บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

การวิจัยแบ่งออกเป็น 5 ส่วนดังนี้

1. การศึกษาสารสกัดใบฝรั่ง
2. การศึกษาผลของสารสกัดใบฝรั่งต่อเชื้อ *A. hydrophila* นอกตัวสัตว์ (*in vitro*)
3. การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดใบฝรั่งก่อนทดลอง (*in vivo*)
4. การศึกษาผลของสารสกัดใบฝรั่งต่อปลาคาร์พที่ไม่ฉีดเชื้อ (*in vivo*)
5. การศึกษาผลของสารสกัดใบฝรั่งต่อปลาคาร์พที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

<u>ส่วนที่ 1 การศึกษาสารสกัดใบฝรั่ง</u>

3.1.1 การเตรียมสารสกัด

นำใบฝรั่งตากแห้งบดเป็นผงละเอียดที่จำหน่ายเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากร้านขายสมุนไพร มาผ่านกระบวนการให้ได้เป็นสารสกัดเข้มข้น โดยนำผงใบฝรั่งมาชั่งน้ำหนักให้ได้ 5 กิโลกรัม มาแช่ในถังที่มีเอทานอล (ethanol) เข้มข้นร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย (solvent) ปริมาตร 25 ลิตร จำนวน 3 ชุด ปิดฝาทิ้งไว้และทำการเปิดฝากวนให้ของผสมเข้ากันทุกวัน วันละ 2 รอบ ๆ ละ 5 นาที เป็นเวลา 5 วัน

เมื่อหมักใบฝรั่งจนครบ 5 วัน ทำการเก็บของผสมที่ได้มากรองด้วยถุงผ้าขาวบาง 2 ชั้น 2 ครั้ง เพื่อแยกกากออก จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนกากผงใบฝรั่งที่เหลือออกเป็นขั้นต้น แล้วจึงนำส่วนที่เป็นสารละลายชั้นบนมาผ่านการปั่นอีก 1 รอบ เพื่อแยกสารแขวนลอยขนาดเล็กออกจนได้สารละลายใสสีน้ำตาล

นำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดใบฝรั่งที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขี้ม้าเข้ม สามารถบดละเอียดเป็นผงได้ แล้วนำมาใส่ในขวดแก้วมีฝาที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปิดกันแสงด้วยกระดาษอลูมิเนียม แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ บันทึกลักษณะทางกายภาพและลักษณะของสารที่ได้ เพื่อนำไปหาเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดต่อใบฝรั่งแห้งบดผง (ดัดแปลงจาก Chah *et al.*, 2006; Olajide *et al.*,1999)

3.1.2 องค์ประกอบทางเคมี

นำสารสกัดใบฝรั่งที่ได้ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี/แมสสเปคโตมิเตอร์ (GC/MS) (รายละเอียด ดังภาคผนวก ข 1.) ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.3 ปริมาณแทนนินรวมในสารสกัดใบฝรั่ง

นำสารสกัดใบฝรั่งที่ได้ปริมาณ 20 กรัม ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแทนนินรวม ที่สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ดังภาคผนวก ข 2.

ส่วนที่ 2 การศึกษาผลของสารสกัดใบฝรั่งต่อเชื้อ A. hydrophila นอกตัวสัตว์ *(in vitro)*

3.2.1 การหาความเข้มข้นของสารสกัดใบฝรั่งต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentrations; MIC)

3.2.1.1 การเตรียมเชื้อ *A. hydrophila*

นำเชื้อ *A. hydrophila* ที่ได้จากการแยกเชื้อในปลา ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาทำการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเลือด (blood agar) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมานำโคโลนีของเชื้อมาดูความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียบนแผ่นสไลด์สด (Guz and Kozinska, 2004) จากนั้นทำการเขี่ยเชื้อจากจานเพาะเชื้อมาละลายใน Normal saline เขย่าให้สารผสมขุ่น แล้วเทียบความขุ่นให้ได้ค่าความขุ่นเท่ากับ McFarland standard 0.5 (ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml) เพื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติของเชื้อทางชีวเคมีด้วยวิธี API 20E assay (Bio Merieux, France) และ เก็บเชื้อไว้ใน Stock agar (ผลการตรวจ API 20E assay ดูในภาคผนวก ค.)

3.2.1.2 การทดลองในจานอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัดใบฝรั่ง

นำเชื้อ *A. hydrophila* ที่ใช้ในการทดลองมาทดสอบ MIC ของสารสกัดใบฝรั่ง โดยใช้วิธี Agar dilution method ซึ่งดัดแปลงจาก Schmidt *et al.* (2000) โดยนำสต็อกสารสกัดใบฝรั่ง 10 เปอร์เซ็นต์ (ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์) มาละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ให้ได้ความเข้มข้น 0, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 และ 1000 พีพีเอ็ม (ผสมสารสกัดใบฝรั่งในเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ต่อ MHA 18 มิลลิลิตร หรือ 1:10) แล้วจึงเทลงบนจานเพาะเชื้อ (Petri dish) ผึ่งในอุณหภูมิห้องให้อาหารแข็งตัว จากนั้นนำเชื้อ *A. hydrophila* ที่เตรียมไว้ (ความขุ่นเท่ากับ McFarland standard 0.5) มาเจือจางด้วย Normal saline อัตราส่วน 1:10 เพื่อให้มีเชื้อความเข้มข้นประมาณ 10^7 cfu ต่อมิลลิลิตร ใช้ micropipette ดูดสารละลายเชื้อ 100 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ เกลี่ยให้ทั่ว แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการเจริญเติบโตของเชื้อ ทำซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกค่าผลที่ได้ แล้วนำผล MIC ที่ได้มาใช้ในการทดลองส่วนต่อไป

3.2.2 การหาความไวของยาปฏิชีวนะ (sensitivity test) ต่อเชื้อ *A. hydrophila* ในจานทดลอง

นำเชื้อ *A. hydrophila* ที่ได้จากการแยกเชื้อในปลาคาร์พที่เตรียมไว้ มาทำการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยวิธี Disc diffusion plate โดยการเตรียมเชื้อ *A. hydrophila* ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard 0.5 นำมาเกลี่ยบนผิวหน้า MHA วาง paper disc ของยาปฏิชีวนะ 11 ชนิด (Antibiotic control) คือ Penicillin, Erythromycin, Kanamycin, Streptomycin, Chloramphenicol, Sulfametoxazone, Gentamycin, Tetracycline, Polymycin B, Norfloxacin, Enrofloxacin และเอทานอล (กลุ่มควบคุม) ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone ด้วย Vernier caliper ($\pm$ 0.1) ทำซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกผล (Huys, 2002)

นำยาปฏิชีวนะที่มีความไวต่อเชื้อสูงสุดในการทดลองนี้ คือ Enrofloxacin มาใช้ในการผสมอาหารและน้ำจุ่มปลาต่อไปในการทดลองส่วนที่ 4 และ 5

ส่วนที่ 3 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดใบฝรั่งก่อนการทดลอง

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบฝรั่งที่ความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองในส่วนที่ 2 มาใช้ทดลองในปลา *(in vivo)* และผลการทดสอบเวลาที่ใช้ในการจุ่ม จะนำมาใช้ในการทดลองในส่วนที่ 4 และส่วนที่ 5 ต่อไป

3.3.1 การเตรียมและปรับสภาพสัตว์ทดลอง

นำปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio*) ที่มีความยาวเฉลี่ย 12 เซนติเมตร หรือน้ำหนักประมาณ 30 กรัม คละเพศ จำนวน 1,000 ตัว ก่อนการทดลองนำปลามาพักปรับสภาพ และสังเกตอาการก่อนเป็นเวลา 14 วัน ในถังไฟเบอร์ขนาดความจุน้ำ 1 ตัน โดยในวันแรกจะนำปลามากักโรค และให้ formalin 25 พีพีเอ็ม ละลายในน้ำแช่ปลา (Carpenter *et al.*,2001) มีการสุ่มปลาจำนวน 10 ตัว เพื่อตรวจปรสิตภายนอก สัปดาห์ละครั้ง

ในระหว่างการพักปลาให้อาหารเม็ดลอยน้ำสำเร็จรูปสูตรปลาวัยอ่อน (บริษัท ลีพัฒนา) ร้อยละ 3 ของน้ำหนักตัวทุกวัน วันละ 2 มื้อ และให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอ ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 20% ทุก 2 วัน และตรวจคุณภาพน้ำทุก 7 วัน ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูปค่าความเป็นด่าง (alkalinity) พีเอช (pH) ความกระด้าง (hardness) แอมโมเนีย (ammonia) และเครื่องวัดออกซิเจนละลายในน้ำ (วีณา และมาลินี, 2547) ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลาคาร์พ (ดูในภาคผนวก จ)

3.3.2 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดใบฝรั่งในรูปแบบการกิน และการจุ่ม

3.3.2.1 ความเป็นพิษของสารสกัดโดยการให้กินอาหารผสมสารสกัด

- **การเตรียมอาหารผสมสารสกัดใบฝรั่ง**

นำอาหารเม็ดปลากินพืชวัยอ่อนสำเร็จรูปลอยน้ำ ของบริษัท ลีพัฒนา จำกัด จำนวน 4 ถุง มาผสมกับสารสกัดใบฝรั่งที่ 2, 3 และ 4 เท่าของ MIC ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากัน เมื่อสารสกัดซึมเข้าเนื้ออาหารแล้ว ทำการเคลือบด้วยน้ำมันตับปลาเล็กน้อย เพื่อกลบกลิ่นของสารสกัดใบฝรั่ง และเพิ่มความน่ากินของอาหารเม็ด ในกลุ่มควบคุมอาหารไม่ผสมสารสกัดใบฝรั่ง แต่เคลือบด้วยน้ำมันปลาเล็กน้อยเช่นกัน

- **การจัดแบ่งกลุ่มปลา**

สุ่มเลือกปลาคาร์พที่ปรับสภาพแล้ว จำนวน 40 ตัว มาเลี้ยงในตู้กระจกขนาดความจุน้ำ 50 ลิตร ใส่น้ำ 40 ลิตร ตู้ละ 5 ตัว จำนวน 8 ตู้ แบ่งเป็นตู้ที่ควบคุม ตู้ที่กินอาหารผสมกับสารสกัดใบฝรั่งที่ 2, 3 และ 4 เท่าของ MIC

- **วิธีการทดลอง**

ดัดแปลงจากวิธีของ Wangsomnuk *et al.* (1997) ทำการให้อาหารผสมที่เตรียมไว้ ในปริมาณร้อยละ 3 ของน้ำหนักตัวต่อวัน แบ่งให้ 2 มื้อ ต่อวัน เก็บอาหารออกหลังจากใส่ลงในน้ำ 15 นาที เพื่อป้องกันน้ำเสีย

บันทึกอาการ และจำนวนปลาคาร์พที่ตายในแต่ละวัน เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

3.3.2.2 ความเป็นพิษของสารสกัดโดยการจุ่มปลาในน้ำผสมสารสกัด

- **การเตรียมน้ำผสมสารสกัดใบฝรั่ง**

นำสต็อกสารละลายสารสกัดใบฝรั่งผสมน้ำเปล่า ให้ได้ความเข้มข้น 2 เท่าของ MIC (จากการทดลองในส่วนที่ 2) คือ ที่ 1600 พีพีเอ็ม (สารสกัด 6.4 กรัมมาผสมน้ำเลี้ยงปลา 4 ลิตร)

- **การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ**

ทำการวัดคุณภาพน้ำเปล่าก่อนผสมสารสกัดใบฝรั่ง และหลังผสมสารสกัดใบฝรั่ง ดังนี้ ค่าความเป็นด่าง (alkalinity) พีเอช (pH) ซัลไฟด์ (sulfide) ความกระด้าง (hardness) แอมโมเนีย (ammonia) ฟอสเฟส (phosphate) อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (D.O.) (วิธีการอ้างอิงจาก วีณา และมาลินี, 2547)

- **การทดลองจุ่มปลาที่ระยะเวลาต่าง ๆ**

ก. การทดลอง เบื้องต้น

สุ่มเลือกปลาคาร์พที่ปรับสภาพแล้ว จำนวน 35 ตัว มาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 50 ลิตร ใส่น้ำ 40 ลิตร ตู้ละ 5 ตัว จำนวน 7 ตู้ แต่ละตู้จุ่มลงในสารสกัดใบฝรั่งที่ความเข้มข้น 1600 พีพีเอ็ม ที่เวลา 0, 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 นาที เพื่อหาระยะเวลาในการจุ่มน้อยที่สุดที่ทำให้ปลา

คาร์พตายทั้งหมด และเวลามากที่สุดที่ไม่มีปลาคาร์พตาย ดัดแปลงจากวิธีของ Wangsomnuk *et al.* (1997)

เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ในแต่ละกลุ่ม นำปลากลับไปในตู้แล้วทำการสังเกตอาการหลังปล่อยเป็นเวลา 15 นาที บันทึกข้อมูล

โดยเวลาครึ่งหนึ่งของระยะเวลาที่มากที่สุดที่ไม่ทำให้ปลามีอาการผิดปกติ คือ ที่ 1 นาที (ปลาเริ่มมีอาการกระวนกระวาย หุบอากาศผิวน้ำที่ 2 นาที) จะนำมาใช้ในการทดลองส่วนที่ 4 และ 5 ต่อไป

ข. การทดลองอย่างละเอียด

ใช้ข้อมูลช่วงระยะเวลาในการจุ่มสารสกัดที่ทำให้ปลาคาร์พตายทั้งหมดและไม่ตายเลยจากการทดลองเบื้องต้น มาทำการทดลองต่อ โดยสุ่มเลือกปลามาจำนวน 180 ตัว แบ่งเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว แบ่งช่วงทุก 30 วินาที โดยจุ่มปลาที่เวลา 6, 6.5, 7, 7.5, 8 และ 8.5 นาที ทำ 3 ซ้ำ เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำปลากลับไปใส่ตู้แล้วสังเกตอาการเป็นเวลา 15 นาที บันทึกอาการและอัตราการตายในแต่ละกลุ่ม

สุ่มเก็บตัวอย่างปลาที่ตายจากการทดลองความเป็นพิษของสารสกัดใบฝรั่ง โดยการจุ่ม และปลาที่ไม่ได้รับสารสกัดเป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มละ 4 ตัว

ทำการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางมหภาคของตัวปลา คือ เหงือก ตา ผิวหนัง ตับ ไต หัวใจ และลำไส้ รวมทั้งเก็บตัวอย่างจากอวัยวะ คือ เหงือก ตับ ไต และหัวใจ มารักษาสภาพในสารละลาย Davidson's fixative เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำไปผ่านกระบวนการตัดเนื้อเยื่อ ย้อมด้วยสี Mayer's hematoxylin & eosin (H&E) บนแผ่นสไลด์ ตามวิธีของสุรพล คงทิม (2546) และตรวจวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสงสว่าง

<u>ส่วนที่ 4 การศึกษาผลของสารสกัดใบฝรั่งต่อปลาคาร์พที่ไม่ฉีดเชื้อ</u> *(in vivo)*

นำผลความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้จากการทดลองในส่วนที่ 2 คือ 1600 พีพีเอ็ม และระยะเวลาที่ได้จากส่วนที่ 3 มาใช้ในการทดลองในปลาคาร์พ เป็นเวลา 20 วัน โดยหาค่าทางชีวเคมีในโลหิต ค่าโลหิตวิทยา และค่าสภาพภูมิคุ้มกัน รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดตลอดการทดลอง จากการตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในเม็ดเลือดแดง และจุลพยาธิวิทยาของปลาที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่ง

3.4.1 การแบ่งกลุ่มปลา

สุ่มเลือกปลาคาร์พที่ปรับสภาพแล้ว จำนวน 180 ตัว แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว จำนวน 3 ซ้ำ ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 20 วัน

1) Oral C: ให้กินอาหารปกติ
2) Oral G: ให้กินอาหารคลุกสารสกัดใบฝรั่ง 5.3% (คำนวณดูภาคผนวก ค.)
3) Oral E: ให้กินอาหารคลุกยา enrofloxacin ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.017 (คำนวณดูภาคผนวก ง.)
4) Dip C: จุ่มปลาด้วยน้ำเลี้ยงปลาปกติ นาน 1 นาที ทุกวัน
5) Dip G: จุ่มปลาด้วยสารสกัดใบฝรั่ง 1600 พีพีเอ็ม นาน 1 นาที ทุกวัน
6) Dip E: จุ่มปลาด้วยน้ำผสมยา enrofloxacin ระดับความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม (Carpenter *et al.*, 2001) นาน 1 นาที ทุกวัน

3.4.2 การเตรียมสารสกัดใบฝรั่ง และยาปฏิชีวนะในอาหาร และน้ำจุ่มปลา

ก. สารสกัดใบฝรั่งผสมอาหาร (Oral route)

นำอาหารเม็ดสำเร็จรูปลอยน้ำ (อาหารปลากินพืชวัยอ่อน, บริษัท ลีพัฒนา จำกัด) จำนวน 1 กิโลกรัม มาผสมกับสารสกัดใบฝรั่ง 53 กรัม เขย่าให้เข้ากัน เมื่อสารสกัดซึมเข้าเนื้ออาหารแล้ว ทำการเคลือบด้วยน้ำมันตับปลาเล็กน้อย เพื่อลดการสูญเสียจากการละลายน้ำ และเพิ่มความน่ากินของอาหารเม็ด อาหารที่ผสมแล้วจะเก็บในถุงที่ปิดสนิทในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อาหารที่เลี้ยงปลาทุกกลุ่มเคลือบน้ำมันปลา

ข. สารสกัดใบฝรั่งผสมน้ำจุ่มปลา (Dip route)

เตรียมละลายสารสกัดใบฝรั่ง 6.4 กรัม ในน้ำเปล่าที่ใช้จุ่มปลา ปริมาตร 4 ลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำการจุ่มปลาเป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ นำปลากลับไปใส่ในตู้แล้วสังเกตอาการหลังปล่อยเป็นเวลา 10 นาที สารละลายที่ผสมแล้วจะใช้ทันที และผสมใหม่ในวันถัดไป

ค. ยาปฏิชีวนะEnrofloxacin ผสมอาหาร

โดยนำยาปฏิชีวนะที่ไวต่อเชื้อที่ได้จากการทดลองในส่วนที่ 2 คือ ยาปฏิชีวนะ enrofloxacin ชนิดน้ำ จำนวน 0.17 กรัม มาทำการผสมกับอาหารเม็ดสำเร็จรูปลอยน้ำ (บริษัทลีพัฒนา; ประเทศไทย) จำนวน 1 กิโลกรัม เขย่าให้เข้ากัน เมื่อสารสกัดซึมเข้าเนื้ออาหารแล้ว ทำการเคลือบด้วยน้ำมันตับปลา อาหารที่ผสมแล้วจะเก็บถุงที่ปิดสนิทในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

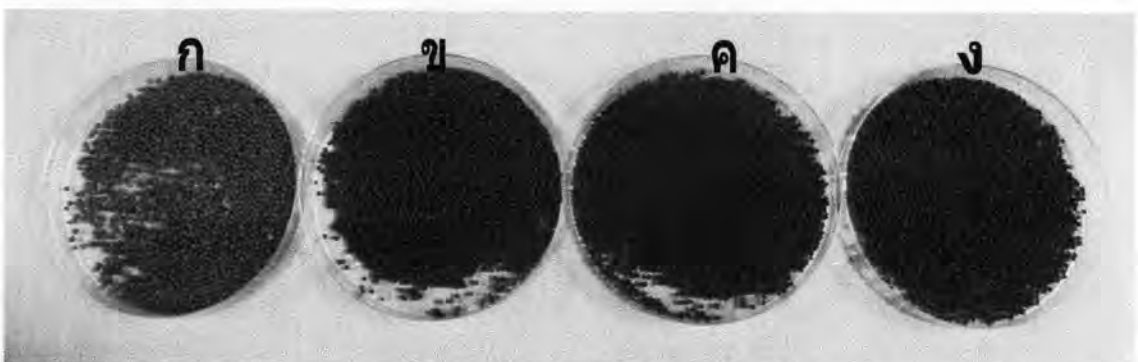
ง. ยาปฏิชีวนะ Enrofloxacin ผสมน้ำจุ่มปลา

เตรียมยาปฏิชีวนะ enrofloxacin ชนิดน้ำ 20 มิลลิกรัม ละลายในน้ำเปล่า ที่ใช้จุ่มปลา ปริมาตร 4 ลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำการจุ่มปลาตามขนาดและเวลาที่แนะนำของยาชนิดนั้น เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ นำปลากลับไปในตู้แล้วทำการสังเกตอาการหลังปล่อยเป็นเวลา 10 นาที สารละลายที่ผสมแล้วจะใช้ทันที และผสมใหม่ในวันถัดไป

จ. กลุ่มควบคุม

ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดใบฝรั่ง และยาปฏิชีวนะที่ไวต่อเชื้อโดยการผสมอาหารจะได้รับอาหารชนิดเดียวกัน ที่เคลือบด้วยน้ำมันปลา ทุกกลุ่มให้อาหารร้อยละ 3 ของน้ำหนักตัวต่อวัน แบ่งให้ 2 มื้อ เช้าและเย็น

ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดใบฝรั่ง และยาปฏิชีวนะที่ไวต่อเชื้อ จะทำการจุ่มลงในน้ำเปล่า (control) โดยการจุ่มปลาลงในน้ำเปล่าเป็นเวลาเท่ากับสารสกัดใบฝรั่ง



รูปที่ 3.1 ลักษณะทางกายภาพของอาหารเม็ดปกติก่อนนำมาใช้ (ก) อาหารกลุ่มควบคุมที่เคลือบน้ำมันตับปลาอย่างเดียว (ข) อาหารผสมสารสกัดใบฝรั่ง 5.3% (ค) และอาหารที่ผสมยาปฏิชีวนะ enrofloxacin 0.017% (ง)

3.4.3 การศึกษาผลของการให้สารสกัดใบฝรั่งต่อค่าทางชีวเคมีในโลหิต ค่าโลหิตวิทยา และสภาพภูมิคุ้มกัน

ศึกษาผลของสารสกัดใบฝรั่งต่อปลาคาร์พที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ หรือปลาปกติ มีจุดประสงค์เพื่อทำการวิเคราะห์ความเปลี่ยนแปลงทางทั้งทางกายภาพ ชีวเคมี และสรีวิทยาในปลา ซึ่งเกิดจากผลที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่ง และยาปฏิชีวนะเป็นเวลา 20 วัน เพื่อนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ร่วมกับการทดลองในส่วนที่ 5

การศึกษาค่าทางชีวเคมีในโลหิต โลหิตวิทยาและสภาพภูมิคุ้มกัน ในการทดลองส่วนที่ 4 จะทำการสุ่มเจาะเลือดปลาทั้ง 6 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว ในวันที่ 0 และ 20 จากเส้นเลือดดำด้วยเข็มเบอร์ 24G ตัวละ 0.5 ml แบ่งใส่ในหลอดเก็บเลือดขนาด 2 มิลลิลิตรที่มีเฮปารินเป็นสารกันเลือดแข็งตัว ทำการสเมียร์เลือดทันที กลุ่มละ 3 แผ่น เพื่อนำไปวัดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในเม็ดเลือดแดง ในขั้นตอนต่อไป (หัวข้อ 4.4) เลือดส่วนที่เหลือนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ โดยจะแบ่งเลือดในแต่ละกลุ่ม ออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนที่นำไปวัดค่าทางชีวเคมี นำไปวัดค่าทางโลหิตวิทยา และนำไปวัดค่าทางภูมิคุ้มกัน โดยมีรายละเอียดของการตรวจวัดเลือดทั้ง 3 ดังนี้

ก. **การวัดค่าทางชีวเคมีในโลหิต** (Blood biochemistry)

- Aspartate aminotransferase (AST) **หรือ** Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase (SGOT)
- Alanine aminotransferase (ALT) **หรือ** Serum Glutamic Pyruvate Transaminase (SGPT)
- ระดับน้ำตาลในเลือด (blood glucose)
- ค่าโปรตีนทั้งหมดในพลาสม่า (Total protein)

ค่าทางชีวเคมีในโลหิต 3 ค่าแรก ทำการตรวจโดยใช้เครื่อง spectrophotometer (Reflotron® Plus; Roche; Germany) ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป (Reflotron® tests; Roche; Germany) โดยการหยดพลาสม่าจำนวน 30 ไมโครลิตร หยดลงบนชุดตรวจสอบสำเร็จรูป แล้วนำมาอ่านผลด้วยเครื่องตรวจวัดค่าทางเคมีของเลือด แล้วบันทึกข้อมูล ส่วนค่าโปรตีนในพลาสม่าทำการตรวจ โดยการใช้พลาสม่าที่ได้หยดลงไปให้ทั่วบริเวณปริซึมของเครื่องมือ Total solid (TS) refractometer ทำการอ่านค่าที่ขีดดัชนีทางด้านขวามือ (Thrall *et al.*, 2004) แล้วบันทึกข้อมูล

ข. การวัดค่าทางโลหิตวิทยา (Thrall *et al.*, 2004)

- ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Pack cell volume; PCV) ด้วยวิธี microhematocrit method โดยการนำเลือดมาใส่ใน hematocrite tube และปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นก็นำมาวัดอ่านค่า PCV ด้วย microhematocrit reader อ่านค่าออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์
- การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด (TRBC count) โดยดูดเลือดให้ถึงขีด 0.5 ของ RBC pipette จากนั้นดูดน้ำยา Natt and Herrick solution ให้จนถึงขีด 101 เขย่าเบาๆนาน 1 นาที จะได้สารละลายเม็ดเลือด 1:200 จากนั้นนำไปหยดใน hemocytometer หรือ counting chamber โดยทิ้งไว้สักครู่ก่อน เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดอยู่นิ่ง การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงใช้กล้องจุลทรรศน์แบบแสงสว่างที่กำลังขยาย 40x โดยนับจากสี่เหลี่ยมจตุรัส 5 ช่อง (medium size square) ซึ่งเม็ดเลือดแดงจะไม่ติดสี นำจำนวนที่นับได้คูณด้วย 10,000 จะได้ค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงต่อ 1 ไมโครลิตร
- การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (TWBC count) ให้ใช้ RBC pipette และสาร Natt and Herrick solution เช่นเดียวกัน โดยเม็ดเลือดขาวจะติดสีน้ำเงินเข้ม หรือเห็นเป็นแกรนูลในไซโตพลาสซึม ทำการนับใน counting chamber ในสี่เหลี่ยมจตุรัสทั้ง 9 ช่อง แล้วคำนวณจำนวนเม็ดเลือดขาวจากสูตร TWBC/µl = (นับจำนวน WBCs ทั้งหมด 9 ช่อง + 10% ของจำนวนดิบของ WBCs นั้น) x 200
- ค่าฮีโมโกลบิน (Hemoglobin concentration; Hb) โดยการหยดพลาสม่าจำนวน 30 ไมโครลิตร หยดลงบนชุดตรวจสอบสำเร็จรูป Reflotron® tests; Roche; Germany) นำมาอ่านผลด้วยเครื่อง Reflotron® Plus (Roche; Germany) แล้วบันทึกข้อมูล

ค. การวัดค่าทางภูมิคุ้มกัน

ในการทดลองนี้ การวัดค่าทางภูมิคุ้มกัน จะแบ่งเป็น 2 วิธี คือ วิธีการวัด Phagocytic ability และ Chemotaxic activity โดยทั้งสองวิธีนี้จำเป็นต้องใช้เลือดที่ผ่านการแยก peripheral blood mononuclear leukocytes ก่อน เพื่อจะนำ peripheral blood mononuclear leukocytes ที่แยกได้ไปทำการศึกษาด้วยอุปกรณ์ และวิธีที่เฉพาะของการวัดค่าทางภูมิคุ้มกันของทั้งสองวิธีต่อไป

- **ขั้นตอนการแยก** peripheral blood mononuclear leukocytes

นำตัวอย่างเลือดที่เก็บไว้ด้วยสารกันแข็งตัวของเลือดชนิด heparin ดัดแปลงจาก Voigt (2000) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) ใส่เลือดจำนวน 0.25 มล. ในหลอดทดลองที่มี 0.9% สารละลายเกลือ จำนวน 2.25 มล.

2) ใส่สาร Ficoll-PaqueTM Plus จำนวน 2.5 มล. ในหลอดเซ็นทริฟิวซ์ขนาด 15 มล.

3) ค่อย ๆ หยดสารละลายในข้อ 1 ใส่ในหลอดเซ็นทริฟิวซ์ที่เตรียมไว้ในข้อ 2 โดยใช้ pasture pipette

4) นำหลอดเซ็นทริฟิวซ์จากข้อ 3 ปั่นด้วยเครื่อง High-speed refrigerated centrifuge (Kubota 7820) อุณหภูมิ 15°C ที่ความเร็ว 1,000xg, เป็นเวลา 30 นาที

5) ดูดส่วนที่เป็นสีขาวที่อยู่ตรงกลางหลอดเซ็นทริฟิวซ์คือ peripheral blood mononuclear leukocytes ออกมาใส่ใน micro tube

6) นำ micro tube ที่มี peripheral blood mononuclear leukocytes ไปใส่ในเครื่อง Spectrafuge (16 M รุ่น C0160-230) ปั่นที่ 1000xg เป็นเวลา 2-3 นาทีเพื่อให้ peripheral blood mononuclear leukocytes ตกตะกอน ดูดเอาส่วนใสออก

7) เติม 0.9% สารละลายเกลือ จำนวน 250 ไมโครลิตร ใส่ใน micro tube ทำให้ peripheral blood mononuclear leukocytes กระจายตัวโดยใช้ Autopipette ขนาด 200 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลง

8) เก็บ peripheral blood mononuclear leukocytes ไว้ใน micro tube เพื่อทำการศึกษาต่อไป

หมายเหตุ : ทุกขั้นตอนของการทดลองจะรักษาสภาพเซลล์ไว้บนน้ำแข็งเพื่อให้เซลล์คงสภาพและสมบูรณ์ และในขั้นตอนของการแยก peripheral blood mononuclear leukocytes ถ้าปั่นรอบแรกยังไม่สามารถแยกได้ก็ทำการดูดสารละลายที่อยู่ตรงกลางระหว่างรอยต่อเม็ดเลือดแดงและสารละลายไปใส่ในหลอด disposable centrifuge tubes ที่ใส่สาร Ficoll-PaqueTM Plus จำนวนอัตราส่วนเท่ากับสารละลาย แล้วทำการปั่นแยกอีกครั้ง

- **การศึกษา Phagocytic ability ในเลือด**

การวัดค่า Phagocytic ability ในเลือด หรือความสามารถในการกินเชื้อแบคทีเรียของแมคโครฟาจ โดยนำ peripheral blood mononuclear leukocytes ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้น มาทดสอบด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Mathews *et al.*, (1990) ดังนี้

1) เตรียมเชื้อ *E. coli* ใน TSB บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาตรวจดูความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อก่อนใช้ และทำการเจือจางเชื้อที่ 10 เท่า ของ 0.5 McFarland standards

2) ใช้ autopipette ขนาด 100 µl ดูด peripheral blood mononuclear leukocytes ที่เตรียมไว้ นำไปหยดลงบนกระจกสไลด์ ทิ้งไว้ใน Petri dish เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์ยึดติดสไลด์ จากนั้นหยด *E. coli* ที่เตรียมไว้ ผสมเบา ๆ ทิ้งไว้ 30 นาที กำจัดเซลล์ส่วนที่เกินที่ไม่เกาะติดสไลด์ออกโดยการล้างเบา ๆ ด้วยสารละลายเกลือ 0.9%

3) นำสไลด์จากข้อ 2 มาย้อมสี May-Grunwald stain โดยนำสไลด์มา fix ด้วย methanol 5 นาที จากนั้นนำสไลด์ไปใส่ใน May-Grunwald stain เป็นเวลา 7 นาที ล้างสีออกโดยใช้ PBS หลังจากนั้นนำสไลด์ไปใส่ใน Giemsa stain เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง (air dye)

4) นำสไลด์มาอ่านผลใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยนับจำนวนเซลล์ที่กินและไม่กินแบคทีเรียใน 1 หน่วยพื้นที่ และคำนวณ % phagocytosis ในแต่ละความเข้มข้น ตามสูตร

$$\% \text{ phagocytosis} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่กินแบคทีเรียใน 1 field} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดใน 1 field}}$$

- **การศึกษา Chemotaxic activity ในเลือด**

นำ peripheral blood mononuclear leukocytes ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้น มาทำการศึกษา Chemotaxic activity ในเลือด โดยดัดแปลงจากวิธีของ Weeks-Perkins และคณะ (1995) ดังนี้

1) เตรียมเชื้อ *E. coli* ใน TSB บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาตรวจดูความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อก่อนใช้ และทำการเจือจางเชื้อที่ 10 เท่า ของ 0.5 McFarland standards

2) เตรียม Boyden' double chamber ใน Petri dish เก็บความชื้น หยด *E. coli* ที่เตรียมไว้ลงใน Chamber ล่าง ปริมาตร 200 µl ปิดด้วย Polycarbonated membrane filter (Nucleopore) จากนั้นปิดด้วย Chamber ส่วนบนเติม Peripheral blood mononuclear leukocytes ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 200 µl ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที

3) เมื่อครบเวลาใช้ปากคีบจับส่วน membrane ออกวางบนสไลด์ ปล่อยให้แห้ง

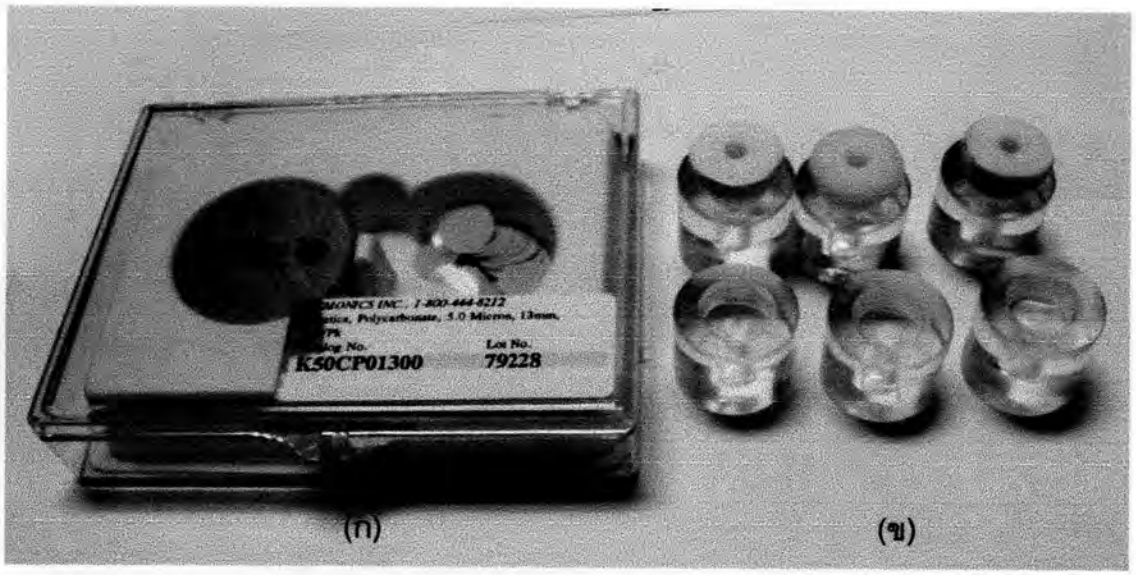
4) นำแผ่น membrane ไปย้อมสี Wright-Giemsa's stain โดยหยด Wright-Giemsa ให้ท่วมสไลด์ ทิ้งไว้ประมาณ 3 นาทีระยะนี้เป็นระยะ Fix-stain

5) หยด Buffer Wright ลงบนสไลด์ ปริมาณเท่าสีให้พอดีเป่าเบา ๆ ผสมให้เข้ากับสี ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ระยะนี้เป็นระยะปรับสี

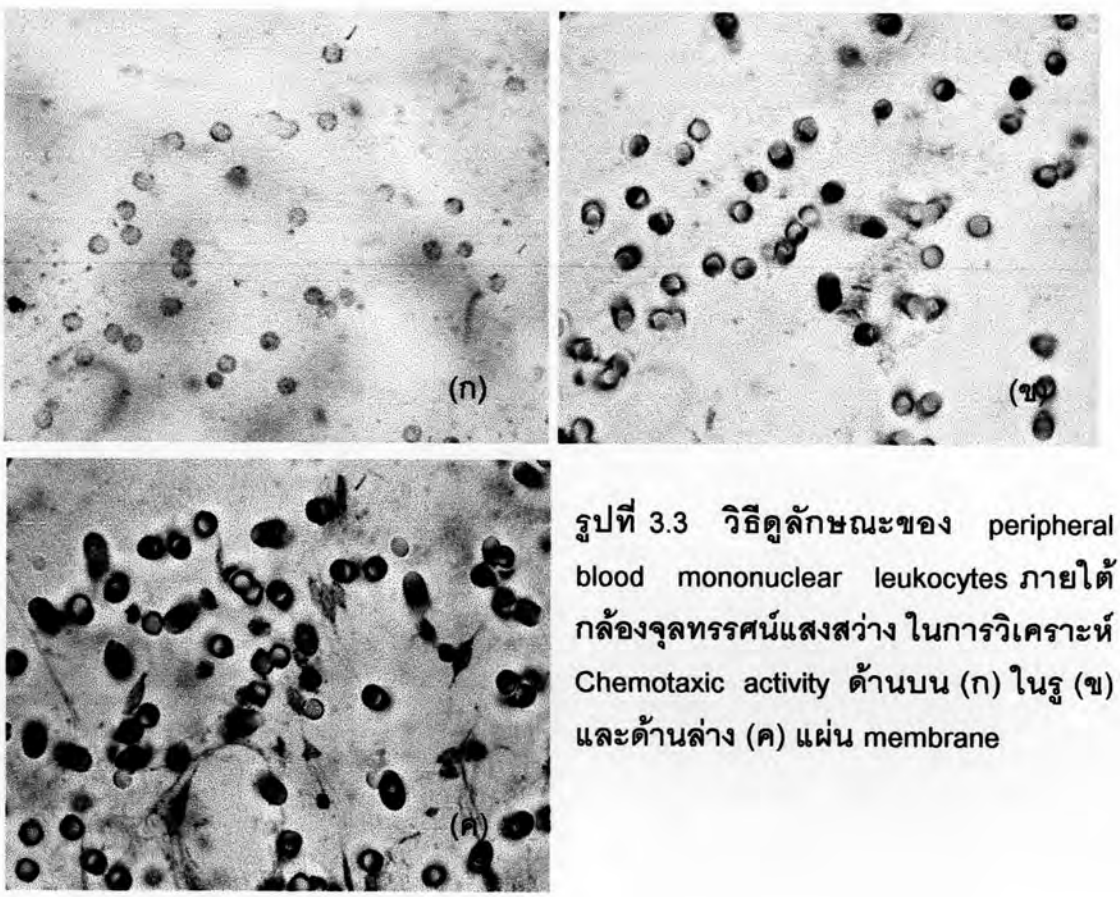
6) ล้างสไลด์ด้วยน้ำสะอาด แล้วทำให้แห้ง

7) นำสไลด์มาอ่านผลใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยนับจำนวนเซลล์ที่อยู่ด้านบน (รูปที่ 3.4 ก.) เซลล์ที่ในรู (รูปที่ 3.4 ข.) และเซลล์ที่อยู่ด้านล่าง (รูปที่ 3.4 ค.) ของ membrane ใน 1 หน่วยพื้นที่ คำนวณ % Chemotoxis ในแต่ละความเข้มข้น

$$\% \text{ Chemotaxis} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่อยู่ในรูและด้านล่าง 1 field} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดใน 1 field}}$$



รูปที่ 3.2 ชุดอุปกรณ์การตรวจ Chemotaxic activity ในเลือด ประกอบด้วยแผ่น Polycarbonated membrane filter (ก) และ Boyden' double chamber (ข)



รูปที่ 3.3 วิธีดูลักษณะของ peripheral blood mononuclear leukocytes ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ในการวิเคราะห์ Chemotaxic activity ด้านบน (ก) ในรู (ข) และด้านล่าง (ค) แผ่น membrane

3.4.4 การศึกษาจุลพยาธิวิทยาที่เปลี่ยนแปลงของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่ง

เมื่อวันสิ้นสุดการทดลองในส่วนที่ 4 (วันที่ 20 ของการทดลอง) นำปลาคาร์พในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่งคือ Oral G และกลุ่ม Dip G และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใด คือ Oral C และ Dip C กลุ่มละ 3 ตัว ทำให้ตายด้วยความเย็น แล้วเก็บตัวอย่างอวัยวะ ได้แก่ เหงือก ลูกตา ผิวหนัง ตับ ไต หัวใจ และลำไส้เล็กตอนต้น มารักษาสภาพในสารละลาย Davidson's fixative เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำไปผ่านกระบวนการตัดเนื้อเยื่อ ย้อมด้วยสี Mayer's hematoxylin & eosin (H&E) บนแผ่นสไลด์ ตามวิธีของ สุรพล คงทิม (2546) และตรวจวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสงสว่าง

3.4.5 การศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (genotoxicity) ในเม็ดเลือดแดง

ทำการป้ายแผ่นเลือดบาง (Thin blood smear) ปลาจากกลุ่มที่ให้สารสกัดใบฝรั่งแบบกิน (Oral G) และแบบจุ่ม (Oral D) ในวันที่ 0 และวันที่ 20 ลงในแผ่นสไลด์ที่สะอาด กลุ่มละ 3 แผ่น ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วทำการย้อมด้วยสี May-Grunwald และ สี Giemsa ตามวิธีของ Gursatej and Pankaj (2002)

นำสไลด์ที่ผ่านขบวนการข้างต้น หาการแตกหักของโครโมโซม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง โดยทำการนับ micronucleus (MN) หรือลักษณะของจุดกลม-รี ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดง โดยมีสีเหมือน และมีขนาด 1/5-1/20 ของนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง โดยไม่มีจุดเชื่อมติดกันระหว่างนิวเคลียส และ MN ในเม็ดเลือดแดงจำนวน 1,000 เซลล์ (Bahari *et al.*, 1994)

กลุ่มควบคุมของการศึกษาพิษต่อโครโมโซม (Positive control) ใช้ปลาคาร์พที่ทำการฉีดสารไมโตไมซิน-ซี (mitomycin-C; Kyowa, Japan) ในขนาด 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม /น้ำหนักตัว เข้าช่องท้อง ซึ่งสามารถทำให้เกิด MN ในปลา ภายใน 24 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญ (Bahari *et al.*, 1994) จำนวน 3 ตัว ซึ่งจะทำการเจาะเลือด หลังจากการฉีดสาร mitomycin-C เป็นเวลา 1 วัน ทำการเจาะเลือดปลาทั้ง 3 ตัว เสมียร์เลือดตัวละ 3 แผ่น และทำตามขั้นตอนต่างๆ เช่นเดียวกับกลุ่มได้รับสารสกัด บันทึกผล เพื่อนำมาเปรียบเทียบผลความเป็นพิษของการได้รับสารสกัดใบฝรั่ง 20 วัน

ส่วนที่ 5 การศึกษาผลของสารสกัดใบฝรั่งต่อปลาคาร์พที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

ทดสอบผลของสารสกัดใบฝรั่ง โดยการกิน และการจุ่ม ต่อการต้านเชื้อ *A. hydrophila* ที่ฉีดเข้าช่องท้องในปลาคาร์พ และบันทึกผลการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย จากการทดลองสองส่วน คือ

ก.) การทดสอบเพื่อตรวจวัดค่าทางชีวเคมี ค่าทางโลหิตวิทยา และค่าสภาพภูมิคุ้มกัน ในวันที่ 0, 3, 10 และ 20 ซึ่งค่าทางโลหิตสามารถใช้ติดตามความเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาที่เกิดจากการติดเชื้อ *A. hydrophila* (Harikrishnan *et al.*, 2003) โดยปลาคาร์พในส่วนนี้ ทำการฉีดเชื้อ A. hydrophila ที่ความเข้มข้น 1.0×10^5 cfu/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว เพื่อลดอัตราการตายของปลาในกลุ่มทดลองจากความเข้มข้นที่ทำให้ปลาตายร้อยละ 50 (การเตรียมเชื้อ ดูตารางที่ 4 ภาคผนวก ฉ.) ทำให้สามารถทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงค่าทางชีวเคมี ค่าทางโลหิตวิทยา และสภาพภูมิคุ้มกันของปลา จนสิ้นสุดการทดลองได้

ข.) การทดสอบเพื่อวิเคราะห์ร้อยละอัตราการตาย และร้อยละความสัมพันธ์ในการรอดตาย (Relative Percent Survival, RPS) ของปลาคาร์พ โดยทำการฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ที่ความเข้มข้น 0.5×10^6 cfu/ml ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้ปลาตายร้อยละ 50 (การเตรียมเชื้อ ดูตารางที่ 4 ภาคผนวก ฉ.)

3.5.1 การแบ่งกลุ่มปลา

ทำการสุ่มเลือกปลาคาร์พที่ปรับสภาพแล้ว จำนวน 180 ตัว แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว จำนวน 3 ซ้ำ (2 ชุด คือ กลุ่ม ก. และ ข. ดังนั้นในส่วนที่ 5 ใช้ปลาคาร์พทั้งหมด 360 ตัว) ใช้ในการทดลองเป็นระยะเวลา 20 วัน

1) +Oral C: ให้กินอาหารปกติ
2) +Oral G: ให้กินอาหารคลุกสารสกัดใบฝรั่ง 5.3% (คำนวณดูภาคผนวก ง.)
3) +Oral E: ให้กินอาหารคลุกยา enrofloxacin ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.017 (คำนวณดูภาคผนวก ง.)
4) +Dip C: จุ่มปลาด้วยน้ำเลี้ยงปลาปกติ นาน 1 นาที ทุกวัน
5) +Dip G: จุ่มปลาด้วยสารสกัดใบฝรั่ง 1600 พีพีเอ็ม นาน 1 นาที ทุกวัน

6) +Dip E: จุ่มปลาด้วยน้ำผสมยา enrofloxacin ระดับความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม (Carpenter *et al.*, 2001) นาน 1 นาที ทุกวัน

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ + หมายถึงปลาคาร์พที่ได้รับการฉีดเชื้อ A. hydrophila เพื่อแสดงความแตกต่างจากกลุ่มการศึกษาส่วนที่ 4

3.5.2 การเตรียมสารสกัดใบฝรั่ง และยาปฏิชีวนะในอาหาร และน้ำจุ่มปลา

ทำเช่นเดียวกับในข้อ 4.2

3.5.3 การศึกษาผลของการให้สารสกัดใบฝรั่งต่อค่าทางชีวเคมีในโลหิต ค่าโลหิตวิทยา และสภาพภูมิคุ้มกัน

ปลาคาร์พส่วน (ก) ทำการเจาะเลือดในวันที่ 0, 3, 10 และ 20 และตรวจค่าต่างๆ เช่นเดียวกับในข้อ 4.3

3.5.4 การหาร้อยละอัตราการตาย และร้อยละความสัมพันธ์ในการรอดตายของปลาที่ติดเชื้อ (Relative Percent Survival, RPS) (Baulay *et al.*,1996)

ปลาคาร์พส่วน (ข) บันทึกการตายสะสมจนถึงวันที่ 20 หลังฉีดเชื้อในทุกกลุ่มการทดลอง และนำมาคำนวณร้อยละอัตราการตาย และความสัมพันธ์ในการรอดตายดังสูตร

$$\text{อัตราการตาย (\%)} = \frac{\text{จำนวนปลาที่ตายในแต่ละกลุ่ม x 100}}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}}$$

$$\text{RPS (\%)} = \text{อัตราการตายของกลุ่มที่} \frac{\text{(ไม่ได้รับสาร – ได้รับสาร) ในแต่ละกลุ่ม x100}}{\text{กลุ่มที่ไม่ได้รับสาร}}$$

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนโดยใช้วิธี T-test และ Analysis of Variance Analysis (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95