บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 สัตว์ทดลอง คือ กุ้งแคระ (Red cherry Shrimp) ขนาด 0.5 เซนติเมตร จากฟาร์มจังหวัดนครราชสีมา

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำอาหาร ได้แก่ สารคาโรทีนอยด์จากกลีบดอกดาวเรือง สารคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ อาหารกุ้งขาววานาไม เบอร์ 0 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง เครื่องอบผลไม้แห้ง เครื่องปั่นอาหาร น้ำมันปลา ถุงพลาสติก กล่องพลาสติก บีกเกอร์ กระบอกตวง แท่งแก้วคนสาร ช้อนตักสาร กรรไกร ถุงมือยาง และกระบอกฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งแคระ ได้แก่ กล่องพลาสติก ฮีตเตอร์ ฝาปิดกล่อง ปั๊มลม สายลม หัวทราย สายยางถ่ายน้ำ สวิง เกลือแกง และด่างทับทิม

3.1.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการหาปริมาณแคโรทีนอยด์ในกลีบดอกดาวเรือง คาโรทีนอยด์สังเคราะห์ และปริมาณแคโรทีนอยด์ในตัวกุ้งแคระ ได้แก่ ขวดรูปชมพู กระบอกตวง บีกเกอร์ ขวดปรับปริมาตร กรวย แก้ว กระดาษกรอง ฟลอยด์ แท่งแก้ว อะซิโตน ปิโตเลียมอีเทอร์ น้ำกลั่น บีเอสทีและเครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสง (Uv-visspectophotometer รุ่น v-160)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การทดลองที่ 1 ปริมาณแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่เหมาะสมต่อการพัฒนาสีของกุ้งแคระสวยงาม

3.2.1.1แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) กำหนดปริมาณแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองที่ใช้ผสมในอาหารกุ้งที่ต่างกัน ได้แก่ 0, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กก. (มก./กก.) แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ ระยะเวลาในการเลี้ยง 8 สัปดาห์ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารควบคุม (อาหารกุ้งไม่ผสมแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรือง)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรือง มก./กก.

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรือง 100 มก./กก.

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรือง 200 มก./กก.

3.2.1.2 วิธีการทดลอง

(1) การเตรียมสารแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรือง

(1.1) การเตรียมกลีบดอกดาวเรืองเพื่อนำมาอบแห้ง คัดเลือกดอกดาวเรืองที่มีเหลืองเข้มสดคุณภาพดีนำมาล้างทำความสะอาด จากนั้นตัดก้านดอกและฐานดอกออกให้เหลือเพียงกลีบดอกดาวเรืองสีเหลืองสด แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเมื่ออบจนแห้ง นำมาบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่นอาหาร จากนั้นนำผงดอกดาวเรืองที่ได้ใส่ขวดมีฝาปิดใส่ซองกันชื้นแล้วห่อด้วยอะลูมิเนียมฟลอยแล้วเก็บเข้าตู้เย็น

(1.2) การหาปริมาณแคโรทีนอยด์โดยชั่งดอกดาวเรืองแห้ง 0.1 กรัม ละลายด้วยสารผสมของ อะซีโตน ปิโตรเลียมอีเทอร์ น้ำกลั่น และบีเอชที ด้วยอัตราส่วน 75:25:10:0.01 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง

เบอร์ 0 และนำมาวัดด้วยค่าดูดกลืนแสงที่ 473 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาปริมาณสารแคโรทีนอยด์รวมดังสมการ

$$\text{แคโรทีนอยด์} = \frac{A \times B \times 10}{1910 \times C}$$

A = ค่าดูดกลืนแสงที่ 473 นาโนเมตร
B = ปริมาตรสารละลาย
C = น้ำหนักตัวอย่าง

(2) การเตรียมอาหารผสมแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรือง

ชั่งอาหารกุ้งขาววานาไมเบอร์ 0 ตามสัดส่วนที่ต้องการ จากนั้นคำนวณปริมาณสารแคโรทีนอยด์ในระดับความเข้มข้นที่ต้องการ และเหมาะสมกับปริมาณของอาหารกุ้งขาววานาไมที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำมันปลา 1 มิลลิลิตรต่ออาหาร 100 กรัมและเติมน้ำ 5 มิลลิลิตร ต่ออาหาร 10 กรัม ผสมอาหารให้เข้ากันดีจากนั้นนำมาอัดผ่านกระบอกฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วทำการตัดเป็นชิ้นเล็กๆและนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

(3) การเตรียมกุ้งแคระ

นำกุ้งแคระมาใส่กล่องพลาสติกขนาด 25 x 20 เซนติเมตร 24 กล่อง กล่องละ 20 ตัว นำฝามาปิดเพื่อป้องกันสิ่งสกปรกลงไปในกล่อง และให้อาหารที่ผสมแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้ โดยให้อาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัวกุ้ง โดยให้อาหาร 2 มื้อ ต่อ วัน และถ่ายน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ ทุกๆ 3 วันหรือมากกว่าตามสมควร

3.2.2 การทดลองที่ 2 ปริมาณแคโรทีนอยด์สังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาสีของกุ้งแคระสวยงาม

3.2.2.1 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) กำหนดปริมาณสารแคโรทีนอยด์สังเคราะห์ ได้แก่ 0, 80 และ 160 มก./กก. แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ ระยะเวลาในการเลี้ยง 8 สัปดาห์ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารควบคุม (อาหารกุ้งไม่ผสมสารแคโรทีนอยด์)
ชุดการทดลองที่ 2 อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์สังเคราะห์ 80 มก./กก.
ชุดการทดลองที่ 3 อาหารผสมสารแคโรทีนอยด์สังเคราะห์ 100 มก./กก.

3.2.2.2 วิธีการทดลอง

นำสารแคโรทีนอยด์สังเคราะห์มาหาปริมาณแคโรทีนอยด์ เตรียมอาหารผสมแคโรทีนอยด์และการเตรียมกุ้งแคระและการให้อาหารระหว่างการทดลองตามการทดลองที่ 1

3.2.3 การทดลองที่ 3 ปริมาณสารเบตาเลนที่เหมาะสมต่อการพัฒนาสีของกุ้งแคระสวยงาม

3.2.3.1 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) แบ่งตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดเบตาเลนจากบีทรูทผงอบแห้ง ทั้งหมด 4 ระดับ ทำการทดลองชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ ใช้กุ้งในการทดลอง 20 ตัวต่อหน่วยทดลอง ได้แก่

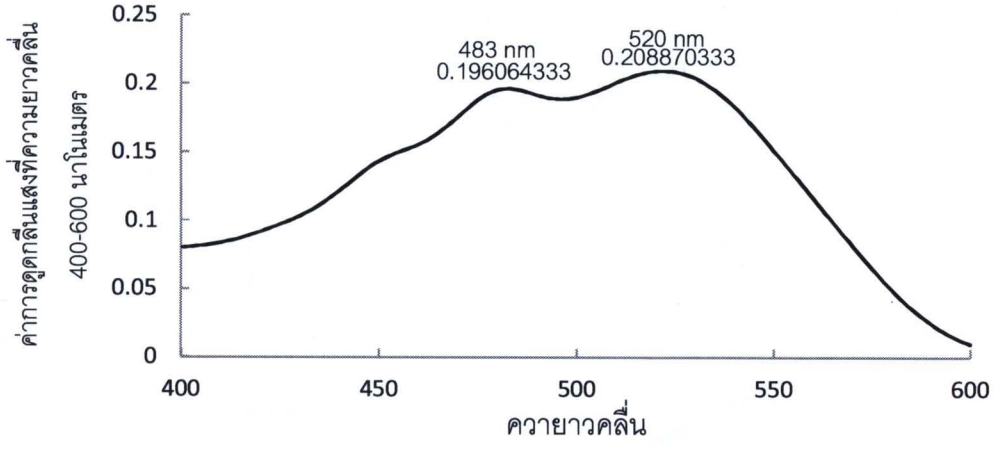
ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุม เลี้ยงด้วยอาหารพื้นฐาน (ไม่เสริมสารเบตาเลน)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารที่มีการเสริมสารสกัดเบตาเลน 20 มก./กก.
ชุดการทดลองที่ 3 อาหารที่มีการเสริมสารสกัดเบตาเลน 40 มก./กก.
ชุดการทดลองที่ 4 อาหารที่มีการเสริมสารสกัดเบตาเลน 60 มก./กก.

3.2.3.2 วิธีการทดลอง

(1) การเตรียมสูตรอาหาร

นำอาหารกุ้งที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารกุ้งวัยอ่อนเบอร์ 101 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง เพื่อหาปริมาณสารเบตาเลนที่อยู่ในอาหารก่อนทำการทดลอง เตรียมผงบีทรูทที่นำมาผสมในสูตรอาหารโดยการนำหัวบีทรูทสดมาหั่นและอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการบดและนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารเบตาเลนในหัวบีทรูทโดยชั่งผงบีทรูท 0.5 กรัม นำมาสกัดด้วย เอทานอล 80% ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer UV/VIS) ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าปริมาณสารสีในบีทรูทพบมีค่าพีค (peak) อยู่ที่ความยาวคลื่น 520 และ 483 นาโนเมตร (ภาพที่ 4-1) จากนั้น นำผงบีทรูทอบแห้งผสมอาหารกุ้งตามระดับความเข้มข้น 0, 20, 40 และ 60 มิลลิกรัมต่ออาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม ตามลำดับ นำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง บดเป็นขนาดเท่าๆกัน ห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยด์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C



ภาพที่ 4-1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่นและค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเบตาเลน

คำนวณหาปริมาณสารสารเบตาเลนสารเบตาไซยานินและเบตาแซนทินในบีทรูทตามสมการ

$$A = abc$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 476 หรือ 538 นาโนเมตร
a = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงงของความยาวคลื่น 476 หรือ 538 นาโนเมตร เท่ากับ 1175 หรือ1120
b = ความกว้างของคิวเวต 1 เซนติเมตร มีค่าเท่ากับ 1
c = ปริมาณเบตาเลนในสารตัวอย่าง

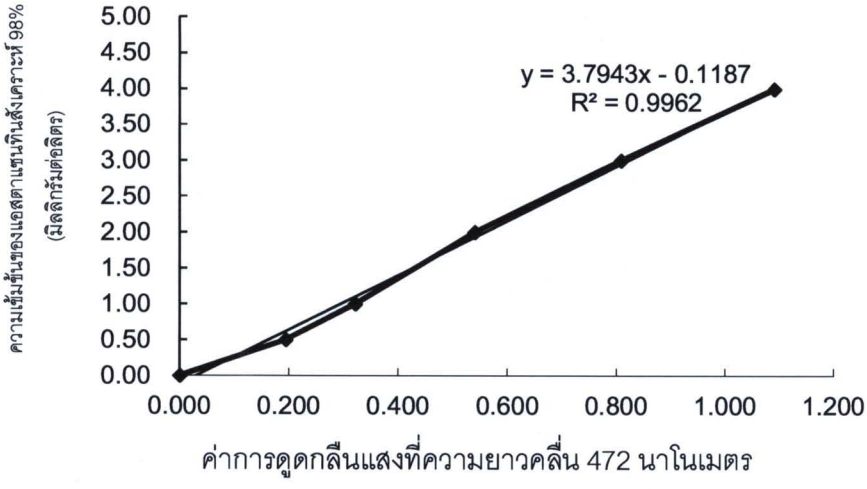
(2) การเลี้ยงกุ้งแคระ

เลี้ยงกุ้งแคระในกล่องพลาสติกขนาด 19x27x12 เซนติเมตร ใช้น้ำในการเลี้ยงประมาณ 5 ลิตร จัดสภาพการทดลองให้มีมอสชวาและกรวดเพื่อให้กุ้งแคระได้หลบซ่อนตัว ชั่งน้ำหนักกุ้งแคระก่อนทำการทดลองและทุกๆ 2 สัปดาห์ เพื่อคำนวณน้ำหนักอาหารให้เหมาะสมกับน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลง อัตราการให้อาหาร 3% ของน้ำหนักตัวต่อวัน โดยแบ่งให้อาหารวันละ 2 ครั้ง(เช้า-เย็น) ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 10% ทุก 2 วัน จนครบ 6 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงเก็บตัวอย่างกุ้งแคระทำการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณรงควัตถุที่สะสมในกุ้งแคระ การทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเพอร์อ็อกซิเดชันของไขมัน (Thiobarbituric acid reactive substance, TBARS) และการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

(3) การวิเคราะห์คุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งแคระได้แก่ ค่าความกระด้าง (Hardness) ค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณอ็อกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ค่าการนำไฟฟ้า (EC) อุณหภูมิ (Temperature) ทุก 1 สัปดาห์

(4) ชั่งน้ำหนักกุ้งก่อนทำการทดลองและสุ่มชั่งน้ำหนักกุ้งแคระทุก 2 สัปดาห์ จนกระทั่งครบ 6 สัปดาห์ แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นอัตราการรอดและน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น

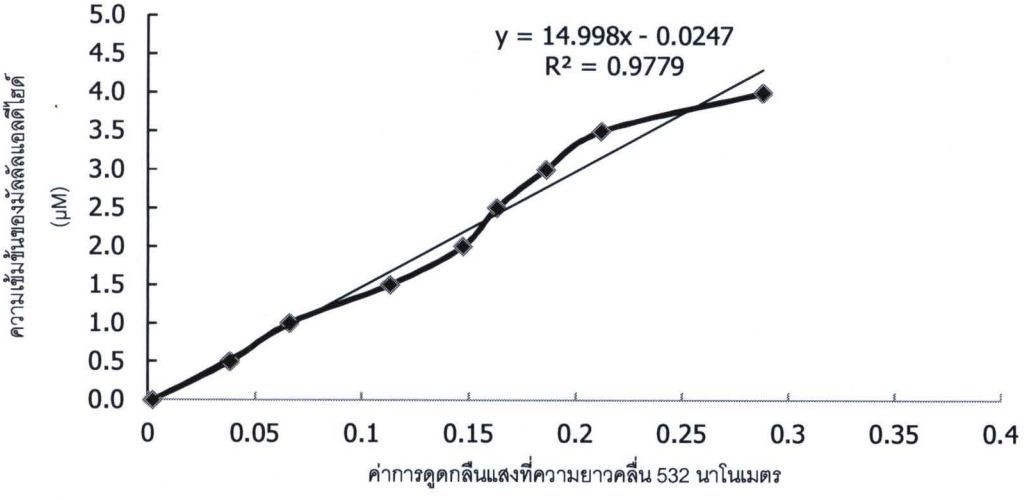
(5) การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุที่สะสมในกุ้งแคระ โดยชั่งตัวอย่างกุ้งแคระ 0.1 กรัม สกัดด้วยเอทานอล 80% ทิ้งไว้จนสกัดหมด บันทึกปริมาตรและนำสารสกัดมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 483 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณเพื่อหาปริมาณ สารเบตาเลน (เบตาแซนทินและเบตาไซยานิน) และวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทินในกุ้งแคระดัดแปลงจาก Ingle de la Mora *et al.* (2006) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 472 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงมาแทนในสมการของกราฟมาตรฐานแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 98% (ภาพที่ 4-2)



ภาพที่ 4-2 กราฟมาตรฐานของแอสตาแซนทินสังเคราะห์ 98%

(6) การทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเพอร์อ็อกซิเดชันของไขมัน (Thiobarbituric acid reactive substance,TBARS) ดัดแปลงจากวิธีการของ Zentric (1993) นำของเหลวที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงกุ้งแคระทั้งตัวกับ 50 mM Potassium phosphate buffer pH 7.4 มา

0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองมีฝาปิด เติม 50 mM Potassium phosphate buffer pH 7.4 ลงไป 0.5 มิลลิลิตร เติม thiobarbituric acid (TBA) 0.2 มิลลิลิตร เติม trichloroacetic acid (TCA) 1 มิลลิลิตร และเติม butylated hydroxytoluene (BHT) 0.01 มิลลิลิตร นำไปต้มในอ่างทำความร้อน (water bath) ใช้อุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยการแช่น้ำแข็ง นำสารในหลอดทดลองถ่ายลงใน eppendorf แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร และนำค่าที่วัดได้แทนในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานมัลลัลไดแอลดีไฮด์ (ภาพที่ 4-3)



ภาพที่ 4-3 กราฟมาตรฐานของมัลลัลไดแอลดีไฮด์

(7) การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ดัดแปลงจากวิธีการของ Liman *et al.*(2011) และ Sanchez-Moreno et al.(1998) การทดสอบ ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระโดยใช้ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) นำของเหลวที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงกุ้งแคระทั้งตัวกับ 50 mM Potassium phosphate buffer pH 7.4 มา 0.1 มิลลิลิตร เติม DPPH ลงไป 3.9 มิลลิลิตร เขย่าให้ เข้ากันโดยใช้ vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาแทนในสมการเพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ดังนี้

$$\%\text{inhibition DPPH} = 1-(\text{absorblank}_{\text{experiment}}/\text{absorblank}_{\text{control}})\text{x}100$$

3.2.3.3 การบันทึกข้อมูล

(1) สุ่มตัวอย่างกุ้งทุกๆ 14 วัน เพื่อหาปริมาณน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก

(2) เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำกุ้งแคระมาวิเคราะห์หาค่าแคโรทีนอยด์ในตัวกุ้งแคระ

3.2.4 การทดลองที่ 4 ปริมาณไคโตซานที่เหมาะสมต่อการพัฒนาสีของกุ้งแคระสวยงาม

3.2.4.1 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized (CRD) ปัจจัยที่ศึกษา คือ ระดับของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง ที่ระดับ 0, 10, 20, 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ โดยใช้กุ้งแคระ 20 ตัวต่อซ้ำ ตัวดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุมไม่มีการเติมไคโตซานในอาหาร

ชุดการทดลองที่ 2 ชุดการทดลองที่เติมไคโตซานในอาหาร 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ชุดการทดลองที่เติมไคโตซานในอาหาร 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ชุดการทดลองที่เติมไคโตซานในอาหาร 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3.2.4.2 วิธีการทดลอง

(1) การเตรียมไคโตซาน โดยนำไคโตซานผสมอาหารกุ้งตามระดับความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่ออาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม ตามลำดับ (ชั่งไคโตซาน 2.5 มก.ต่ออาหารกุ้ง 250 กรัม ไคโตซาน 5 มก.ต่ออาหารกุ้ง 250 กรัม และไคโตซาน 7.5 มก.ต่ออาหารกุ้ง 250 กรัม ตามลำดับ)

(2) นำไคโตซานที่ได้ไปทำการละลายกับกรดน้ำส้มและใส่น้ำจำนวน 150 มิลลิลิตร และนำไปคลุกเคล้ากับอาหาร จากนั้นนำอาหารที่ได้ผ่านการผสมแล้วไปใส่ในอะลูมิเนียมฟอยด์แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

(3) การเลี้ยงกุ้งแคระ นำกุ้งแคระในกล่องพลาสติกขนาด 19x27x12 เซนติเมตร ใช้น้ำในการเลี้ยงประมาณ 5 ลิตร จัดสภาพการทดลองให้มีมอสซวาและกรวดเพื่อให้กุ้งแคระได้หลบซ่อนตัว ชั่งน้ำหนักกุ้งแคระก่อนทำการทดลองและทุกๆ 2 สัปดาห์ เพื่อคำนวณน้ำหนักอาหารให้เหมาะสมกับน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลง อัตราการให้อาหาร 3% ของน้ำหนักตัวต่อวัน โดยแบ่งให้อาหารวันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 10% ทุก 2 วัน เก็บคราบกุ้งไปชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งทุกวันเป็นเวลา 4 สัปดาห์เพื่อดูการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของกุ้งแคระในความเข้มข้นของไคโตซานในอาหารที่แตกต่างกัน

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test ด้วยโปรแกรม SPSS