บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง สถานที่วิจัย และระบบการเลี้ยง

ทำการเก็บเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 (รูปที่ 3-1) ธรรมชาติจากบริเวณท่าเทียบเรือสถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน จังหวัดภูเก็ต (สวพ ภูเก็ต) มาเลี้ยงภายในถังเลี้ยงทรงกลมขนาด 500 ลิตร ในโรงเพาะเลี้ยงสถานีวิจัยสัตว์ทะเล อ่างศิลา จังหวัดชลบุรี โดยใช้ระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิด (รูปที่ 3-2)

ที่มา: Chavanich *et al.* (2005)

รูปที่ 3-1. เพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891

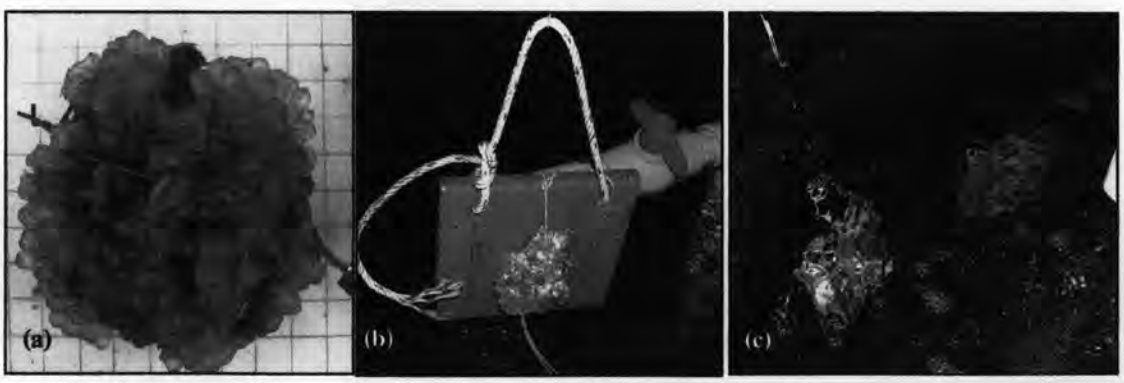
รูปที่ 3-2. โรงเพาะเลี้ยง สถานีวิจัยสัตว์ทะเล อ่างศิลา จังหวัดชลบุรี

3.2 ขั้นตอนการวิจัย รวบรวม และวิเคราะห์ข้อมูล

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ศึกษาผลของแสงต่อการเติบโต ศึกษาผลของความเค็มต่อการเติบโต และศึกษาผลของแสงและความเค็มที่มีต่อการผลิตสาร Ecteinascidins (ET) โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.2.1 ผลของแสงต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni*

ทำการเก็บเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีโดยเฉลี่ยประมาณ 7 เซนติเมตร จำนวน 25 โคโลนี นับจำนวนตัวของเพรียงหัวหอม (ซูออยด์) พร้อมบันทึกถ่ายภาพโคโลนีเริ่มต้นบนกรอบสี่เหลี่ยมขนาด 10 x 10 ตารางเซนติเมตร (รูปที่ 3-3a) ยึดโคโลนีเพรียงหัวหอมติดกับแผ่นกระเบื้องดินเผาทรงสี่เหลี่ยมขนาด 15 x 15 ตารางเซนติเมตร (รูปที่ 3-3b) นำไปแขวนในถังเลี้ยงที่บรรจุน้ำทะเล 500 ลิตร ควบคุมระดับความเค็มที่ 32 พีเอสยู ตามระดับความเค็มของน้ำทะเลที่เก็บตัวอย่าง (รูปที่ 3-3c) กำหนดชุดการทดลองตามระดับความเข้มแสงที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 0, 2, 4, 6 และ 8 $\mu w/cm^2$ หรือคิดเป็น 0, 25, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ของระดับความเข้มแสงในโรงเพาะเลี้ยงตามลำดับ (ความเข้มแสงที่ 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นชุดควบคุม) โดยกำหนดช่วงเวลาการให้แสง 12 ชั่วโมง และไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง ทุกวัน ทั้งนี้ แต่ละชุดการทดลองมีเพรียงหัวหอมจำนวน 5 โคโลนี ให้แพลงก์ตอนพืช *Chaetoceros* sp. เป็นอาหารวันละ 1 ครั้ง ที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นมีค่า 3 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นปริมาณ 1.5 ลิตรต่อถัง การให้ *Chaetoceros* sp. เป็นอาหารเนื่องจากในการศึกษาเบื้องต้นเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ที่ได้รับแพลงก์ตอนดังกล่าวเป็นอาหารมีการเติบโตดี ระยะเวลาในการเลี้ยง 2 รอบวงชีวิต โดยทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำพร้อมทำความสะอาดตะกอนภายในถังเลี้ยงสัปดาห์ละ 1 ครั้ง และบันทึกข้อมูลการเติบโตสัปดาห์ละ 2 ครั้ง



รูปที่ 3-3. ลักษณะการเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในถังเลี้ยง

(a) การบันทึกพื้นที่ปกคลุมของโคโลนีบนกรอบสี่เหลี่ยมขนาด 10 x 10 ตารางเซนติเมตร

(b) โคโลนีที่นำมายึดติดกับแผ่นกระเบื้องขนาด 15 x 15 ตารางเซนติเมตร

(c) การแขวนโคโลนีที่ยึดติดกับแผ่นกระเบื้องในถังเลี้ยง

ทั้งนี้ ข้อมูลการเติบโตที่ทำการบันทึก มีดังนี้

1) บันทึกความยาวของเพรียงหัวหอมแต่ละโคโลนีโดยการสุ่มวัดขนาดความยาวของซูออยด์เพรียงหัวหอม เป็นจำนวนไม่ต่ำกว่า 10% ของโคโลนีนั้นๆ
2) นับจำนวนซูออยด์เพรียงหัวหอมในแต่ละโคโลนี
3) พื้นที่ปกคลุมพื้นผิว ซึ่งหมายถึง เปอร์เซ็นต์การปกคลุมพื้นผิวของเพรียงหัวหอม ทำการคำนวณพื้นที่โดยบันทึกภาพเพรียงหัวหอมในกรอบสี่เหลี่ยมขนาด 10 x 10 ตารางเซนติเมตร และนำภาพดังกล่าวไปวิเคราะห์โดยคำนวณพื้นที่ปกคลุมด้วยโปรแกรม ENVI

3.2.2 ผลของความเค็มต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni*

ทำการศึกษาด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 2.1 โดยเปลี่ยนปัจจัยจากแสงเป็นความเค็ม โดยเลี้ยงเพรียงหัวหอมในระดับความเค็มที่แตกต่างกัน 5 ระดับที่ 26, 29, 32, 35 และ 38 พีเอสยู ตามลำดับ โดยระดับความเค็มที่ 32 พีเอสยู เป็นระดับความเค็มปกติในธรรมชาติ ให้ความเข้มแสงตามธรรมชาติ

3.2.3 ผลของแสงและความเค็มต่อการผลิตสาร Ecteinascidins ของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni*

เก็บตัวอย่างทั้งหมดของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากที่ทำการเลี้ยงเมื่อครบ 2 รอบวงชีวิตมาทำการสกัดหาปริมาณสาร Ecteinascidins (ET) เพื่อเปรียบเทียบผลของปัจจัยแสงและความเค็มที่มีต่อการผลิตสารดังกล่าว แบ่งขั้นตอนการศึกษาออกเป็นการสกัดแยกสาร ET 770 และการวิเคราะห์ปริมาณสาร ET 770 ตามรูปที่ 3.4 ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ นภรรณพ บุญถนอม และปิติ จันทรวรชิต (2544); Charupant (2000); Suwanborirux *et al.* (2002) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1) <u>วิธีการสกัดสาร ET 770 จากเพรียงหัวหอม *E. thurstoni*</u>

(1.1) นำตัวอย่างเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ใส่ในขวดแก้วขนาดเล็ก
(1.2) นำมาบดให้ละเอียดภายหลังผ่านกระบวนการทำให้แห้งด้วยอุณหภูมิต่ำ (Freeze drier)
(1.3) เติมสารละลาย 10 mM KCN ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
(1.4) sonicate เป็นเวลา 5 นาที
(1.5) ทำการเขย่าให้สารละลายกับตัวอย่างที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
(1.6) หมักด้วยเมธานอล 6 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าต่ออีก 2 ชั่วโมง
(1.7) นำตัวอย่างที่ได้นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
(1.8) ดูดสิ่งที่สกัดได้จากชั้นเมธานอล 4 มิลลิลิตร นำมาเติมเอทิลอะซิเตท (EtOAc) 3 มิลลิลิตร และ brine (สารละลายอิ่มตัวของ NaCl) 11 มิลลิลิตร

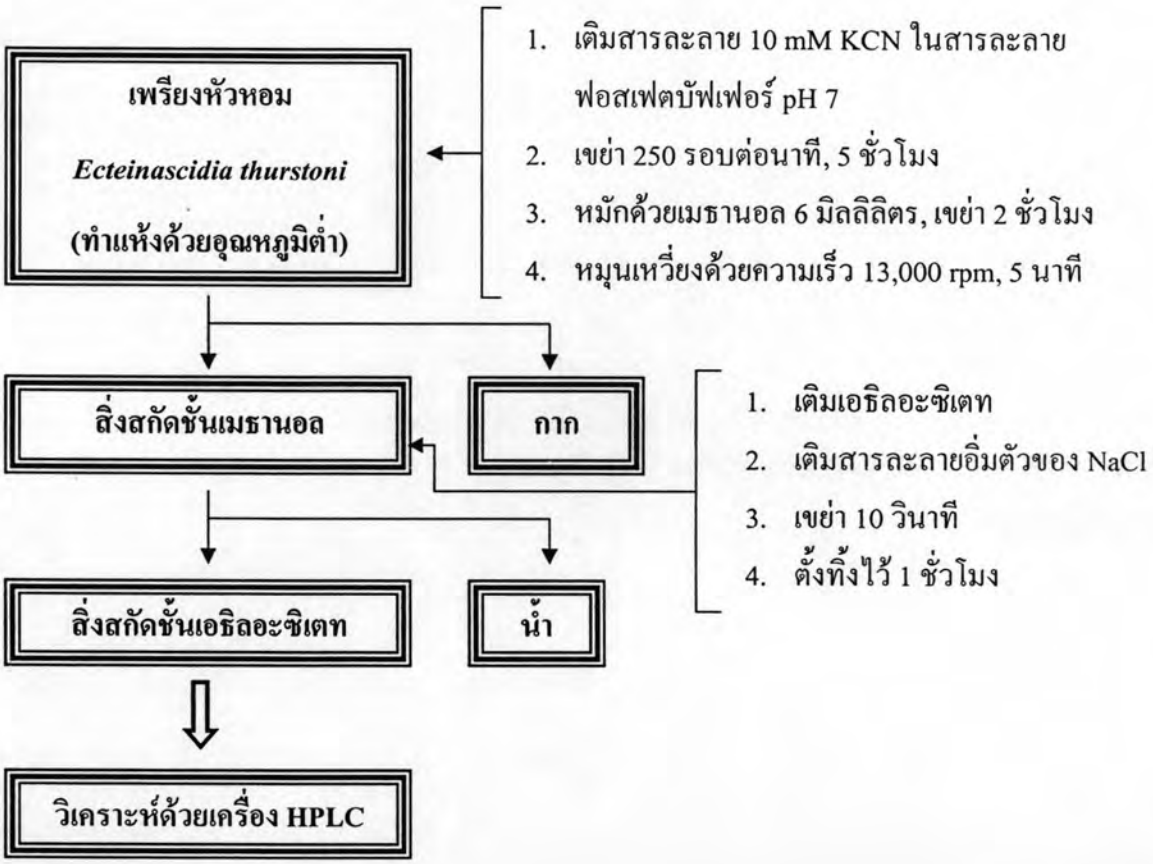
(1.9) นำไปเขย่า 10 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างเอทิลอะซิเตทกับน้ำ

(1.10) ทำการดูดสิ่งที่สกัดได้จากชั้นเอทิลอะซิเตทอีก 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วขนาดเล็ก

(1.11) เติม anhydrous Na_2SO_4 40 มิลลิกรัม เพื่อกำจัดน้ำที่อาจปนค้างอยู่ในสารสกัดดังกล่าว

(1.12) ดูดสิ่งที่สกัดได้จากชั้นเอทิลอะซิเตทที่กำจัดน้ำแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ใน eppendorf

(1.13) นำสารสกัดที่ได้ไปเป่าให้แห้งโดยการใช้ N_2 ได้สาร dried crude EtOAC extract



รูปที่ 3-4. การสกัดแยกสาร Ecteinascidins จากเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* (ดัดแปลงจากวิธีการของ นภรรณพ บุญถนอม และ ปิติ จันทรวรชิต (2544); Charupant (2000); Suwanborirux *et al.* (2002))

2) การวิเคราะห์ปริมาณสาร ET 770

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสาร ET 770 โดยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งประกอบด้วยการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยสารละลายมาตรฐาน ET 770 พร้อมทั้ง วิเคราะห์ปริมาณของสาร ET 770 ที่ได้จากเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* โดยกำหนดสภาวะเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Suwanborirux *et al.* (2002) โดยมีรายละเอียดตามตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1. สภาวะของเครื่อง High Performance Liquid Chromatography ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร Ecteinascidins จากเพรียงหัวหอม *E. thurstoni*

หัวข้อ	รายละเอียด	หมายเหตุ
Column	Hewlett Packard ODS Hypersil 5 µm, 125 x 4 mm	
Solvent system	Methanol : Phosphate buffer	อัตราส่วน 60:40
Injection volume	100 µl	
Flow rate	1 ml/min	
Diode array UV detector	ความยาวคลื่น 286 nm	

3.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดย One Way ANOVA Tukey-Pairwise Mean Comparison เพื่อเปรียบเทียบ ผลของแสงและความเค็มต่อการเติบโตและการผลิตสาร Ecteinascidins ของเพรียงหัวหอม รวมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความยาวซูออยด์ จำนวนซูออยด์ และพื้นที่ปกคลุมโคโลนีของเพรียงหัวหอมโดย Independent Samples T-Test และวิเคราะห์ความแตกต่างของความยาวซูออยด์ จำนวนซูออยด์ และพื้นที่ปกคลุมโคโลนีของเพรียงหัวหอม ในแต่ละวงชีวิตโดย Chi-Square Test