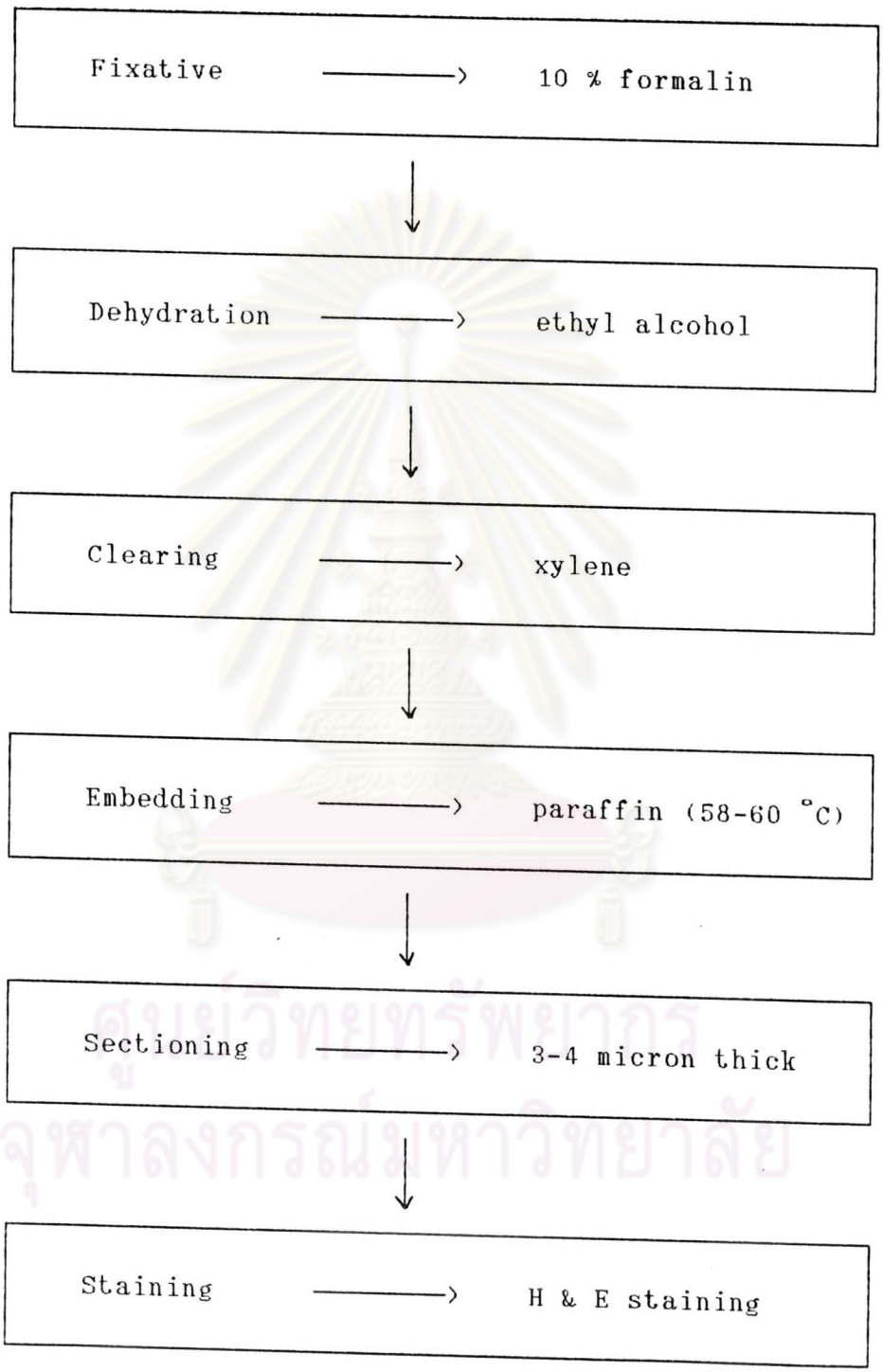
หลังจากนั้นทำการย้อมโดยใช้วิธี Papanicolaou staining method ดังนี้

1. จุ่ม slide ลงใน 80 %, 70 % และ 50 % ethanol ตามลำดับ ชุดละ 10 ครั้ง
2. จุ่มใน distilled water 10 ครั้ง
3. ย้อมใน Mayer's haematoxylin นาน 3 นาที
4. ล้างด้วย running water นาน 3-5 นาที
5. จุ่มใน Acid ethanol 2 ครั้งอย่างเร็ว
6. ล้างด้วย running water นาน 3-5 นาที
7. จุ่มใน distilled water 1 ครั้ง
8. จุ่มใน 50 %, 70 %, 80 % และ 95 % ethanol ตามลำดับ ชุดละ 10 ครั้ง
9. ย้อมใน Orange G 6 นาน 2 นาที
10. จุ่มใน 95 % ethanol 2 ชุด ชุดละ 10 ครั้ง
11. ย้อมใน EA-50 นาน 5 นาที
12. จุ่มใน 95 % ethanol 3 ชุด ชุดละ 5 ครั้ง
13. จุ่มใน 99.5 % ethanol นาน 2 นาที
14. จุ่ม slide ลงใน xylene นาน 1 นาที 3 ครั้ง แล้วเอาขึ้นมาซับแห้ง ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

4.1.5 ศึกษาผลของสารสกัดจากกระเทียมต่อลักษณะทางวิทยาฮีสโตของ testis และ epididymis ดังนี้ (Silliphant, ed., 1957)

1. หลังจาก sacrifice หนูแล้ว ทำการผ่าเปิดช่องเชิงกรานตัดเอา testis และ caudal epididymis ออกมาจากตัวหนู
2. นำชิ้นเนื้อมาทำการ fix ใน 10 % formalin นาน 12-16 ชม. แล้วตัดให้เล็กขนาดชิ้น 0.3-0.5 ซม.

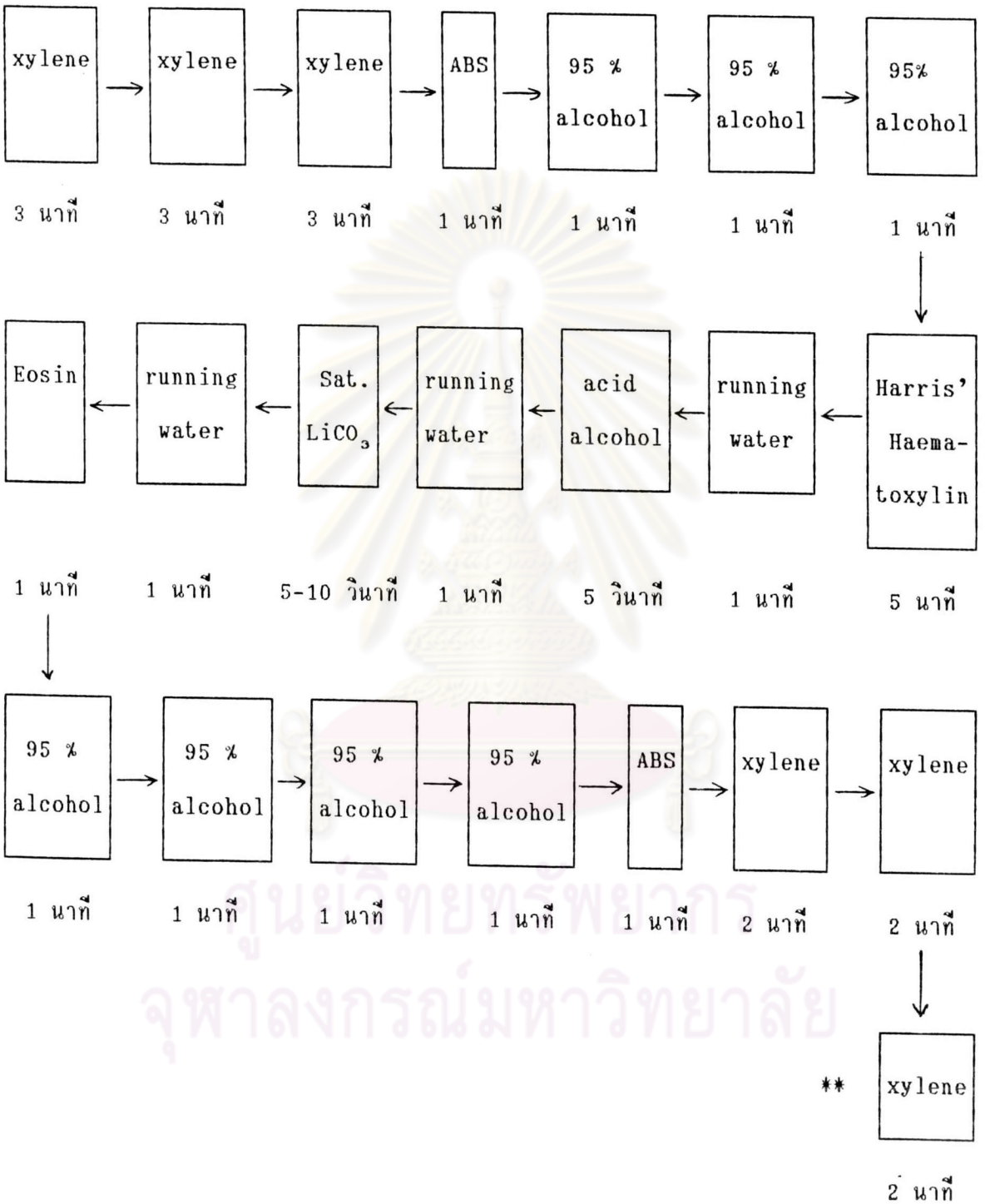
รูปที่ 5 แสดง " Step for tissue preparation " *



* (เวคิน นพนิตย์, 2524)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 แสดง " Step in staining section with Haematoxylin and Eosin " *



* (เวคิน นพนิตย์, 2524)

** slide remain in xylene until coverslipped

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ทำ dehydration โดยผ่านชิ้นเนื้อลงใน 80 % ethanol 2 ชุด ๆ ละ 1 ชม, 95 % ethanol 2 ชุด ๆ ละ 1 ชม. และ absolute alcohol 2 ชุด ๆ ละ 1 ชม.

4. นำชิ้นเนื้อมา clearing ด้วย xylene 3 ชุด ๆ ละ 1 ชม.

5. จากนั้นลงชิ้นเนื้อใน melting paraffin 2 ชุด ๆละ 1 ชม. แล้วนำไปทำการ embedding โดยลงใน paraffin wax และทำให้เย็นอย่างเร็ว

6. นำชิ้นเนื้อใน paraffin wax มาตัด Section ด้วยเครื่อง microtome ขนาดหนา 3-4 micron แล้วจุ่มลงใน 20 % ethyl alcohol และ gelatin ตาม ลำดับจากนั้นช้อนชิ้นเนื้อลงบน slide แล้วนำไป melt ในเตาอบที่ 58-60 °ซ เป็นเวลา 1/2 ชม. นำมาตากให้แห้ง

7. Staining ชิ้นเนื้อด้วย Haematoxylin & Eosin ดังนี้

7.1 จุ่มใน xylene 3 ชุด ๆ ละ 3 นาที

7.2 จุ่มใน absolute alcohol นาน 1 นาที

7.3 จุ่มใน 95 % ethanol 3 ชุด ๆ ละ 1 นาที

7.4 จุ่มใน absolute alcohol นาน 1 นาที

7.5 ย้อมใน Harris' haematoxylin นาน 5 นาที

7.6 ล้างด้วย running water นาน 2 นาที

7.7 จุ่มใน Acid alcohol 5 วินาที

7.8 ล้างด้วย running water นาน 1 นาที

7.9 จุ่มใน Saturated lithium carbonate ($LiCO_3$) 5-10 วินาที

7.10 ล้างด้วย running water นาน 1 นาที

7.11 ย้อมใน Eosin solution นาน 2 นาที

7.12 จุ่มใน 95 % ethanol 4 ชุด ๆ ละ 1 นาที

7.13 จุ่มใน xylene 3 ชุด ๆ ละ 1 นาที

7.14 นำ slide ไป permount แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 in vitro

ศึกษาผลของสารสกัดจากกระเทียมต่อตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ (motile spermatozoa)

ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Qian, et al. (1986) และ Waller, Zaneveld and Fong (1980) โดยนำสารสกัดจากกระเทียมที่เตรียมได้ ซึ่งมีความเข้มข้น 2,000 มก./มล. มา 1 มิลลิลิตร แล้วทำการละลายใน 0.9 % NaCl(NSS) 9 มิลลิลิตร ให้เข้ากันอย่างดี จะได้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 20 มก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มากพอและมีความสัมพันธ์กับการศึกษาใน in vivo จากนั้นนำมาเจือจางใน 0.9 % NaCl (NSS) อีกครั้ง ในอัตราส่วน 10, 20, 40, 80, 160, 320 และ 640 เท่าตามลำดับ ได้เป็นสารสกัดจากกระเทียมที่มีความเข้มข้น 20.0, 10.0, 5.0, 2.5, 1.25, 0.625 และ 0.3125 มก./มล. ตามลำดับ แล้วนำไปเก็บไว้ใน water bath อุณหภูมิ 35 °ซ

ทำการผ่าหนูขาว ตัดเอาส่วนของ caudal epididymis ออกมาล้างให้สะอาดด้วย 0.9 % NaCl (NSS) แล้วจึงนำมาตัดออกเป็น 3 ส่วน ใส่ในจานแก้วที่มี Phosphate buffered saline (pH 7.2) อยู่ ภายใต้อุณหภูมิ 35 °ซ เพื่อ release เอาตัวอสุจิออกมา แล้วทิ้งไว้ 10 นาที

จากนั้นนำสารสกัดจากกระเทียมที่เตรียมไว้ซึ่งมีความเข้มข้น 20.0, 10.0, 5.0, 2.5, 1.25, 0.625 และ 0.3125 มก./มล ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ของแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับน้ำเชื้ออสุจิ 0.1 มิลลิลิตร ให้เข้ากันอย่างรวดเร็วในจานแก้ว จากนั้นจึงหยดลงบน slide แล้วนำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ดูตัวอสุจิที่มีการเคลื่อนไหวภายในเวลา 20 วินาที ต่อ 5 พื้นที่ของ slide จากนั้นจึงเพิ่มเวลาเป็น 1, 3, 5, 10 และ 20 นาที จนกว่าจะเห็นการเปลี่ยนแปลง แล้วทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. นำเสนอข้อมูลในรูปกราฟ, ภาพประกอบและตาราง โดยหาค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD.) ของจำนวนตัวอสุจิ , เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ, เปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิที่มีชีวิตต่อตัวอสุจิที่ตาย และ น้ำหนักตัวพร้อมทั้งน้ำหนักอวัยวะที่เกี่ยวกับการสืบพันธุ์ของหนูแรท

2. ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่มที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันโดยใช้ "ตาราง ANOVA ชนิด one way analysis of variance (F-test)" พร้อมทั้งทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละ treatment โดยวิธี "Duncan's new multiple test"

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย