บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 สัตว์ทดลอง

ใช้พันธุ์ปลานิล *Oreochromis niloticus* Linn. จากหน่วยวิจัยเพาะเลี้ยงกรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จังหวัดปทุมธานี

นำปลานิลอายุประมาณ 2 สัปดาห์ จากหน่วยวิจัยเพาะเลี้ยงกรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จังหวัดปทุมธานี มาอนุบาลในตู้เลี้ยงปลาขนาดกว้าง 20 นิ้ว ยาว 42 นิ้ว และสูง 20 นิ้ว ใส่น้ำ 400 ลิตร เลี้ยงเพื่อให้ปรับตัวเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการคัดเลือกปลานิลที่มีสภาพสมบูรณ์แข็งแรงไม่มีโรคและมีขนาดใกล้เคียงกัน แล้วทำการสุ่มตัวอย่างจากปลานิลกลุ่มนี้แยกไปเลี้ยงเพื่อทำการทดลองต่อไป ปลานิลที่ระยะเริ่มต้นการทดลองมีอายุประมาณ 1 เดือน ความยาวเฉลี่ย 2.5 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 2 กรัม

3.1.2 อาหารสัตว์ทดลอง

เป็นอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำของบริษัทซีพี มีระดับโปรตีนประมาณ 15.5% ไขมันประมาณ 4% และมีส่วนประกอบต่าง ๆ ดังนี้คือ ปลาป่น เกล็ดถั่วเหลือง รำละเอียด กากมะพร้าวอัด ถั่วเหลืองนึ่ง ข้าวโพด ปลายข้าว ไวตามิน และเกลือแร่

3.1.3 การเตรียมน้ำเลี้ยงปลา

ใช้น้ำประปาที่ผ่านการกรองและตั้งทิ้งไว้ 2-3 วัน เพื่อให้คลอรีนระเหยไปให้ออกซิเจนตลอดการทดลอง

3.1.4 สารทดลอง

สารสกัดของเมล็ดสะเดาอินเดีย *Azadirachta indica* A. Juss. ซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า นีมิกซ์ จากบริษัทพืชพันธุ์ธรรมชาติ สารสกัดนี้อยู่ในรูปของสารละลายเข้มข้นในน้ำกลั่นเพื่อใช้เตรียมสารละลายความเข้มข้นต่าง ๆ ในการทดลองโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

3.1.5 สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการย้อมสีทดสอบความเป็นพิษมีรายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ข.

3.1.6 อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการเลี้ยงและการศึกษาทางเนื้อเยื่ออยู่ในภาคผนวก ก

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

3.2.1 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดสะเดา หรือนีมิกซ์ เพื่อกำหนดค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง (50% lethal concentration at 96 hours) โดยใช้วิธี Static acute toxicity test และวิเคราะห์หาค่า LC_{50} ด้วยโปรแกรมโปรบิต (Probit analysis) (Finney,1971)

ทดลองในโหลแก้วกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 นิ้ว สูง 14 นิ้ว และมีความจุ 12 ลิตร แล้วเติมน้ำหรือสารละลายที่มีปริมาณน้ำ 10 ลิตร จากนั้นนำลูกปลานิลอายุ 1 เดือน ที่เตรียมไว้สำหรับการทดลอง แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง แล้วดำเนินการทดลอง ทำ Rang-finding test และ Definitive test ดังนี้

Rang-finding test

ทำการทดลองหาช่วงความเข้มข้นของสารสกัดที่มีผลทำให้ปลานิลตายมากกว่าและน้อยกว่า 50% โดยกำหนดความเข้มข้นของนีมิกซ์เป็น 5 ระดับ ดังนี้คือ

0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 mg/l ตามลำดับ ทำการทดลอง 3 ซ้ำของแต่ละความเข้มข้น และใช้สัตว์ทดลองซ้ำละ 5 ตัว นับจำนวนปลานิลที่ตายภายในเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

Definitive test

นำผลการทดสอบจากข้อ 1 คือที่ช่วงระดับความเข้มข้น 10 ถึง 100 mg/l มาทำการทดสอบต่อโดยกำหนดค่าความเข้มข้นให้ละเอียดยิ่งขึ้นจำนวน 5 ระดับ คือ 30 , 35 , 40 , 45 และ 50 mg/l ตามลำดับ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว นับจำนวนปลาที่ตายในช่วงเวลา 24 , 48 , 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาหาค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง โดยวิธี Probit analysis (Finney , 1971)

3.2.2 การหาค่า Application factor (AF) นำค่า LC_{50} ที่ได้มาคำนวณหาค่า Application factor (AF) เพื่อกำหนดค่าความเข้มข้นในการทดลองหาความเป็นพิษที่ระดับความเข้มข้นต่ำเป็นเวลานาน 5 เดือน (long-term level toxicity test) ในขั้นตอนที่ 2 คำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$AF = MATC / LC_{50\ 96\ hrs.}$$

MATC = ค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารพิษที่ยอมรับได้

ค่า MATC ได้จากการประมาณโดยมีช่วงอยู่ระหว่างความเข้มข้น 2 ระดับคือ

NOEC = ค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่มีผลต่อการตายของสัตว์ทดลอง และ

LOEC = ค่าความเข้มข้นสูงสุดที่มีผลต่อการตายของสัตว์ทดลองน้อยที่สุด

3.2.3 การทดลองเพื่อศึกษาผลของสารสกัดสะเดาที่มีต่อเนื้อเยื่อตับปลานิลภายหลังได้รับสารในระดับต่ำเป็นระยะเวลานาน 5 เดือน

ทำการทดลองโดยใช้ปลานิลที่อายุประมาณ 1 เดือน นำมาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 150 ตัว ได้แก่ กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในน้ำที่มีสารสกัดเมล็ดสะเดาเข้มข้น 10.41 mg/l

เลี้ยงปลาอายุ 1 เดือนจำนวน 150 ตัว ในตู้เลี้ยงปลาขนาด 20 นิ้ว ยาว 42 นิ้ว และสูง 22 นิ้ว ใส่น้ำปริมาตร 300 ลิตร โดยใช้ Static renew system ทำการเปลี่ยนถ่าย

น้ำใหม่และเติมสารสกัดสะเดาอินเดียหรือนีมิกซ์ความเข้มข้น 10.41 mg/l ทุก 3 วัน เป็นเวลานาน 5 เดือน

สุ่มเก็บตัวอย่างปลาทุกกลุ่มซ้ำ ๆ ละ 8 ตัว ในเวลาทุก 1 เดือน เป็นเวลา 5 เดือน นำมาวัดขนาดความยาว ชั่งน้ำหนักตัวและน้ำหนักตับ ศึกษา %Relative liver weight เพื่อเปรียบเทียบค่าแตกต่างทางสถิติโดยใช้ Student T-test

นำตับปลาที่ได้มาแบ่งเป็น 3 ส่วน สองส่วนแรกดองด้วย 10% buffer formaline อีกส่วนหนึ่งดองด้วย 4% glutaraldehyde แล้วนำไปผ่านกระบวนการขั้นต่อไปตามวิธีมาตราฐานเพื่อนำมาศึกษาเนื้อเยื่อตับภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านตามลำดับ

3.3.วิธีการเตรียมเนื้อเยื่อตับเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน

3.3.1 วิธีเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาทางฮีสโตเคมี

นำชิ้นเนื้อตับขนาด 3 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มาดองในน้ำยา 10% buffer formaline แล้วฝังชิ้นเนื้อในสารตัวกลางในกระทงที่ทำด้วยกระดาษฟรอยด์ตามเทคนิคของ Ferri และคณะ (1987) จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อภายใต้ความเย็น ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หนา 5 ไมโครเมตร แล้วนำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้ไปผ่านกระบวนการย้อมสีแบบพิเศษเพื่อศึกษาทางฮีสโตเคมีดูการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบพวกไกลโคเจนและไขมันภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อตับปลานิลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

วิธีการย้อมสีเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาไกลโคเจนภายในเซลล์โดยใช้ Periodic acid-schiff method (PAS) ตามเทคนิคของ Gurr (1963)

1. นำสไลด์เนื้อเยื่อแช่ในน้ำยา periodic acid เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 3 นาที

2. แช่สไลด์ในน้ำยา schiff reagent นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 5 นาที

3. แช่สไลด์ในน้ำยา sulfurous acid 3 ครั้ง ๆ ละ 2 วินาทีในแต่ละ staining jar แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

4. นำมาย้อมนิวเคลียสด้วยสี haematoxylin นาน 2 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำประปาจนเห็นนิวเคลียสสีน้ำเงิน

5. จากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกด้วย ethyl alcohol 70%, 80%, 90%, 95%และ 100% n-buthanol ตามลำดับ

6. แช่สไลด์ใน xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที mount สไลด์ด้วย canada bulsam ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสง

ผลที่ได้จากการย้อม

: ในปฏิกิริยาที่ให้ผลบวก ไกลโคเจนหรือสารพวกโพลีแซกคาไรด์จะย้อมติดสีชมพูแดง แต่ถ้าปฏิกิริยาให้ผลลบ จะไม่เกิดสีภายในไซโตพลาสซึม

: นิวเคลียสย้อมติดสีน้ำเงิน

วิธีการย้อมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาไขมันโดยใช้วิธีการย้อมไขมันด้วยสี Oil red O **(เทคนิคที่ดัดแปลงโดยภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)**

1. แช่สไลด์ของ frozen section ใน 70% ethyl alcohol นาน 3 นาที และนำไปย้อมด้วยสี Oil red O นาน 5 นาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่น

2. แช่สไลด์ในน้ำยา haematoxylin นาน 20 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปานาน 10 นาที

3. mouth สไลด์ด้วย glycerine jelly

ผลที่ได้จากปฏิกิริยา : ไขมันย้อมติดสีส้มแดง

: นิวเคลียสย้อมติดสีน้ำเงิน

3.3.2 วิธีการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อตับโดยใช้วิธีพาราฟิน และย้อมสี H&E เพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

1.นำชิ้นเนื้อตับขนาด 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาดองในน้ำยา 10% buffer formaline เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.แช่ชิ้นเนื้อใน ethyl alcohol เปอร์เซนต์ต่าง ๆ เพื่อดึงน้ำออกโดยแช่ใน 70% ethyl alcohol นาน 1 ชั่วโมง 90% alcohol นาน 6 ชั่วโมง 95% alcohol นานครั้งละ 6 ชั่วโมง 2 ครั้ง และ 100 % n-butanol 1 ชั่วโมง ตามลำดับ

3. แช่ชิ้นเนื้อใน xylene$_1$ ชั่วโมง

4. แล้วนำมาแช่ในสารละลายที่มี xylene+wax ที่ละลายในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 30 นาที ภายในตู้อบอุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส แล้วย้ายลงใน wax$_1$ จากนั้นย้ายลงใน wax$_2$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5. ฝังชิ้นเนื้อลงใน paraplast

6. นำชิ้นเนื้อที่ฝัง paraplast มาตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบ rotary microtome ตัดหนา 5 ไมโครเมตร และติดบนแผ่นสไลด์แก้ว

วิธีการย้อมสี Haematoxylin และ Eosin

1. นำสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อแช่ใน xylene 2 ครั้ง ๆละ 5 นาที

2. แช่ใน alcohol เปอร์เซนต์ต่างๆ จาก 100%butanol, 95%, 90% และ 70% ethanol ตามลำดับ เป็นเวลา 3 นาที ทุกขั้นตอน

3. นำสไลด์จากขั้นตอนที่ 6 มาย้อมด้วยสี haematoxylin นาน 12 นาทีแล้วจึง differentiate ในสารละลายที่ประกอบด้วย 70% ethyl alcohol 100 ml + 2-3 หยด HCL (conc.) นาน 1 วินาที

4. จากนั้นล้างในน้ำประปา 10 นาทีจนเห็นนิวเคลียสติดสีน้ำเงินเข้ม

5. นำมาดูดน้ำออกจากสไลด์ด้วย 70%, 90% ethyl alcohol ขั้นตอนละ 3 นาที

6. ย้อมด้วยสี eosin นาน 2 วินาที ล้างสีส่วนเกินด้วย 95% ethyl alcohol นาน 2 วินาที

7. ดึงน้ำออกโดยแช่ใน 10% n- butyl alcohol

8. แช่สไลด์ใน xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 8 นาที แล้ว mount สไลด์ด้วย canada balsam

3.3.3 วิธีเตรียมเนื้อเยื่อตับเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน

นำชิ้นเนื้อตับขนาด 1 มิลลิเมตร ผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีมาตราฐาน (Rapid method) ดัดแปลงโดยภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ ศิริราช

1. นำเนื้อตับขนาด 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มาดองด้วยน้ำยา 4% glutaraldehyde ที่ละลายด้วยสารละลาย millonig's phosphate buffer pH 7.2 เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วย phosphate buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที จากนั้นแช่ในน้ำยา 1% osmium tetroxide นาน 45 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที นำมาย้อมด้วย 2% uranyl acetate นาน 20-30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที

2. ดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อด้วย ethyl alcohol ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 70% , 80%, 90%, 95% และ 100% ตามลำดับครั้งละ 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที

3. แช่ propylene oxide เป็นเวลานาน 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที จากนั้นถ่ายเนื้อเยื่อลงในสารละลายที่มี propylene oxide + Plastic ชนิด epoxy resin อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลานาน 15 นาที และถ่ายลงใน epoxy resin plastic เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง ทำในตู้อบอุณหภูมิ 37 °C จากนั้นฝังชิ้นเนื้อตับลงในพลาสติกที่บรรจุอยู่ใน beam capsule แล้วนำไปอบให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำมาแกะออกจาก capsule แล้วนำไปอบต่อที่อุณหภูมิ 100°C นาน 1 ชั่วโมง

4. นำเนื้อเยื่อที่ฝังในพลาสติกมาตัดด้วยเครื่องตัด ultramicrotome หนา 50 ไมโครเมตร ช้อนเก็บเนื้อเยื่อด้วยกริดทองแดง

5. นำกริดที่มีชิ้นเนื้อตับมาย้อมด้วย 5% uranyl acetate นาน 20 นาที และย้อมต่อด้วยสารละลาย lead acetate เป็นเวลา 15 นาที แต่ละขั้นตอนล้างออกด้วยน้ำกลั่นและซับกริดให้แห้ง และนำกริดที่ย้อมแล้วไปเก็บในกล่องที่สะอาด ซึ่งป้องกันฝุ่นเพื่อเตรียมนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน TEM ยี่ห้อ Jeol รุ่น JEM 1210

3.4 วิธีการเก็บข้อมูลทางกายภาพของน้ำที่ใช้เลี้ยงปลา

เก็บข้อมูลทางกายภาพของน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาตลอด 5 เดือน เพื่อศึกษาสมบัติทางกายภาพบางประการของน้ำเลี้ยงปลาดังนี้

1. วัดอุณภูมิของน้ำในตู้ปลา 2 ครั้งต่อวัน ในช่วงเช้าเวลา 10.00 น. และในช่วงบ่ายเวลา 16.00 น. และวัดอุณหภูมิห้อง

2. วัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำในวันที่ 1 และ 3 ของการเปลี่ยนถ่ายน้ำโดยใช้เครื่องวัด pH meter ยี่ห้อ Philips รุ่น PW 9409 digital pH meter เดือนละ 2 ครั้ง

3. วัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำ (DO) เดือนละ 2 ครั้ง ในวันที่ 1 และ 3 ของการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ด้วยเครื่อง Oxygen meter รุ่น YSI 518

4. เก็บข้อมูลความกระด้างของน้ำ (hardness) จากฝ่ายวิเคราะห์คุณภาพน้ำของการประปาสามเสน กรุงเทพมหานคร ทุก 1 เดือน

3.5 การวิเคราะห์ผล

1.วิเคราะห์ข้อมูลของค่าความเป็นพิษเฉียบพลันที่ 96 ชั่วโมง (LC_{50} 96 ชั่วโมง) และสร้างกราฟเส้นตรงของ dosage mortality regression line โดยใช้โปรแกรม Probit analysis (Finney,1971)

2. วิเคราะห์และเปรียบเทียบค่าทางสถิติของ %Relative liver weight ในระหว่างกลุ่มทดลองและกับกลุ่มควบคุมโดยใช้ Student T-test

3.วิเคราะห์ผลการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับปลานิลที่ได้รับสารสกัดสะเดาอินเดียหรือนีมิกซ์ ตั้งแต่เดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านพร้อมกับบันทึกผลและถ่ายภาพ

4. การเก็บข้อมูลทางกายภาพของน้ำเลี้ยงปลาตลอดการทดลอง และบันทึกผล

รูปที่ 3.1 สารสกัดจากเมล็ดสะเดาอินเดียทางการค้า (Neemix)