

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. ปลาหางนกยูงเพศผู้ จำนวน 500 ตัว
2. ตู้กระจก พร้อมอุปกรณ์ให้อากาศครบชุด
3. ถังน้ำพลาสติกขนาด 500 ลิตร
4. อาหารปลาสำเร็จรูป
5. เครื่องซังไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง
6. อุปกรณ์วัดขนาด (เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์)
7. เครื่องวัดอุณหภูมิ และวัดความเป็นกรดต่าง
8. ชุดทดสอบแอมโมเนีย (Ammonium test kits)
9. ชุดทดสอบไนไตรท์ (Nitrite test kits)
10. อุปกรณ์สำหรับเก็บอาหารแต่ละชุดการทดลอง
11. อุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็นสำหรับการทดลอง เช่น ผักกรอง สวิง สายยาง เป็นต้น

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมน้ำ

ทำความสะอาดถังพลาสติก 500 ลิตร ตากถังให้แห้งประมาณ 3 วัน เติมน้ำที่ระดับความสูงประมาณ 80 - 85 เซนติเมตร เมื่อนำน้ำไปใช้ในการทดลองระดับน้ำจะลดลง ก็เติมน้ำให้ได้ระดับความสูงเท่าเดิมและให้อากาศผ่านหัวทรายตลอดการทดลอง

2. การสกัดสารจากพรมมิไม่น้ำพรมมิ

สกัดสารจากพรมมิตามวิธีการของ Jyoti and Sharma (2006 : หน้า 451-457) โดยนำต้นพรมมิใช้เฉพาะส่วนที่เป็นใบและลำต้นเหนือดินขึ้นมาประมาณ 1 - 2 เซนติเมตร ล้างทำความสะอาด หั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำมาบดให้ละเอียดให้ได้พรมมิ 5 กิโลกรัม น้ำหนักแห้ง แล้วสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 30 ลิตร แช่ไว้เป็นเวลา 3 วัน ในตู้บ่มอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง CF/C ขนาด 0.2 ไมครอน นำสารสกัดที่กรองได้ไประเหยเอทานอลจนเหลือแต่สารสกัด แล้วจึงชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้นำไปทำ Stock solution โดยเจือจางด้วยเอทานอลเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน 1: 10 เก็บรักษา Stock solution ใน incubator ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมอาหารและการให้อาหาร

เตรียมสารสกัดพรมมิจาก Stock solution ให้มีความเข้มข้น 0, 250, 500, 750 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ผิดพันสารสกัดจากพรมมิลงบนอาหารสำเร็จรูปที่เตรียมไว้ แล้วรอให้แห้ง จากนั้นฉีดพ่น Amino acid สังเคราะห์เคลือบลงบนอาหารที่เตรียมไว้ เพื่อดึงดูดให้ปลาหางนกยูงกินอาหาร แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำอาหารทดลองไปให้ปลากิน ปริมาณ 5 % ต่อน้ำหนักตัว วันละ 2 ครั้ง เลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 เดือน ส่วนปลาหางนกยูงที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมให้กินอาหารสำเร็จรูปที่ไม่ได้เคลือบด้วยสารสกัดดังกล่าว

4. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design : CRD) โดยแบ่งเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ใช้ปลาหางนกยูงทดลองซ้ำละ 20 ตัว ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 กลุ่มควบคุม อาหารไม่เคลือบสารสกัดพรมมิ

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารเคลือบสารสกัดพรมมิความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารเคลือบสารสกัดพรมมิความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารเคลือบสารสกัดพรมมิความเข้มข้น 750 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

ชุดการทดลองที่ 5 อาหารเคลือบสารสกัดพรมมิความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

5. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดพรมมิในการต้านเชื้อ

นำเชื้อ *Aeromonas* sp. และ *Streptococcus* sp. ที่ได้ทำการแยกออกมาจากปลาที่ตายใหม่ๆ จากฟาร์ม (โดยประสานผ่านทางกรมประมง และยืนยันว่าชนิดเชื้อดังกล่าวเรียบร้อยแล้ว) นำเชื้อดังกล่าวที่แยกได้เติมลงในน้ำทุกตู้ทดลองในปริมาณ 10^5 CFU/mg ทดสอบกับปลาหางนกยูงที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปพ่นด้วยสารสกัดพรมมิ 1 เดือน บันทึกอัตราการรอดชีวิตของหลังจากได้รับเชื้อ ที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบยืนยันสาเหตุการตายด้วยการเขี่ยเชื้อจากปลาหางนกยูงที่ตายได้ไม่นาน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulphate Citratebile Salt (TCBS) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 16 - 18 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

การเก็บบันทึกข้อมูล

1. น้ำหนักเฉลี่ย

ชั่งน้ำหนักปลาในทุกชุดการทดลอง ระหว่างการเลี้ยงจะกระทำทุก ๆ 1 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลทั้งหมดจนครบ 4 สัปดาห์

2. ความยาวเฉลี่ย

วัดขนาดปลาในทุกชุดการทดลอง ระหว่างการเลี้ยงจะกระทำทุก ๆ 1 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลทั้งหมดจนครบ 4 สัปดาห์

3. การประเมินการเจริญเติบโต

การวัดขนาด และ ชั่งน้ำหนัก ระหว่างการเลี้ยงจะกระทำทุก ๆ 1 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง แล้วนำข้อมูลที่ได้จากการตรวจวัดขนาด ชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตดังนี้

$$\text{อัตราการเจริญเติบโต} = \frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม/ตัว)} - \text{น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม/ตัว)}}{\text{จำนวนวันที่ทำการทดลอง}}$$

4. อัตราการรอดตาย

บันทึกจำนวนปลาที่ตายทุกๆ สัปดาห์ เพื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์อัตราการรอดตาย ดังนี้

$$\text{อัตราการรอดตาย (\%)} = \frac{\text{จำนวนปลาที่เหลือเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาที่เริ่มทำการทดลอง}} \times 100$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย (Analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองตามวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยการใช้โปรแกรมวิเคราะห์สถิติสำเร็จรูป