



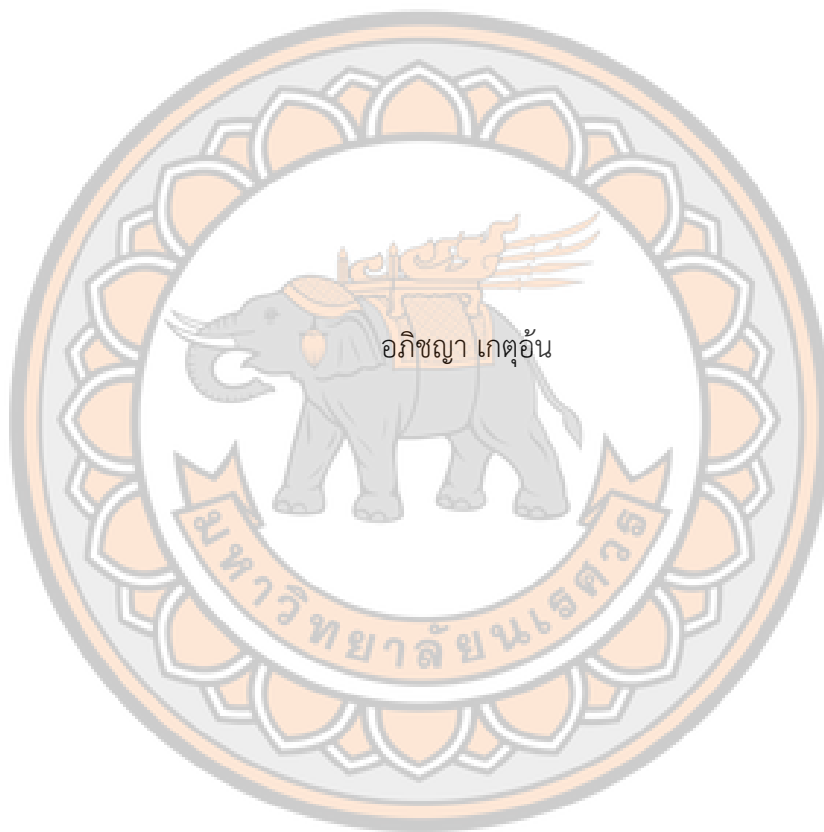
ผลของอาหารเสริมไบโกลูซิง ต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา
การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน และความเครียดของปลานิล



อภิษฎา เกตุอัน

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏ
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง
ปีการศึกษา 2567
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยราชภัฏ

ผลของอาหารเสริมไบโกลูซิง ต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา
การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน และความเครียดของปลานิล



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง
ปีการศึกษา 2567
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง “ผลของอาหารเสริมไบโกลูซิง ต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา
การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน และความเครียดของปลานิล”

ของ อภิษฎา เกตุอัน

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุดาพร ตงศิริ)

.....ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร.กัลย์กนิต พิสมยรมย์)

.....กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ เขียวขจรเขต)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัชพล การะเกตุ)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรรณกาญจน์ ชูทิพย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลของอาหารเสริมใบกัญชง ต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน และความเครียดของปลานิล
ผู้วิจัย	นางสาวอภิญา เกตุอัน
ประธานที่ปรึกษา	ดร.กัลย์กนิต พิสมยมย์
กรรมการที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ เขียวขจรเขต
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. วิทยาศาสตร์การประมง, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2567
คำสำคัญ	กัญชง, ปลานิล, การเจริญเติบโต, ภูมิคุ้มกัน, โลหิตวิทยา, ความเครียด

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ โดยเฉพาะปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่นิยมเลี้ยงกันทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย ปลานิลเป็นแหล่งโปรตีนจากสัตว์ที่มีราคาถูก เป็นที่ต้องการของตลาดและผู้บริโภค เกษตรกรจึงมีการเพาะเลี้ยงปลานิลด้วยระบบความหนาแน่นสูง เพื่อให้ได้ผลผลิตตามความต้องการ แต่เกษตรกรยังคงประสบปัญหาด้านการเกิดโรคในปลา และการใช้ยาปฏิชีวนะที่ส่งผลเสียต่อปลาและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการใช้พืชสมุนไพรทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง โดยเฉพาะกัญชง (*Cannabis sativa*) ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ส่วนของใบกัญชงใต้ช่อดอก (Sugar leaf) เป็นผลพลอยได้ที่เกษตรกรได้ตัดแต่งช่อดอกออกเพื่อจำหน่ายแล้ว ซึ่งใบกัญชงใต้ช่อดอกเป็นส่วนที่เหลือจากการเก็บเกี่ยวแต่ยังคงมีสารอาหาร และปริมาณสารสำคัญ เช่น Cannabidiol, terpenes, phenols, flavonoids, และ alkaloids เป็นต้น โดยมีรายงานการใช้สารสำคัญดังกล่าวเสริมในอาหารปลาเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และช่วยลดความเครียดในปลาที่เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิน้ำสูงได้ การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมใบกัญชงใต้ช่อดอกในอาหารต่อการเจริญเติบโต การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน และลดความเครียดของปลา โดยแบ่งเป็นอาหารทดลอง 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ ได้แก่ การทดลองที่ 1 อาหารที่ไม่มีการเสริมกัญชงใช้เป็นอาหารสูตรควบคุม (T1) ส่วนอาหารในการทดลองที่ 2-4 จะเสริมผงใบกัญชงที่ระดับต่าง ๆ ได้แก่ 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (T2-T4) โดยใช้ปลา 15 ตัวต่อถัง ที่มีความจุน้ำ 200 ลิตร ปลาทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 6.67 ± 0.03 กรัม/ตัว เลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์โดยให้ปลากินอาหารจนอิ่ม เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันในสัดส่วน 70 % ของน้ำในถัง ผลการทดลองพบว่าการเสริมใบกัญชงใต้ช่อดอกในอาหารทุก

สูตรไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิล ได้แก่ น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่ม น้ำหนักที่เพิ่มต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการกินอาหาร อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ดัชนีน้ำหนักตัวต่อดัชนีน้ำหนักตัวต่ออวัยวะภายใน และค่าปัจจัยของน้ำหนักต่อความยาวของปลาทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) โดยอัตราการรอดตายของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3 มีค่าสูงที่สุด คือ 95.00 ± 6.38 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) องค์ประกอบทางเคมีของซากปลา พบว่า โปรตีนซากปลาหลังการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ค่าไขมันลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ความชื้น และปริมาณเถ้าในซากปลาพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ค่าโลหิตวิทยาพบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาว จำนวนเม็ดเลือดแดง ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกชุดการทดลอง ($p>0.05$) การเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อวิทยาในการศึกษาครั้งนี้ พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเนื้อเยื่อตับ และม้ามในปลาที่ได้รับอาหารเสริมไบโกลูซิงได้ซอดอกที่ระดับ 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร แต่ไม่พบความผิดปกติในเนื้อเยื่อไต นอกจากนี้พบความผิดปกติที่เนื้อเยื่อลำไส้ในปลาที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุม เนื้อเยื่อเหงือกพบความผิดปกติในปลาที่ได้รับอาหารในทุกชุดการทดลอง การศึกษาครั้งนี้ พบว่า ในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารในการทดลองที่ 1 หรือกลุ่มควบคุม มีระดับการแสดงออกของยีน HSP70 สูงสุด ในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริมไบโกลูซิงได้ซอดอกในการทดลองที่ 2 และ 4 มีระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ที่ลดลง ($p<0.05$) ระดับการแสดงออกของยีน IL-6 ในปลาที่ได้รับอาหารทุกชุดการทดลอง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ระดับการแสดงออกของยีน TNF- α ในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารในการทดลองที่ 3 และ 4 มีระดับการแสดงออกของยีน TNF- α ต่ำกว่าในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารในการทดลองที่ 1 และ 2 ($p<0.05$) การทดสอบจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกในปลานิลที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ พบว่า อุณหภูมิน้ำที่สูงขึ้นส่งผลให้ปลา มีจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิน้ำปกติที่ 28 องศาเซลเซียส ($p<0.05$) โดยที่อุณหภูมิ 28, 32 และ 36 องศาเซลเซียส พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารเสริมไบโกลูซิงได้ซอดอกในการทดลองที่ 4 มีจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารในการทดลองที่ 1 ($p<0.05$) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การได้รับอาหารเสริมไบโกลูซิงได้ซอดอกสามารถช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกัน และลดความเครียดในปลานิลได้

Title THE EFFECTS OF DIETARY SUPPLEMENTATION OF HEMP LEAF ON GROWTH PERFORMANCE, HEMATOLOGY, IMMUNE AND STRESS RESPONSES OF NILE TILAPIA, *OREOCHROMIS NILOTICUS*

Author Apitchaya Kate-on

Advisor Kankanit Pisamayaron, Ph.D.

Co-Advisor Associate Professor Anurak Keawkajonket, Ph.D.

Academic Paper M.S. Thesis in Fisheries Science - (Type A 2), Naresuan University, 2024

Keywords Hemp, Nile tilapia, Growth performance, Hematology, Immune, Stress



ABSTRACT

Aquaculture is vital to the national economy, particularly with Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), a freshwater fish widely farmed worldwide, including in Thailand. Nile tilapia serves as an affordable source of animal protein that is highly demanded by markets and consumers. Farmers often adopt high-density farming systems to meet production requirements. However, they still face challenges such as fish disease outbreaks and the negative impacts of antibiotic usage on fish health and the environment. Consequently, the use of herbal plants as an alternative to antibiotics has become an area of significant interest, particularly hemp (*Cannabis sativa*), a new economic crop gaining attention. The sugar leaf of hemp, which are by-products from trimming flower buds for sale, are often discarded despite containing nutrients and bioactive compounds such as cannabidiol (CBD), terpenes, phenols, flavonoids, and alkaloids. These compounds have been reported to improve growth, boost immunity, and reduce stress in fish, particularly those raised under high water temperature conditions. This experiment aimed to investigate the effects of supplementing hemp sugar leaf in diets on growth performance, immune and stress responses in fish. The study was designed with four experimental diets, each with four replicates. The

treatments included: a control diet without hemp supplementation (T1), and experimental diets supplemented with hemp leaf powder at levels of 10, 20, and 40 g/kg of feed (T2–T4, respectively). A total of 15 fish per tank, with an average initial weight of 6.67 ± 0.03 gram per fish, were used in 200-liter tanks. The fish were fed to satiation for 10 weeks feeding trial was conducted, and water was exchanged daily at a rate of 70% of the tank volume. The results revealed that supplementing hemp sugar leaf in all experimental diets did not affect the growth performance and feed performance of Nile tilapia, including final body weight, weight gain, average daily gain, specific growth rate, rate of feed intake, feed conversion ratio, feed efficiency, hepatosomatic index, viscerosomatic index, and condition factor showed no significant differences among the treatments ($p > 0.05$). The survival rate of fish fed T3 was the highest at $95.00 \pm 6.38\%$, although no statistical difference was observed among treatments ($p > 0.05$). The chemical composition of whole-body fish revealed no significant differences in protein content ($p > 0.05$). However, lipid content significantly decreased ($p < 0.05$), while moisture and ash contents significantly increased ($p < 0.05$). Hematological parameters, including white blood cell count, red blood cell count, and hematocrit content, showed no significant differences across treatments ($p > 0.05$). Histological assessment revealed alterations in liver and spleen tissues in fish fed diets supplemented with hemp sugar leaf in T3 and T4. No abnormalities were observed in kidney tissues. However, intestinal abnormalities were detected in fish from the control group, and gill abnormalities were found in fish across all treatments. In terms of gene expression, fish in the control group (T1) exhibited the highest expression levels of the HSP70 gene, whereas fish fed diets supplemented with hemp sugar leaf in T2 and T4 showed reduced HSP70 expression levels ($p < 0.05$). and no significant differences were observed for IL-6 gene expression among all tested groups ($p > 0.05$). However, the expression of the TNF- α gene was lower in fish fed T3 and T4 compared to those fed T1 and T2 ($p < 0.05$). Under temperature stress, the number of operculum movements increased at higher water temperatures compared to the normal temperature of 28°C ($p < 0.05$). At water temperatures of 28, 32, and 36°C , fish fed T4 exhibited significantly fewer operculum movements than fish in the control group (T1) ($p < 0.05$). Overall, the present study indicates that supplementing the diet with hemp sugar leaf could

strengthen immunity and reduce stress without significant effects on growth and feed performance in Nile tilapia.



ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจาก ดร.กัลย์กนิต พิศมัยมย์ ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนการตรวจเพื่อ การปรับแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเมตตา เอาใจใส่ และเสียสละเวลาอันมีค่าให้แก่ผู้วิจัยได้เป็น อย่างดีตลอดมา จนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์ได้ และสนับสนุนอุปกรณ์ สถานที่ในการทดลองเลี้ยงปลา ชุตสีกัด สารเคมี และการศึกษาทางพยาธิวิทยา ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ เขียว- ขจรเขต กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้คำแนะนำการปรึกษาตลอดการทำวิทยานิพนธ์ สนับสนุนช่วยเหลืออุปกรณ์ในการทดลอง และสอนขั้นตอนการทดสอบการแสดงออกของยีน แก่ผู้วิจัย ได้เป็นอย่างดีตลอดมา และขอขอบพระคุณคุณ รศ.ดร.วิลาสินี อินญาวิเลิศ และ รศ.ดร.คำพ รัตนสุด ที่สนับสนุนเครื่องมืออุปกรณ์ในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุตาพร ตงศิริ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัชพล การะเกตุ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ให้ความอนุเคราะห์ชี้แนะ แนวทางเพื่อให้งานวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จสมบูรณ์ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ

ขอขอบคุณฟาร์มกัญชง Mr.Hemp จังหวัดสมุทรปราการ เป็นอย่างสูง ที่ได้สนับสนุนใบกัญชง สำหรับนำมาทดลองในงานวิจัย และขอขอบพระคุณ คุณพรพิมล แสงจันทร์ นักวิทยาศาสตร์ประจำ สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ที่ช่วยเหลือในด้านการเบิกจ่ายอุปกรณ์ และสารเคมีในห้องปฏิบัติการ สาขาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณครอบครัวผู้วิจัยที่ห่วงใย เป็นกำลังใจ และสนับสนุน ผู้วิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์คุณค่า และคุณประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอบแต่บิดา มารดา คณาจารย์ และสถาบันการศึกษาที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชา มีส่วนร่วมใน การวางรากฐานการศึกษา อบรม และให้การสนับสนุนผู้วิจัยตลอดมาจนจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

อภิขญา เกตุอัน

สารบัญ

หน้า

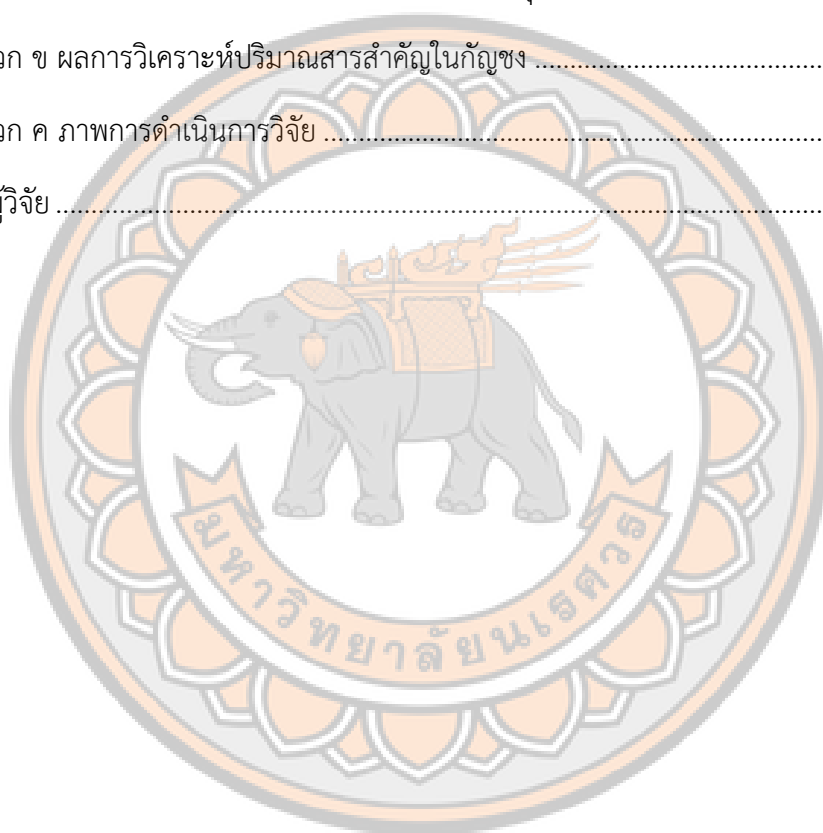
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
ประกาศคุุณูปการ	ช
สารบัญ	ณ
สารบัญตาราง	ท
สารบัญภาพ	ฒ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 จุดมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
1.3 ความสำคัญของการวิจัย	3
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น.....	4
1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ	4
1.7 สมมุติฐานของการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 กัญชง (Hemp).....	6
2.1.1 ประวัติความเป็นมาของกัญชง.....	6
2.1.2 อนุกรมวิธานของกัญชง	6
2.1.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกัญชง	6
2.1.4 ความแตกต่างระหว่างกัญชง (Hemp) และกัญชา (Marijuana).....	9
2.1.5 การใช้ประโยชน์จากใบกัญชง.....	11
2.1.6 สารสำคัญในกัญชง.....	12
2.2 ปลานิล (Nile tilapia)	14
2.2.1 อนุกรมวิธานปลานิล.....	14

2.2.2	ชีววิทยาของปลานิล	15
2.2.3	การเพาะเลี้ยงปลานิล	16
2.2.4	ความต้องการสารอาหารของปลานิล	16
2.2.5	สถานการณ์ทางการตลาดปลานิล	17
2.3	โลหิตวิทยาของปลา (Fish hematology).....	18
2.3.1	น้ำเลือด หรือพลาสมา (Plasma)	18
2.3.2	เซลล์เม็ดเลือดแดง (Red blood cells หรือ Erythrocytes).....	18
2.3.3	เซลล์เม็ดเลือดขาว (White blood cells หรือ Leukocytes)	19
2.3.4	เกล็ดเลือด หรือ thrombocyte (Platelet or Thrombocyte)	20
2.4	ระบบภูมิคุ้มกันของปลา (Fish immune system).....	21
2.4.1	ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ หรือภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (Non-specific immunity or Innate immunity).....	21
2.4.2	ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ หรือภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาภายหลัง (Specific immunity or Adaptive or acquired immunity)	22
2.4.3	ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน.....	23
2.5	ความเครียดในปลานิล (Stress in tilapia)	25
2.5.1	ปัจจัยที่ทำให้เกิดความเครียดในปลา	25
2.5.2	ฮีตช็อกโปรตีน (Heat shock protein; HSP).....	26
2.5.3	แนวทางการป้องกัน และแก้ไขปัญหาคความเครียดในปลา.....	26
2.6	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	26
2.6.1	การใช้กัญชงในสัตว์น้ำ.....	27
2.6.2	การใช้กัญชงในสัตว์อื่น ๆ	29
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	30
3.1	ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง (Population and sample).....	30
3.2	ตัวแปรที่ใช้ในการวิจัย (Variables in research).....	30
3.3	เครื่องมือ และอุปกรณ์ (Tools and equipment).....	30
3.4	การเตรียมอาหารทดลอง (Experimental diets preparation).....	33
3.4.1	การเตรียมกัญชง	33
3.4.2	การเตรียมวัตถุดิบอาหารทดลอง	33
3.4.3	การเตรียมอาหารทดลอง.....	33

3.5 การเตรียมสัตว์ทดลอง (Experimental fish)	35
3.6 การวัดการเจริญเติบโต (Growth performance)	36
3.6.1 น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (Weight gain, WG, %).....	36
3.6.2 น้ำหนักเพิ่มต่อวัน (Average diary gain, ADG, กรัม/วัน)	36
3.6.3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, SGR, %/วัน).....	36
3.6.4 อัตราการรอดตาย (Survival rate, SR, %).....	36
3.7 การวัดประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed performance).....	36
3.7.1 อัตราการกินอาหาร (Rate of feed intake, FI, %)	36
3.7.2 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (Feed conversion ratio, FCR)	36
3.7.3 ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed efficiency, FE, %)	36
3.8 การวัดค่าดัชนีน้ำหนักตัวต่อตับ อวัยวะภายใน และค่าปัจจัยของน้ำหนักต่อความยาวของปลา ทดลอง	37
3.8.1 ค่าปัจจัยของน้ำหนักต่อความยาว (Condition factors, K, g/cm ³)	37
3.8.2 ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักตับ (Hepatosomatic index, HIS, %).....	37
3.8.3 ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักอวัยวะภายใน (Viscerosomatic index, VSI, %).....	37
3.9 การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของซากปลาทั้งตัว.....	37
3.9.1 การเก็บรักษาโปรตีน (Protein retention, PR, เปอร์เซ็นต์).....	37
3.9.2 การเก็บรักษาไขมัน (Lipid retention, LR, เปอร์เซ็นต์)	37
3.10 การเก็บตัวอย่างเลือด (Blood Sample collection).....	38
3.11 การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา (Hematology analysis)	38
3.11.1 ปริมาณเม็ดเลือดแดง (Red blood cell; RBC)	38
3.11.2 ปริมาณเม็ดเลือดขาว (White blood cell; WBC)	39
3.11.3 การจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาว	40
3.11.4 ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit; Hct).....	40
3.12 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อวิทยาของปลานิล (Histological).....	41
3.13 การทดสอบการแสดงออกของยีน HSP70 และยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล (Gene expression in Nile tilapia)	43
3.14 การทดสอบการเคลื่อนที่ของแผ่นปิดเหงือกในปลานิลที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Operculum movement)	45
3.15 วิธีวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical analysis).....	45

บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	46
4.1 ปริมาณสารสำคัญในใบกัญชงใต้ช่อดอก.....	46
4.2 ผลของอาหารเสริมใบกัญชงต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และองค์ประกอบทางเคมีของซากปลานิล.....	46
4.2.1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว (Average body weight)	47
4.2.2 การเจริญเติบโต (Growth performance)	48
4.2.3 ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed performance)	51
4.2.4 องค์ประกอบทางเคมีของซากปลานิล (Chemical composition)	51
4.3 ผลของอาหารเสริมใบกัญชงต่อค่าโลหิตวิทยาของปลานิล (Hematology)	53
4.3.1 ค่าโลหิตวิทยาของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชง	53
4.3.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาเซลล์เม็ดเลือดของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชง	54
4.4 ผลของอาหารเสริมใบกัญชงต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของปลานิล	60
4.4.1 เนื้อเยื่อดับ (Liver tissues).....	60
4.4.2 เนื้อเยื่อม้าม (Spleen tissues).....	62
4.4.3 เนื้อเยื่อไต (Kidney tissues).....	63
4.4.4 เนื้อเยื่อลำไส้ (Intestine tissues).....	64
4.4.5 เนื้อเยื่อลำเหงือก (Gill tissues).....	65
4.5 ผลของอาหารเสริมใบกัญชงต่อการแสดงออกของยีน HSP70 และยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในปลานิล	66
4.6 ผลของอาหารเสริมใบกัญชงต่อจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกในปลานิลที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ.....	67
บทที่ 5 บทสรุป	70
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	70
5.2 อภิปรายผล.....	71
5.2.1 ปริมาณสารสำคัญในใบกัญชงใต้ช่อดอก	71
5.2.2 ผลของอาหารเสริมใบกัญชงต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และองค์ประกอบทางเคมีของซากปลานิล.....	72
5.2.3 ผลของอาหารเสริมใบกัญชงต่อค่าโลหิตวิทยาของปลานิล (Hematology).....	74
5.2.4 ผลของอาหารเสริมใบกัญชงต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของปลานิล	75

5.2.5 ผลของอาหารเสริมไบแก๊ซต่อการแสดงออกของยีน HSP70 และยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในปลานิล.....	76
5.2.6 ผลของอาหารเสริมไบแก๊ซต่อจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกในปลานิลที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ.....	77
5.3 ข้อเสนอแนะ	79
บรรณานุกรม	80
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบอาหาร.....	90
ภาคผนวก ข ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในแก๊ซ	102
ภาคผนวก ค ภาพการดำเนินการวิจัย	103
ประวัติผู้วิจัย	111



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกัญชง (Hemp) และกัญชา (Marijuana).....	11
ตาราง 2 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในใบกัญชง (Bioactive compounds).....	13
ตาราง 3 คุณค่าทางโภชนาการ ในส่วนต่าง ๆ ของกัญชา	14
ตาราง 4 ความต้องการสารอาหารของปลานิล.....	17
ตาราง 5 ปริมาณผลผลิตปลานิล และเนื้อที่เลี้ยงของประเทศไทย ปี 2559-2564	18
ตาราง 6 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบอาหาร (เปอร์เซ็นต์)	33
ตาราง 7 องค์ประกอบของอาหารทดลอง (กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร).....	34
ตาราง 8 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง (เปอร์เซ็นต์).....	35
ตาราง 9 ขั้นตอนการย้อมสีเนื้อเยื่อ (Tissue staining).....	42
ตาราง 10 น้ำหนักเฉลี่ยของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมใบกัญชงที่ระดับต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ (กรัม/ตัว)	48
ตาราง 11 การเจริญเติบโตของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมใบกัญชงที่ระดับต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์	50
ตาราง 12 ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมใบกัญชงที่ระดับต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์.....	51
ตาราง 13 องค์ประกอบทางเคมีของซากปลานิล (เปอร์เซ็นต์)	53
ตาราง 14 ค่าโลหิตวิทยาของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมกัญชง เป็นเวลา 10 สัปดาห์	54
ตาราง 15 จำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือก (ครั้ง/นาที) เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยในแนวนอน และแนวตั้ง	69

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 ลักษณะของลำต้นกัญชง.....	7
ภาพ 2 ลักษณะของดอกกัญชง ก) ดอกเพศผู้ ข) ดอกเพศเมีย.....	8
ภาพ 3 ลักษณะของใบ และช่อดอกกัญชง	8
ภาพ 4 ลักษณะของเมล็ดกัญชง.....	9
ภาพ 5 ความแตกต่างระหว่างกัญชง (Hemp) และกัญชา (Marijuana).....	10
ภาพ 6 โครงสร้างของ Tetrahydrocannabinol (THC) และ Cannabidiol (CBD).....	13
ภาพ 7 ลักษณะภายนอกของปลานิล	15
ภาพ 8 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดแดง.....	19
ภาพ 9 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ	21
ภาพ 10 เปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต (% PCV) ในเลือดปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารกลุ่มต่าง ๆ.....	27
ภาพ 11 ผลของอาหารเสริม Cannabidiol (CBD) ในปริมาณที่แตกต่างกัน.....	28
ภาพ 12 ตำแหน่งการนับเซลล์เม็ดเลือดแดง (R) และเซลล์เม็ดเลือดขาว (W) บนสไลด์นับเม็ดเลือด (Blood counting chamber).....	39
ภาพ 13 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดแดง (ลูกศรสีแดง) ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชงที่ระดับต่าง ๆ.....	55
ภาพ 14 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาว (ลูกศรสีแดง) ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชง	56
ภาพ 15 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาว (ลูกศรสีแดง) ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชง	57
ภาพ 16 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาว (ลูกศรสีแดง) ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชง	58
ภาพ 17 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาว (ลูกศรสีแดง) ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชง	59
ภาพ 18 ลักษณะของเนื้อเยื่อตับของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชง	61
ภาพ 19 ลักษณะของเนื้อเยื่อม้ามของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชง	62
ภาพ 20 ลักษณะของเนื้อเยื่อไตของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชง	63
ภาพ 21 ลักษณะของเนื้อเยื่อลำไส้ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชง, ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	64
ภาพ 22 ลักษณะของเนื้อเยื่อเหงือกของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชง, ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	65
ภาพ 23 การแสดงออกของยีน HSP70 ในตับของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมใบกัญชง.....	66
ภาพ 24 การแสดงออกของยีน IL6 ในตับของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมใบกัญชง.....	67
ภาพ 25 การแสดงออกของยีน TNF alpha ในตับของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมใบกัญชง.....	67

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีความสำคัญต่อการพัฒนาเศรษฐกิจทั้งในระดับชาติ และนานาชาติ (Yue et al., 2024) โดยเฉพาะปลานิล ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่นิยมเลี้ยงกันทั่วโลก รวมถึงประเทศไทยที่เป็นหนึ่งในผู้ผลิตปลานิลรายใหญ่ที่สุดเป็นอันดับที่ 4 ของโลก (Tveteras, R., 2016) เนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว และทนต่อสภาพแวดล้อม การเพาะเลี้ยงปลานิลขยายตัวอย่างรวดเร็ว (Libanori et al., 2021) และคาดว่าจะภายในปี 2030 จะมีผลผลิตปลานิลมากถึง 7.3 ล้านตัน (Behera et al., 2018) เนื่องจากปลานิลเป็นแหล่งโปรตีนจากสัตว์ที่มีราคาถูก เป็นที่ต้องการของตลาดและผู้บริโภค ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลผลิตตามความต้องการ เกษตรกรจึงมีการเพาะเลี้ยงปลานิลด้วยระบบความหนาแน่นสูง (Intensive aquaculture) (Madyod et al., 2019) แต่อย่างไรก็ตามพบว่า ระบบการเลี้ยงในรูปแบบนี้มักส่งผลเชิงลบต่อปลานิล เช่น ทำให้ปลาเกิดความเครียด (Stress) ลดความอยากอาหาร และเสี่ยงการติดเชื้อจากโรคฉวยโอกาสที่นำไปสู่การตาย และก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในที่สุด ในเชิงปฏิบัติเกษตรกรส่วนมากมักใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีเพื่อการป้องกัน และรักษาโรค (Lattos et al., 2022) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะมักก่อให้เกิดผลกระทบในหลาย ๆ ด้าน เช่น การดื้อยาของแบคทีเรีย การตกค้างของยาปฏิชีวนะซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค และเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม (Serwecinska, 2020) ด้วยเหตุนี้พืชสมุนไพรจึงถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจากต้นทุนต่ำ ความเป็นพิษและสารตกค้างน้อย รวมทั้งเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Semwal et al., 2023)

กัญชง (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*) เป็นพืชเศรษฐกิจใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่า 500 ชนิด สารประกอบที่น่าสนใจ ได้แก่ สาร Cannabidiol (CBD), ฟีนอล, อัลคาลอยด์, เทอร์พีน และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น (Radwan et al., 2021) กัญชงสามารถนำไปประยุกต์เพื่อใช้ประโยชน์ทั้งในมนุษย์และสัตว์ ในด้านประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น การพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพร ยา และอาหาร เพื่อลดอาการเครียด เสริมสร้างภูมิคุ้มกัน (Nichols et al., 2019) ด้านการอักเสบ (Kongkadee et al., 2022) ป้องกันการเกิดโรคหัวใจ และมะเร็ง เป็นต้น (Ni et al., 2023) อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบการรายงานเกี่ยวกับผลของการเสริมกัญชงในอาหารต่อการเจริญเติบโตของปลา โดยเฉพาะปลานิลที่เป็นปลาที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของไทย แต่มีงานวิจัยจำนวนมากที่รายงานเกี่ยวกับผลกระทบของ CBD ต่อการบริโภคอาหาร และการเพิ่มน้ำหนักตัวทั้งในสัตว์ ในมนุษย์ (Pinto et al., 2022) และในปลา เช่น ปลาโคร

เกอร์ (*Larmichthys crocea*) (Wang et al., 2023), ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (Camargos-Santos et al., 2022, Juries, 2021), ปลาหมอสี (*Danio rerio*) (Pandelides et al., 2020) เป็นต้น

การศึกษาในครั้งนี้ได้นำส่วนเหลือใช้ของกัญชงที่เกษตรกรได้มีการตัดแต่งช่อดอกออก และเหลือส่วนที่เรียกว่า ใบใต้ช่อดอก (Sugar leaf) ซึ่งเป็นส่วนที่เหลือทิ้งจากการเก็บเกี่ยว แต่ยังคงเป็นส่วนที่มีสารอาหาร และปริมาณสารสำคัญ เช่น สาร CBD ในปริมาณที่สูงประมาณ 20,000 ไมโครกรัม ต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง (Andre et al., 2016) ผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญ และประโยชน์ของการนำใบกัญชงใต้ช่อดอกซึ่งเป็นเศษเหลือมาใช้เป็นอาหารเสริมในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งจะส่งผลต่อการเจริญเติบโต ลดความเครียด กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และการเพิ่มผลแก่เกษตรกรได้อย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิของน้ำที่สูงขึ้นมักทำให้ปลานิลประสบปัญหากับความเครียด ซึ่งส่งผลกระทบต่อความเป็นอยู่ของปลานิล ร่างกายจึงมีการตอบสนองต่อความเครียดในรูปแบบต่าง ๆ เช่น มีพฤติกรรมการว่ายอยู่บริเวณผิวน้ำ และอ้าปากสูดอากาศเพื่อหายใจ มีความถี่ในการหายใจสูงขึ้น หรือสามารถตรวจการแสดงออกของยีน HSP70 (Dawood, 2020) และยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น TNF- α , IL-6 เป็นต้น นอกจากนี้อาจมีการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยา เช่น ระดับน้ำตาลในเลือด ฮีมาโตคริต เป็นต้น (Mortuza et al., 2021) อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานการใช้ใบกัญชงเสริมในอาหารปลานิล ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้ใบกัญชงเสริมในอาหารปลานิลต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา การตอบสนองของภูมิคุ้มกัน และความเครียดในปลานิล

1.2 จุดมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบผลของอาหารเสริมใบกัญชงที่ระดับต่างกัน ประกอบด้วย 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร องค์ประกอบทางเคมีของซาก ค่าโลหิตวิทยา การเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อวิทยา การแสดงออกของยีน HSP70 และยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในปลานิล อีกทั้งเพื่อเปรียบเทียบผลของอาหารเสริมใบกัญชงที่ระดับต่างกัน ประกอบด้วย 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารต่อความเครียด จากการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกของปลานิลที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำที่ 28, 32, 36 และ 40 องศาเซลเซียส

1.3 ความสำคัญของการวิจัย

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีความสำคัญสำหรับประเทศไทย เนื่องจากมีความต้องการทางตลาด และผู้บริโภคสูง เพื่อให้ได้ผลผลิตตามความต้องการ เกษตรกรจึงมีการเพาะเลี้ยงปลานิลด้วยระบบความหนาแน่นสูง (Madyod et al., 2019) ทำให้ปลาเกิดความเครียด และเพิ่มโอกาสในการเกิดโรคติดเชื้อ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำ เป็นอีกสาเหตุที่ทำให้ปลาเกิดความเครียด ส่งผลให้ปลาเกิดการตายสูง และเกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ทางผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญของการใช้ใบกัญชงเป็นอาหารเสริมในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจากใบกัญชงเป็นส่วนที่เหลือใช้จากการตัดช่อดอกเพื่อจำหน่าย และใช้ประโยชน์ ดังนั้นจึงเป็นการใช้วัตถุดิบเหลือใช้ให้เกิดประโยชน์ นอกจากนี้ใบกัญชงยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย เช่น Cannabidiol (CBD) เนื่องจากยังไม่พบรายงานการใช้กัญชงเสริมในอาหารสัตว์น้ำ โดยเฉพาะปลานิลที่เป็นปลาที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของไทย ดังนั้นการนำใบกัญชงมาเสริมอาหารสัตว์น้ำจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจในการศึกษาด้านการส่งเสริมภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ ส่งเสริมการเจริญเติบโต ลดความเครียด และเป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้ เพื่อให้เกิดประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาผลของการใช้ใบกัญชงได้ช่อดอกที่เป็นผลพลอยได้จากการตัดแต่งช่อดอกของเกษตรกรนำมาเสริมในอาหารปลานิลที่ระดับต่างกัน (0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) ต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร องค์ประกอบทางเคมีของซาก ค่าโลหิตวิทยา เนื้อเยื่อวิทยา การเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือก การแสดงออกของยีน HSP70 และยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน กำหนดให้อาหารทุกชุดการทดลองมีระดับของโปรตีนไม่น้อยกว่า 31 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 7 เปอร์เซ็นต์ โดยนำปลานิลมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพิษณุโลก จำนวน 400 ตัว น้ำหนักเริ่มต้น 2-3 กรัมต่อตัว นำมาเลี้ยงปรับสภาพในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 500 ลิตร ให้อาหารสูตรที่มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ วันละ 2 ครั้ง คือ ช่วงเช้า เวลา 08.00 น. และช่วงเย็น เวลา 16.00 น. โดยให้ปลากินจนอิ่ม มีการให้อากาศตลอดเวลา และเปลี่ยนถ่ายน้ำวันเว้นวันในสัดส่วน 70% ของน้ำในถัง โดยใช้น้ำปราศจากคลอรีน เลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 30 วัน จนได้ปลาตามขนาดที่ต้องการ 6-7 กรัมต่อตัว แบ่งชุดการทดลองเป็นจำนวน 4 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองแบ่งออกเป็น 4 ซ้ำ ใช้ปลาทดลองซ้ำละ 15 ตัว โดยคัดปลาขนาดใกล้เคียงกันมาใส่ถังไฟเบอร์กลาสขนาด 250 ลิตร ความจุน้ำประมาณ 200 ลิตร จากนั้นเลี้ยงปลานิลเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คือ ช่วงเช้า เวลา 08.00 น. และช่วงเย็น เวลา 16.00 น. โดยให้ปลากินจนอิ่ม มีการให้อากาศตลอดเวลา และเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันในสัดส่วน 70% ของน้ำในถัง โดยใช้น้ำปราศจากคลอรีน และสูบลมมาซึ่งน้ำหนักเพื่อวัดการเจริญเติบโตทุก ๆ 2 สัปดาห์ บันทึกผลการเจริญเติบโต และ

คำนวณน้ำหนักสุดท้าย, น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น, น้ำหนักที่เพิ่มต่อวัน, อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และ อัตราการรอดตาย, ปริมาณอาหารที่ปลากิน, อัตราการกินอาหาร, อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก, และประสิทธิภาพการใช้อาหาร หลังจากสิ้นสุดการทดลองวัดความยาวปลา เพื่อคำนวณค่าปัจจัย น้ำหนักต่อความยาว และการรณยฆาตด้วยน้ำมันกานพลูเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร นำตับและ อวัยวะภายในมาชั่งน้ำหนัก และคำนวณค่าดัชนีน้ำหนักปลาต่อตับ และอวัยวะภายใน ศึกษา องค์ประกอบทางเคมีของซาก, การเก็บรักษาโปรตีน, การเก็บรักษาไขมัน, เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อ วิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา ประกอบด้วย จำนวนเม็ดเลือดแดง, จำนวนเม็ดเลือดขาว, ค่าฮีมาโตคริต และจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาว, ศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อวิทยา ประกอบด้วย ตับ ม้าม ไต ลำไส้ และเหงือก, ศึกษาจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ น้ำที่ 28, 32, 36, 38 และ 40 องศาเซลเซียส, ศึกษาการแสดงออกของยีน HSP70 และยีนที่เกี่ยวข้อง กับระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล ได้แก่ TNF- α และ IL-6 โดยจะเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ที่ได้รับการเสริมใบกัญชงในอาหารที่ระดับแตกต่างกัน และระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมใบกัญชงใน อาหาร

1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น

ลูกปลานิลที่ใช้ในการทดลองซื้อมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพิษณุโลก จำนวน 400 ตัว น้ำหนักเริ่มต้น 2-3 กรัมต่อตัว นำมาปรับสภาพในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 500 ลิตร ให้อาหาร สูตรที่มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ วันละ 2 ครั้ง คือ ช่วงเช้า เวลา 08.00 น. และช่วงเย็น เวลา 16.00 น. โดยให้ปลากินจนอิ่ม มีการให้อากาศตลอดเวลา และเปลี่ยนถ่ายน้ำวันเว้นวันใน สัปดาห์ 70% ของน้ำในถังโดยใช้น้ำปราศจากคลอรีน เลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 30 วัน จนได้ปลาตาม ขนาดที่ ต้องการประมาณ 6 กรัมต่อตัว และคัดปลาขนาดใกล้เคียงกันมาใส่ถังทดลองตามแผนการ ทดลองที่ วางไว้

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ

กัญชา หมายถึง พืชล้มลุกมีอายุเพียงปีเดียว มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชีย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. subsp. *indica* ส่วนของใบมีลักษณะ 5-7 แฉก ลำต้นสูงน้อยกว่า 2 เมตร มีสาร ออกฤทธิ์ (Bioactive compounds) มากกว่า 500 ชนิด สารสำคัญที่พบในกัญชา ได้แก่ สาร Tetrahydrocannabinol (THC) ประมาณ 1-10% ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท และสาร Cannabidiol (CBD) พบในปริมาณไม่เกิน 2%

กัญชง หมายถึง พืชล้มลุกในตระกูล Canabaceae เดียวกับกัญชา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* ส่วนของใบมีลักษณะ 7-9 แฉก ลำต้นสูงมากกว่า 2 เมตร กัญชง

มีเส้นใยอ่อนนุ่ม เหนียว ทนทาน กัญชงสามารถใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ด้านเกษตรใช้เป็นปุ๋ย อาหารสัตว์ ด้านอุตสาหกรรมสิ่งทอ ใช้ทำเครื่องนุ่งห่ม นอกจากนี้ยังใช้ปรุงอาหาร ใช้เป็นยารักษาโรค และเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง เป็นต้น สารสำคัญที่พบในกัญชง ได้แก่ สาร Tetrahydrocannabinol (THC) ไม่เกิน 0.3% และสาร Cannabidiol (CBD) พบในปริมาณ 2% ขึ้นไป

ปลานิล (*Oreochromis niloticus* (Linn.)) เป็นปลาน้ำจืด ในวงศ์ Cichlidae พบได้ทั่วไปตามหนอง คลอง บึง และทะเลสาบ มีลักษณะคล้ายปลาหมอเทศ แต่ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล มีจุดดำต่างทั่วตัว มีลายเข้มพาดขวางลำตัว ครีบล้าง ครีบกัน และครีบท้อง มีลายหรือแนวจุดสีคล้ำพาดขวางหรือทแยงอยู่ นิยมเลี้ยงไว้เพื่อบริโภคในครัวเรือน และเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เลี้ยงง่าย โตเร็ว สามารถสร้างอาชีพ และรายได้ให้กับเกษตรกร รวมถึงเป็นสินค้าส่งออก

1.7 สมมุติฐานของการวิจัย

การใช้ใบกัญชงได้ช่อดอกเสริมในอาหารที่ระดับต่าง ๆ สามารถส่งผลต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร องค์ประกอบทางเคมีของซาก ค่าโลหิตวิทยา การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน การแสดงออกของยีน HSP70 และยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน การเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อวิทยา อีกทั้งยังส่งผลต่อจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกของปลานิลที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ 28, 32, 36 และ 40 องศาเซลเซียส

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กัญชง (Hemp)

2.1.1 ประวัติความเป็นมาของกัญชง

กัญชงมีชื่อสามัญว่า Hemp และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* เดิมทีกัญชงเป็นพืชล้มลุกที่ได้รับการจัดอยู่ในวงศ์เดียวกับพืชตระกูลตำแย (Urticaceae) แต่ในภายหลังพบว่า กัญชงมีคุณสมบัติและลักษณะเฉพาะหลายอย่างที่แตกต่างกันไปจากพืชตระกูลตำแยเป็นอย่างมาก จึงได้รับการแบ่งเป็นอีกวงศ์หนึ่งโดยเฉพาะ นั่นคือวงศ์ Cannabaceae ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์เดียวกับกัญชา (*Cannabis sativa* L. subsp. *indica*) กัญชงเป็นพืชดั้งเดิมที่มีการปลูกเพื่อใช้เส้นใยมานานนับพันปีในเอเชีย และตะวันออกกลาง สันนิษฐานว่ามีการกระจายพันธุ์อยู่ทางตอนกลางของทวีปได้แก่ พื้นที่ทางตอนใต้ของแคว้นไซบีเรีย ประเทศเปอร์เซีย ทางตอนเหนือของประเทศอินเดียบริเวณแคว้นแคชเมียร์ และทางตอนเหนือของประเทศจีน ก่อนจะกระจายไปในที่ต่าง ๆ (ประภัสสร, 2550)

2.1.2 อนุกรมวิธานของกัญชง

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Urticales

Family: Cannabaceae

Genus: *Cannabis*

Species: *sativa*

2.1.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกัญชง

กัญชง (Hemp) ประกอบด้วยส่วนหลัก 6 ส่วน ได้แก่ ราก (Root), ลำต้น (Stem), ดอก (Flower), ใบพัด (Fan leaf), ใบรองดอก (Sugar leaf), และเมล็ด (Seed)

ราก (Root) รากกัญชงเป็นระบบรากแก้ว (Tap root system) มีรากแขนงจำนวนมากทำหน้าที่ดูดซึมสารอาหารเพื่อไปหล่อเลี้ยงลำต้น ใบ และดอก

ลำต้น (Stem) ลำต้นมีลักษณะอวบน้ำเมื่อเป็นต้นกล้า และเมื่อเจริญเต็มที่ลำต้นจะมีลักษณะเป็นสันหกเหลี่ยม ตั้งตรง แข็งแรง มีสีเขียว สูงประมาณ 1-6 เมตร (ภาพ 1) ต้นเพศผู้จะมีข้อปล้องยาวกว่าต้นเพศเมีย เมื่อเจริญได้ 2-3 สัปดาห์ เริ่มมีการสร้างเนื้อไม้ทำให้ลำต้นแข็งแรงมากขึ้น ส่วนเปลือกของลำต้นสามารถลอกออก เพื่อใช้ประโยชน์จากเส้นใย โดยเปลือกนอก (Primary bast-bers) ให้เส้นใยที่ยาว เหนียว แต่ค่อนข้างหยาบ ส่วนเปลือกในที่ติดกับเนื้อไม้ให้เส้นใยที่สั้น แต่ละเอียดกว่า



ภาพ 1 ลักษณะของลำต้นกัญชง
ที่มา: ประภัสสร และคณะ (2550)

ดอก (Flower) ออกดอกเป็นช่อตามซอกใบและปลายยอด ดอกมีขนาดเล็กสีขาว มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-4 มิลลิเมตร ดอกกัญชงมีทั้งดอกเพศผู้ และเพศเมีย แต่อยู่ต่างต้นกัน โดยดอกเพศผู้จะออกก่อนดอกเพศเมีย 1-2 เดือน ดอกเพศผู้ประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 5 กลีบ แยกกันเป็นอิสระ มีสีเขียวอมเหลือง (ภาพ 2ก) และมีเกสรเพศผู้ 5 อัน ส่วนดอกเพศเมียจะเกิดตามซอกใบ และปลายยอด มีใบประดับสีเขียวเข้มหุ้มรังไข่ไว้ (ภาพ 2ข) มีเกสร (Pistil) อยู่บนส่วนปลายของกลีบเลี้ยง หรือ Calyxes ลักษณะมีขนสีส้มหรือแดงเล็ก ๆ ทำหน้าที่เก็บรวบรวมละอองเกสรของเพศผู้ มีบทบาทสำคัญในการเจริญพันธุ์ของต้นกัญชง บริเวณที่ออกดอกของต้นเพศเมียจะมีช่อดอกอัดกันแน่น เรียกว่า โคล่า (Cola) โดยโคล่าจะขึ้นใกล้ปลายกิ่งใหญ่เสมอ เนื่องจากจะทำให้แสงแดดส่องถึง และแมลงผสมเกสรได้มากที่สุด ดอกเพศเมียจะมีไตรโคม (Trichomes) อยู่จำนวนมาก



ภาพ 2 ลักษณะของดอกกัญชง ก) ดอกเพศผู้ ข) ดอกเพศเมีย

ที่มา: ลิลลี่ และคณะ (2547)

ใบพัด (Fan leaf) เป็นใบเดี่ยว ลักษณะเป็นรูปฝ่ามือ มีประมาณ 7-9 แฉก การเรียงตัวของใบค่อนข้างห่าง ใบจะแตกเป็นรูปหอก ปลายแหลม ขอบใบมีลักษณะเป็นซี่ฟันเว้าลึกจนถึงโคนใบ (ภาพ 3) ก้านใบยาว 3-8 เซนติเมตร ผิวใบด้านบนมีสีเข้มกว่าผิวใบด้านล่าง

ใบใต้ช่อดอก (Sugar leaf) เป็นใบขนาดเล็กที่เกิดอยู่ใกล้บริเวณของดอกกัญชง มักถูกปกคลุมไปด้วยตุ่มสีขาวเรียกว่า ไตรโคม (Trichomes) ลักษณะคล้ายน้ำตาลเกาะอยู่ที่ใบ จึงเรียกว่า Sugar leaf (ภาพ 3) ต่อมไตรโคม (Trichomes) มีรูปร่างคล้ายเข็ม และเป็นต่อมคริสตัลใสๆ อยู่บนยอดปกคลุมอยู่ทั่วช่อดอก ซึ่งเป็นส่วนที่ผลิตสารสำคัญอย่าง THC และ CBD รวมทั้งสาร แคนนาบินอยด์ (Cannabinoids) อื่นๆ ซึ่งเป็นส่วนที่มีความสำคัญมาก ไตรโคมเป็นส่วนที่ส่งผลเรื่องกลิ่นและรสชาติ และยังมีมากสารที่ได้จะมากตามไปด้วย โดยในกระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิตเกษตรกรจะตัดแต่งช่อดอก โดยตัดส่วนที่ไม่ต้องการทิ้ง เช่น ใบใต้ช่อดอก (Sugar leaf) ที่ปกคลุมช่อดอกอยู่ ซึ่ง Sugar leaf จะมีปริมาณแคนนาบินอยด์ (Cannabinoids) น้อยกว่าเมื่อเทียบกับช่อดอก (Das et al., 2022)



ภาพ 3 ลักษณะของใบ และช่อดอกกัญชง

ที่มา: ดัดแปลงจาก Deonne (2020)

เมล็ด (Seed) เมล็ดกัญชงมีขนาด 3-4 เซนติเมตร มีน้ำหนักเฉลี่ย 8-24 กรัมต่อ 1000 เมล็ด รูปร่างคล้ายลูกรักบี้ ผิวเรียบเป็นมัน มีลายประสีน้ำตาล (ภาพ 4) เมื่อแห้งจะเป็นสีเทา ผลจะแห้ง และสุกในระยะเวลาประมาณ 1-2 เดือน เมล็ดกัญชงมีขนาดกว้างเฉลี่ยประมาณ 4.47 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 5.11 มิลลิเมตร และมีความหนาเฉลี่ยประมาณ 3.75 มิลลิเมตร ภายในเมล็ดมีอาหารสะสมจำพวกแป้ง และไขมันอัดกันแน่น โดยมีน้ำมันถึงร้อยละ 29-34 มีไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acids) สูง ประกอบด้วย Linoleic acid ร้อยละ 54-60, Linolenic acid ร้อยละ 15-20 และ Oleic acid ร้อยละ 11-13 (เมตไทย, 2563)



ภาพ 4 ลักษณะของเมล็ดกัญชง
ที่มา: เมตไทย (2563)

2.1.4 ความแตกต่างระหว่างกัญชง (Hemp) และกัญชา (Marijuana)

กัญชง (Hemp) เป็นพืชที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกัญชา (Marijuana) มาก เนื่องจากจัดอยู่ในวงศ์เดียวกัน ดังนั้นลักษณะภายนอก หรือสัณฐานวิทยาของพืชทั้งสองชนิด จึงมีความแตกต่างกันน้อย จนบางครั้งยากต่อการจำแนกชนิด และทำให้เกิดความสับสนได้ แต่ในความเป็นจริงแล้วพืชทั้งสองชนิดมีลักษณะที่ค่อนข้างแตกต่างกันหลายประการ การจำแนกกัญชง และกัญชาออกจากกันสามารถแบ่งได้ตามลักษณะสัณฐานวิทยา และพฤกษเคมี ดังนี้

กัญชง (Hemp) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* เป็นพืชล้มลุกอายุสั้นเพียงปีเดียว มีลักษณะภายนอก คือ มีลำต้นสูงมากกว่า 2 เมตร มีข้อปล้องยาวโดยแตกกิ่งก้านน้อย และไปในทิศทางเดียวกัน เปลือกเหนียวลอกง่าย และให้เส้นใยที่มีคุณภาพสูง เมล็ดมีขนาดใหญ่ ผิวหยาบด้าน มีลายเล็กน้อย ดอกจะมียางที่ช่อดอกน้อย ออกดอกเมื่ออายุมากกว่า 4 เดือน ใบมีลักษณะใหญ่ การเรียงตัวของใบค่อนข้างห่าง แผ่นใบมีแฉกประมาณ 7-9 แฉก แผ่นใบมีสีเขียวอมเหลือง เมื่อนำใบมาสูบจะมีกลิ่นหอมน้อย และทำให้ผู้เสพมีอาการปวดศีรษะเนื่องจากมีสาร Tetrahydrocannabinol (THC) น้อยกว่า 0.3% นอกจากนี้ยังมีสาร Canabidiol (CBD) ในปริมาณ

2% ขึ้นไป (ปาริชาติ, 2562) การปลูกกัญชาระยะห่างระหว่างต้นจะแคบ เนื่องจากปลูกเพื่อต้องการเส้นใยเพียงอย่างเดียว

กัญชา (Marijuana) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. subsp. *indica* มีลักษณะภายนอก คือ มีลำต้นสูงไม่เกิน 2 เมตร มีข้อปล้องสั้น ท่อลำเลียงน้ำมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่ากัญชง แตกกิ่งก้านมาก และออกกิ่งแบบสลับไปมา เปลือกไม้เหนียว และลอกยาก ขาดง่าย เส้นใยจะสั้น และมีคุณภาพต่ำ เมล็ดมีขนาดเล็ก ผิวเมล็ดมันวาว เมื่อออกดอกมียางที่ช่อมาก ออกดอกเมื่ออายุประมาณ 3 เดือน ดอกของกัญชง และกัญชามีขนาด และสีไม่แตกต่างกันทั้งดอกเพศผู้ และดอกเพศเมีย ใบมีลักษณะเล็กกว่ากัญชง การเรียงตัวของใบจะชิดกัน แผ่นใบมีสีเขียวเข้ม มีแฉกประมาณ 5-7 แฉก เมื่อนำใบมาสูบจะมีกลิ่นหอมคล้ายหญ้าแห้ง ทำให้เกิดอาการเคลิ้ม เนื่องจากมีปริมาณสาร Tetrahydrocannabinol (THC) มากกว่ากัญชงประมาณ 1-10% ส่วนสาร Canabidiol (CBD) พบในปริมาณไม่เกิน 2% (ปาริชาติ, 2562) การปลูกกัญชงจะมีระยะห่างระหว่างต้นกว้าง เนื่องจากปลูกเพื่อต้องการใบ ทั้งนี้มีข้อสังเกตความแตกต่างระหว่างกัญชง และกัญชาดังภาพ 5 และตาราง 1



ภาพ 5 ความแตกต่างระหว่างกัญชง (Hemp) และกัญชา (Marijuana)

ที่มา: Mc Partland (2018)

ตาราง 1 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกัญชง (Hemp) และกัญชา (Marijuana)

กัญชง (Hemp)	กัญชา (Marijuana)
ชื่อวิทยาศาสตร์ <i>Cannabis sativa</i> L. subsp. <i>sativa</i>	ชื่อวิทยาศาสตร์ <i>Cannabis sativa</i> L. subsp. <i>indica</i>
ราก เป็นระบบรากแก้ว มีรากแขนงจำนวนมาก	ราก เป็นระบบรากแก้ว มีรากแขนงจำนวนมาก
ใบ มีแฉกประมาณ 7-9 แฉก มีสีเขียวอมเหลือง การเรียงตัวของใบค่อนข้างห่างกัน และมีทรงพุ่มโปร่ง	ใบ มีแฉกประมาณ 5-7 แฉก มีสีเขียวถึงเขียวจัด ใบหนากว้าง เรียงตัวชิดกัน และมีทรงพุ่มแน่นทึบ
ปล้องหรือข้อยาว	ปล้องหรือข้อสั้น
ดอก ออกดอกเมื่ออายุมากกว่า 4 เดือน เมื่อออกดอกมียางที่ขี้ไม่มาก	ดอก ออกดอกเมื่ออายุประมาณ 3 เดือน เมื่อออกดอกมียางที่ขี้มาก
เปลือก เหนียว ลอกง่าย	เปลือก ไม่เหนียว ลอกยาก
ลำต้น สูงมากกว่า 2 เมตร	ลำต้น สูงไม่เกิน 2 เมตร
เส้นใย ให้เส้นใยยาว มีคุณภาพสูง ให้เส้นใยประมาณ 35%	เส้นใย ให้เส้นใยสั้น คุณภาพต่ำ ให้เส้นใยประมาณ 15%
กิ่งก้าน แตกกิ่งก้านน้อยกว่ากัญชา และไปในทิศทางเดียวกัน	กิ่งก้าน แตกกิ่งก้านมาก และออกกิ่งแบบสลับไปมา
เมล็ด มีขนาดใหญ่ ผิวหยาบด้าน มีลาย	เมล็ด มีขนาดเล็ก และผิวมันวาว มีลาย
ใบ นำมาสูบจะมีกลิ่นหอมน้อย และทำให้ผู้เสพมีอาการปวดศีรษะ	ใบ นำมาสูบบมีกลิ่นหอมคล้ายหญ้าแห้ง ทำให้เกิดอาการเคลิ้ม มีฤทธิ์หลอนประสาท
สารสำคัญ มีสาร Tetrahydrocannabinol หรือ THC ไม่เกิน 0.3% และสาร Cannabidiol หรือ CBD สูงกว่ากัญชา พบในปริมาณ 2% ขึ้นไป	สารสำคัญ มีสาร Tetrahydrocannabinol หรือ THC ประมาณ 1-10% และสาร Cannabidiol หรือ CBD ต่ำกว่ากัญชง พบในปริมาณไม่เกิน 2%

ที่มา: ปาริชาติ (2562)

2.1.5 การใช้ประโยชน์จากใบกัญชง

การใช้ประโยชน์จากใบกัญชงนิยมนำมาใช้ 2 ลักษณะคือ การใช้ประโยชน์จากใบโดยตรง และการใช้ประโยชน์จากสารสกัดที่ได้จากใบกัญชง เนื่องจากใบกัญชงมีสารสกัดที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น สาร Cannabidiol (CBD) สาร Cannabichromene (CBC) มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ลด

อาการปวด และมีฤทธิ์ด้านเชื้อจุลชีพและเชื้อรา สาร Cannabinol (CBN) นำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ สารให้กลิ่นเทอร์พีน (Terpene) เป็นสารประกอบอะโรมาติก (Aromatic) เป็นน้ำมันหอมระเหยสกัดที่มีในกัญชา และกัญชง เป็นสารที่ทำให้มีกลิ่นเฉพาะตัว นอกจากนี้ใบกัญชงยังอุดมไปด้วยฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Jie et al, 2018) ฟลาโวนอยด์ยังสามารถนำมาผสมในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพได้ โดยเฉพาะอาหารซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพ ประโยชน์ทางยา ป้องกันโรค รักษาโรค และชะลอความชรา

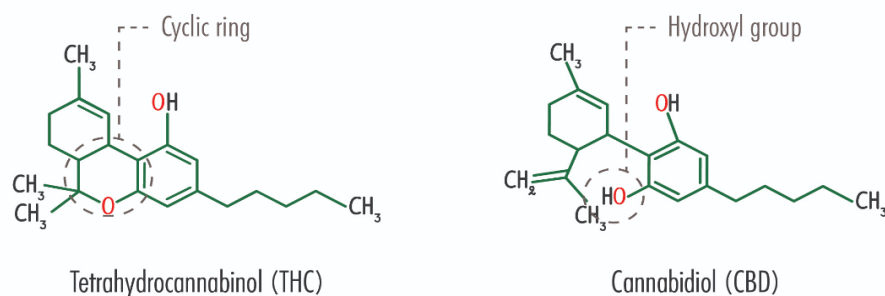
2.1.6 สารสำคัญในกัญชง

กัญชงมีสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) มากกว่า 500 ชนิด โดยแบ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มแคนนาบินอยด์ (Cannabinoids) 125 ชนิด และสารประกอบอื่น ๆ ที่ไม่ใช่แคนนาบินอยด์ (Non-cannabinoids) เช่น ฟีนอล อัลคาลอยด์ เทอร์พีน และฟลาโวนอยด์ (Radwan et al., 2021) ใบกัญชงที่มีสารแคนนาบินอยด์ ฟลาโวนอยด์ ฟีนอล ซาโปนิน และอัลคาลอยด์ในระดับสูง สามารถเป็นแหล่งที่มีศักยภาพสำหรับการพัฒนาวัตถุดิบอาหารสัตว์ เช่นเดียวกับโภชนเภสัช เครื่องสำอาง และเภสัชภัณฑ์สำหรับมนุษย์ (Liu et al., 2022)

สารประกอบในกลุ่มแคนนาบินอยด์ (Cannabinoids) ที่สำคัญประกอบด้วยสารหลายชนิด ซึ่งมีสารสำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ Tetrahydrocannabinol (THC) และ Canabidiol (CBD) ซึ่งในกัญชงมีสาร THC ไม่เกิน 0.3% และมีปริมาณ THC ต่ำกว่า CBD ในขณะที่ในกัญชามีสาร THC สูงถึง 1-10% และมีปริมาณ THC สูงกว่า CBD (ประภัศร, 2550) สารประกอบในกลุ่มแคนนาบินอยด์ (Cannabinoids) จะสะสมอยู่ในต่อมที่เรียกว่า ไตรโคม (Trichomes) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดขึ้นในช่อดอกตัวเมียซึ่งถูกขับออกมาในรูปเรซิน หรือสารเหนียว (Malomo & Aluko, 2015) นอกจากนี้สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ยังตรวจพบในเมล็ด ราก ฝัก และใบ โดยในใบตรวจพบปริมาณสาร Canabidiol (CBD) ประมาณ 2% (Andre et al., 2016) (ตาราง 2) นอกจากนี้ยังมีสารที่พบในรากและเมล็ด เช่น โพลีฟีนอล ฟอสโฟลิปิด ซัลโฟลิปิด โปรแอนโธไซยานิน เทอร์พีน และไฟโตสเตอรอล เป็นต้น (Antonelli et al., 2020; Rodriguez-Leyva et al., 2010)

Tetrahydrocannabinol (THC) มีสูตรเคมี $C_{21}H_{30}O_2$ (ภาพ 6) มีลักษณะเป็นน้ำมันหนืด (Viscous oil) ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในน้ำมัน แอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม และอะซีโตน ถูกทำลายด้วยความร้อน (Pyrolysis) เป็นสารที่มีฤทธิ์ต่อระบบประสาท

Canabidiol (CBD) มีสูตรเคมี $C_{21}H_{30}O_2$ (ภาพ 6) มีลักษณะเป็นผลึก หรือเรซิน (resin) สีเหลืองอ่อน ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในเมทานอล เอทานอล และคลอโรฟอร์ม



ภาพ 6 โครงสร้างของ Tetrahydrocannabinol (THC) และ Cannabidiol (CBD)

ที่มา: Rudd (2022)

CBD ไม่จัดเป็นยาเสพติด เป็นสารประกอบที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท (Non-psychoactive) ไม่ทำให้เกิดการมึนเมา ทำให้ผู้ใช้มีอาการที่สงบลง โดยออกฤทธิ์เพื่อการคลายเครียด ปกป้องเซลล์ประสาท ด้านชัก แก้ปวด ฤทธิ์ต้านเนื้องอก ด้านฤทธิ์ต่อจิตประสาท และ CBD ไม่ทำให้เกิดการติดหรือติดยา สามารถใช้ประโยชน์ได้หลากหลายทั้งเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพร ยา และอาหาร ใช้ในการรักษาอาการนอนไม่หลับ สามารถลดอาการเครียด ลดการอักเสบได้ (ปวีณา, 2562) ในขณะที่ THC จัดเป็นสารเสพติดประเภทที่ 1 เป็นสารที่มีผลต่อระบบประสาท (Psychoactive) ทำให้เกิดอาการมึนเมา สารสำคัญ THC และ CBD พบมากที่สุดในส่วนของช่อดอกกัญชง (กรกนก และคณะ, 2563) ส่วนในใบกัญชงมีรายงานถึงปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ดังตารางที่ 2

ตาราง 2 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในใบกัญชง (Bioactive compounds)

พืช	<i>Cannabis sativa</i> (Hemp Leaf)	<i>Cannabis sativa</i> (Leaf)	<i>Cannabis sativa</i> (Leaf)
สาร	% w/w	%	% d.w.
CBD	0.55±0.02	-	2.0
CBDA	0.09±0.00	-	-
THC	-	0.03-0.06	0.2
THCA	-	0.62-1.01	-
CBG	-	-	0.2
Terpenoids	-	0.13-0.28	-
Flavonoids	-	0.34-0.44	-
ที่มา	(กรกนก และคณะ, 2563)	(Jin et al., 2020)	(Andre et al., 2016)

เนื่องจากยังไม่พบการรายงานเกี่ยวกับการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการในใบกัญชง มีเพียงการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการในใบกัญชา สรุปได้ดังตาราง 3

ตาราง 3 คุณค่าทางโภชนาการ ในส่วนต่าง ๆ ของกัญชา

พืช	<i>Cannabis sativa</i>	<i>Cannabis indica</i>	<i>Cannabis indica</i>	<i>Cannabis sativa</i> (Marijuana Leaf)
สารอาหาร	(Whole plant)	(Leaf)	(Leaf)	
% โปรตีน	0.76±0.35	8.63 ± 0.69	5.57	23.78
% ไขมัน	11.17±1.14	5.81 ± 0.84	0.90	19.97
% เถ้า	5.5±0.49	10.67 ± 0.68	-	11.18
% ความชื้น	04.33±0.58	8.46 ± 0.92	77	6.87
% เยื่อใย	16.87±0.35	13.49 ± 0.77	-	18.95
Total sugar	03.40±0.17	-	-	-
NFE	-	-	-	19.25
Energy	-	-	30 kcal	-
ที่มา	(Waris et al., 2018)	(Ishaq et al., 2015)	(ภัทธีรา และคณะ, 2565)	(Audu et al., 2014)

2.2 ปลานิล (Nile tilapia)

2.2.1 อนุกรมวิธานปลานิล

Kingdom: Animalia

Phylum: Vertebrata

Subphylum: Vertebrata

Superclass: Gnathostomata

Class: Actinopterygii

Order: Perciformes

Suborder: Labbroidei

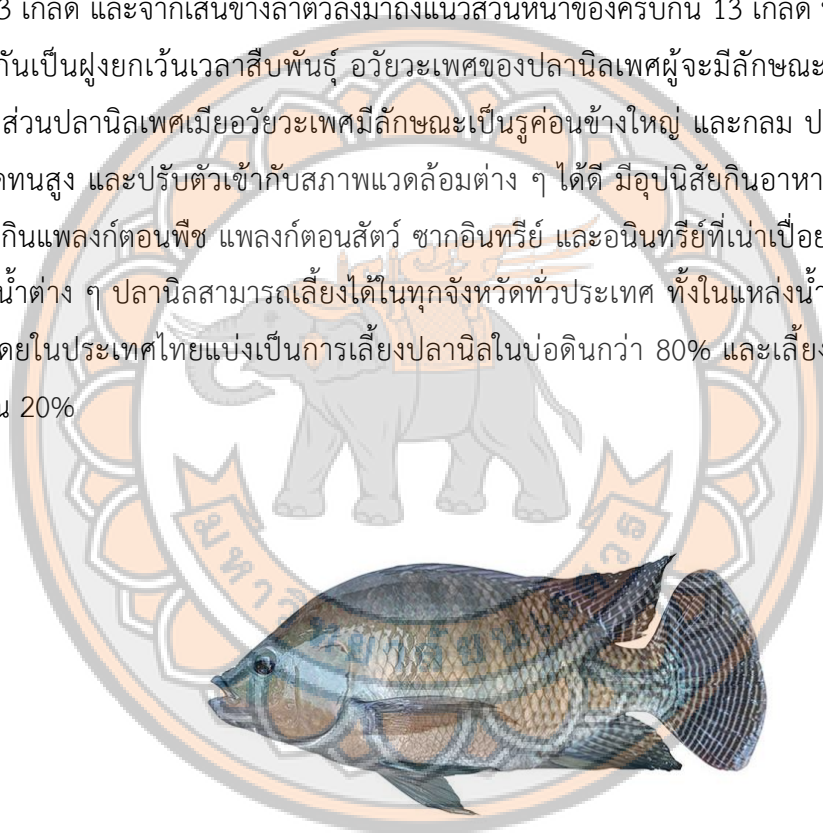
Family: Cichlidae

Genus: *Oreochromis*

Species: *niloticus*

2.2.2 ชีวิตวิทยาของปลานิล

ปลานิล มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* (Linn.) และชื่อสามัญคือ Nile tilapia เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในวงศ์ Cichilidae มีถิ่นกำเนิดมาจากทวีปแอฟริกา พบได้ทั่วไปตามหนอง คลอง บึง และทะเลสาบ มีรูปร่างลักษณะคล้ายกับปลาหมอเทศ ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล และมีลายสีดำพาดขวาง 9-10 แถบ (ภาพ 7) โดยทั่วไปมีความยาวประมาณ 20-25 เซนติเมตร ริมฝีปากบน และล่างเสมอกัน ที่กระดุกแก้มมีจุดสีเข้มอยู่ 1 จุด มีครีบหลัง 1 ครีบ ประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 15-18 อัน และก้านครีบอ่อน 12-14 อัน บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว มีเกล็ดตามแนวเส้นข้างลำตัว 33 เกล็ด และจากเส้นข้างลำตัวลงมาถึงแนวส่วนหน้าของครีบกัน 13 เกล็ด ปลานิลมีนิสัยชอบอยู่รวมกันเป็นฝูงยกเว้นเวลาสืบพันธุ์ อวัยวะเพศของปลานิลเพศผู้จะมีลักษณะเพศเรียวยาว ยื่นออกมา ส่วนปลานิลเพศเมียอวัยวะเพศมีลักษณะเป็นรูค่อนข้างใหญ่ และกลม ปลานิลเป็นปลาที่มีความอดทนสูง และปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี มีอุปนิสัยกินอาหารทั้งพืช และสัตว์ สามารถกินแพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ ซากอินทรีย์ และอินทรีย์ที่เน่าเปื่อย รวมทั้งจุลินทรีย์ และพืชต่าง ๆ ปลานิลสามารถเลี้ยงได้ในทุกจังหวัดทั่วประเทศ ทั้งในแหล่งน้ำจืด และแหล่งน้ำกร่อย โดยในประเทศไทยแบ่งเป็นการเลี้ยงปลานิลในบ่อดินกว่า 80% และเลี้ยงปลานิลในกระชังประมาณ 20%



ภาพ 7 ลักษณะภายนอกของปลานิล

ที่มา: Ruby (2021)

2.2.3 การเพาะเลี้ยงปลานิล

ปลานิลเป็นปลาเศรษฐกิจที่นิยมเลี้ยง และนำมาบริโภคกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว ปลานิลเป็นปลาเนื้อขาว มีรสชาติดี ปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมได้ดี และทนทานต่อโรค การเพาะเลี้ยงปลานิลให้ได้ผลดี และมีคุณภาพต้องคำนึงถึงการปฏิบัติด้านต่าง ๆ ตั้งแต่ขั้นตอนการเลือกพ่อแม่พันธุ์ การตรวจสอบลูกปลา และการอนุบาลลูกปลา สำหรับรูปแบบการเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยมี 3 รูปแบบ ได้แก่ การเลี้ยงในบ่อดิน บ่อปูน และในกระชัง (นฤชยา, 2553) อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลานิลต้องคำนึงถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ ดังนี้

1) การจัดการฟาร์ม ในระหว่างการเลี้ยงเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาต้องหมั่นทำความสะอาดกระชัง หรือบ่อเลี้ยง รวมถึงควรทำความสะอาดบริเวณรอบ ๆ ที่วางกระชัง เช่น เก็บเศษขยะ หรือเศษไม้ที่ไหลมาติดบริเวณกระชังอย่างสม่ำเสมอ

2) คุณภาพน้ำ ควรมีการเฝ้าระวังและดูแลคุณภาพสัตว์น้ำที่เลี้ยงควบคู่กับการตรวจคุณภาพน้ำ และสังเกตสภาพแวดล้อมภายนอกกระชังอยู่เป็นประจำ เช่น สีน้ำ ความขุ่น และอัตราการไหลของน้ำ หมั่นสูบน้ำตรวจสัตว์น้ำที่เลี้ยงเป็นระยะ หรือสังเกตสัตว์น้ำที่มีอาการผิดปกติ เช่น ลอยหัว ว่ายน้ำ เสียการทรงตัว กินอาหารลดลง เพื่อว่าหากสัตว์น้ำมีความผิดปกติจะได้หาสาเหตุและแก้ไขได้ทันท่วงที

3) อาหาร ควรมีคุณค่าทางโภชนาการที่เหมาะสม และเพียงพอต่อความต้องการของสัตว์น้ำ

4) โรค และศัตรูปลา ควรมีการเฝ้าระวังการเกิดโรคปรสิต แบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัสในปลาอย่างต่อเนื่อง ในกรณีที่สัตว์น้ำป่วย ต้องเร่งดำเนินการตรวจวินิจฉัย และรักษาโรค ควรทำความสะอาด และฆ่าเชื้ออุปกรณ์ เช่น กระชัง แห อวน สวิง ยอ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนผ่านอุปกรณ์ที่สัมผัสกับสัตว์น้ำที่เป็นโรคลงสู่บ่อเลี้ยงข้างเคียง

5) ความหนาแน่นในการเลี้ยงยังมีผลต่อการเจริญเติบโตของปลา ซึ่งความหนาแน่นในการเลี้ยงลูกปลานิลอายุ 1 เดือนที่เหมาะสมอยู่ที่ 100 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร (พิเชต, 2562)

2.2.4 ความต้องการสารอาหารของปลานิล

การเลี้ยงปลานิลให้เจริญเติบโตอย่างมีประสิทธิภาพนั้นจำเป็นต้องมีการจัดการเกี่ยวกับสารอาหาร และวิธีการให้อาหารที่เหมาะสม โดยความต้องการสารอาหารของปลาขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น สายพันธุ์ อายุของปลา ขนาดของปลา และคุณภาพน้ำ เป็นต้น จากรายงานของพิเชต (2559) กล่าวว่า อาหารปลานิลควรมีระดับโปรตีน 25-45% ไขมัน 5-12% และคาร์โบไฮเดรต 20-50% (ตาราง 4) นอกจากสารอาหารแล้ว วิธีการให้อาหารยังมีความสำคัญโดยควรให้อาหารปลานิลอย่างน้อย 2 ครั้งต่อวัน และแต่ละมื้อมีระยะห่างประมาณ 4-5 ชั่วโมง นอกจากนี้

Jauncey (1998) รายงานว่าระดับโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับปลานิลขนาด 0.5, 0.5-10, 1-30 และ 30 กรัมขึ้นไป ควรมีค่าเท่ากับ 40-45, 30-35, 25-30 และ 25-30% ตามลำดับ

ตาราง 4 ความต้องการสารอาหารของปลานิล

สารอาหาร	เปอร์เซ็นต์
โปรตีน	25 - 45
ไขมัน	5 - 12
คาร์โบไฮเดรต	20 - 50

ที่มา: พิเชต (2559)

2.2.5 สถานการณ์ทางการตลาดปลานิล

สถานการณ์การเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยพบว่า ในปี 2563 มีผลผลิตปลานิล ปริมาณ 205,971 ตัน ในเนื้อที่เลี้ยง 437,811 ไร่ เมื่อเทียบกับปี 2562 พบว่าผลผลิตลดลง 3.7% เนื้อที่เลี้ยงลดลง 1.8% โดยสาเหตุที่ผลผลิตปลานิลของไทยในปี 2563 ลดลง เนื่องจากสถานการณ์ภัยแล้ง ส่งผลให้ปริมาณน้ำในเขื่อน และแหล่งน้ำตามธรรมชาติไม่เพียงพอต่อการเลี้ยงปลาชนิดดังกล่าว เกษตรกรจึงจำเป็นต้องชะลอการเลี้ยง ลดรอบการเลี้ยง หรือลดอัตราการปล่อยลูกพันธุ์ลงบ่อเลี้ยง ส่งผลให้ผลผลิตภาพรวมทั้งประเทศลดลง ส่วนในปี 2564 มีผลผลิตปลานิล ปริมาณ 210,419 ตัน เพิ่มขึ้น 2.2% เมื่อเทียบกับปี 2563 (ตาราง 5) เนื่องจากปี 2564 ปริมาณน้ำมีเพียงพอสำหรับการเลี้ยงในรอบปี ปริมาณฝนที่ตกทั่วถึงทุก ๆ พื้นที่ นอกจากนี้ เกษตรกรมีการอนุบาลลูกปลาให้ได้ขนาดใหญ่ก่อนปล่อยลงบ่อเลี้ยง เพื่อเพิ่มอัตราการรอด รวมทั้งเพิ่มอัตราการปล่อยลูกพันธุ์ ส่งผลให้ผลผลิตต่อไร่ และผลผลิตปลานิลในปี 2564 เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับปี 2563 (กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ, 2564) สำหรับปี 2565 คาดว่าจะมีผลผลิตเพิ่มขึ้น 4.7% เป็น 220,374 ตัน เนื่องจากมีปริมาณน้ำเพียงพอสำหรับการเลี้ยง ประกอบกับราคาปลานิลปรับตัวสูงขึ้น (กองนโยบาย และแผนพัฒนาการประมง กลุ่มเศรษฐกิจการประมง, 2565) เนื่องจากปลานิลมีความต้องการทางตลาดสูง ดังนั้นเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการบริโภคของมนุษย์ เกษตรกรมักเลี้ยงปลาด้วยความหนาแน่นสูง ซึ่งการเลี้ยงด้วยรูปแบบดังกล่าวทำให้สัตว์น้ำเกิดความเครียดจากความหนาแน่นที่มากเกินไป และความเครียดจากอุณหภูมิที่สูง ทำให้มีโอกาสเกิดโรคได้มากขึ้น ภูมิคุ้มกันของปลาต่ำลง จึงส่งผลให้ผลผลิตที่ได้ลดลง และไม่ได้ตามความต้องการของตลาด

ตาราง 5 ปริมาณผลผลิตปลานิล และเนื้อที่เลี้ยงของประเทศไทย ปี 2559-2564

	ปี 2559	ปี 2560	ปี 2561	ปี 2562	ปี 2563	ปี 2564
ผลผลิต (ตัน)	200,764	211,929	216,620	213,872	205,971	210,419
เนื้อที่เลี้ยง (ไร่)	427,440	444,502	447,016	445,779	437,811	-

ที่มา: คัดแปลงจาก กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ (2564)

2.3 โลหิตวิทยาของปลา (Fish hematology)

การวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาสามารถใช้ประเมินสุขภาพของปลา วินิจฉัยโรค รวมถึงพัฒนาด้านการเลี้ยง และการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม ค่าโลหิตวิทยาของปลาแต่ละชนิดแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับอายุ ขนาด พันธุกรรม สุขภาพ สิ่งแวดล้อม ภาวะโภชนาการ และระบบการเลี้ยง (นภดล, 2555) เลือดปลาส่วนใหญ่มีส่วนประกอบเหมือนกับสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไป ประกอบด้วยส่วนที่เป็นของเหลวได้แก่ น้ำเลือด หรือพลาสมา (Plasma) และส่วนที่เป็นเซลล์ ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดแดง (Red blood cell) เซลล์เม็ดเลือดขาว (White blood cell) และเกล็ดเลือด (Blood platets)

2.3.1 น้ำเลือด หรือพลาสมา (Plasma)

น้ำเลือด หรือพลาสมา เป็นส่วนประกอบของเลือดที่เป็นของเหลว โดยปกติจะมีลักษณะเป็นสีเหลืองใสประกอบไปด้วยโปรตีน (Plasma proteins) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของสิ่งที่อยู่ในน้ำเลือดที่มีมากที่สุด ได้แก่ อัลบูมิน (Albumin) นอกจากนี้ยังมีไนโตรเจน (Non-proteins nitrogen) เกลือแร่ (Electrolytes) สารอาหารที่ย่อยแล้ว ของเสีย เอนไซม์ แอนติบอดี แก๊ส น้ำเหลือง และฮอร์โมนละลายอยู่ หน้าที่ของน้ำเลือด คือ ลำเลียงเอนไซม์ ฮอร์โมน แก๊ส แร่ธาตุ วิตามิน และสารอาหารประเภทต่าง ๆ ที่ผ่านการย่อยอาหารมาแล้วไปให้เซลล์ และรับของเสียจากเซลล์ เช่น ยูเรีย แอมโมเนีย คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ ส่งไปกำจัดออกจากร่างกายต่อไป

2.3.2 เซลล์เม็ดเลือดแดง (Red blood cells หรือ Erythrocytes)

เซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นกลุ่มที่พบมากที่สุดในบรรดาเม็ดเลือดอื่น ๆ มีรูปร่างกลมรี (Oval) มีลักษณะบวมตรงกลางคล้ายโดนัทแต่ไม่มีรู (ภาพ 8) และมีสีแดง เนื่องจากภายในมีสารสีแดง คือ ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) เซลล์เม็ดเลือดแดงทำหน้าที่ลำเลียงออกซิเจนส่งไปยังเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกายโดยอาศัยฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) เป็นตัวนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ต่าง ๆ และพา คาร์บอนไดออกไซด์ออกมาจากเซลล์เพื่อกำจัดออกจากร่างกายต่อไป เม็ดเลือดแดงเป็นเซลล์ที่ไม่มี

นิวเคลียสจึงทำให้ภายในเซลล์มีที่ว่างเหลือสำหรับการเพิ่มปริมาณฮีโมโกลบิน ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงสามารถขนส่งออกซิเจนได้มากขึ้น ปริมาณของเม็ดเลือดแดงจะแตกต่างกันไปในปลาแต่ละชนิด และยังสัมพันธ์กับความเครียด และปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ โดยทั่วไปปริมาณเม็ดเลือดแดงของปลาอยู่ในช่วง $1.50 - 3.0 \times 10^6 \text{ cells/mm}^3$ จำนวนของเม็ดเลือดแดงขึ้นอยู่กับชนิดของปลา เช่น ปลาที่ว่ายน้ำเร็วจะมีเม็ดเลือดแดงมากกว่าปลาที่ว่ายน้ำช้า เช่น ปลาอินทรีมีเม็ดเลือดแดง 3 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ปลาทองมีเม็ดเลือดแดง 1.4 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร (กรกมล, 2557)



ภาพ 8 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดแดง

ที่มา: Dutta (2022)

- ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) เป็นองค์ประกอบหนึ่งของเลือด เป็นโปรตีนสำคัญในเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบินทำหน้าที่ลำเลียงก๊าซออกซิเจนจากเหงือก หรือปอดไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ และนำผลผลิตจากเมแทบอลิซึม เช่น CO_2 และโปรตอนจากเนื้อเยื่อกลับสู่เหงือก หรือปอด
- ฮีมาโตคริต (Hematocrit, Hct) คือ ค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น เป็นค่าที่สอดคล้องกับค่าฮีโมโกลบิน ซึ่งมีประโยชน์ในการบอกถึงความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง ถ้ามีน้อยบ่งบอกถึงภาวะโลหิตจาง ภาวะเลือดข้น หรือการขาดน้ำ

2.3.3 เซลล์เม็ดเลือดขาว (White blood cells หรือ Leukocytes)

เซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียส ไม่มีฮีโมโกลบิน ไม่มีสี ส่วนใหญ่มีรูปร่างไม่ทรงกลม มีการเคลื่อนไหวคล้ายอะมีบา เป็นเม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำหน้าที่ในการทำลายเชื้อโรคที่แปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดขาวสามารถจำแนกออกเป็นกลุ่มที่มีนิวเคลียสหลายรูปร่าง (Polymorphonuclear cells) ดังนี้ (ภาพ 9)

1. โมโนไซต์ และมาโครฟาจ (Monocyte and Macrophage) เป็นเม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใหญ่ที่สุด และมีนิวเคลียสเดี่ยว (Mononuclear cells) และไม่มีแกรนูล (agranulocytes)

หน้าที่สำคัญของโมโนไซต์คือกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) โดยเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ หลังจากทีโมโนไซต์อยู่ในกระแสเลือดระยะหนึ่งแล้วจะเคลื่อนที่ไปสู่เนื้อเยื่อในอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย และเปลี่ยนไปเป็นมาโครฟาจ (Macrophage) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น มีรูปร่างไม่แน่นอน มีประสิทธิภาพในการจับกินเชื้อโรค หรือสิ่งแปลกปลอมได้ดี

2. ลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวขนาดเล็กที่พบมากที่สุดในบรรดากลุ่มเม็ดเลือดขาว มีนิวเคลียสรูปทรงกลม ขนาดใหญ่ ไม่แบ่งเป็นพู มีหน้าที่สำคัญในการกำจัดเชื้อไวรัส และเชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่มารุกราน รวมทั้งเซลล์ของร่างกายที่มีการกลายพันธุ์ ลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่ B-cell, T-cell และ Natural killer cell

3. นิวโทรฟิล (Neutrophils) เป็นเซลล์ที่พบมากที่สุดเป็นอันดับสองรองลงมาจากลิมโฟไซต์ ลักษณะของเซลล์มีรูปร่างกลม มีนิวเคลียสหลายพู มีแกรนูลขนาดเล็กรูปร่างเป็นแท่ง มีไซโตพลาสซึมที่ชัดเจน นิวโทรฟิล (Neutrophils) มีหน้าที่หลักคือจับกินจุลินทรีย์โดยกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) มีความจำเพาะต่อการต่อสู้กับแบคทีเรีย และเชื้อรา โดยนิวโทรฟิลจะย่อยสิ่งแปลกปลอมโดยการปล่อยสารในแกรนูลออกมาย่อยสลายแบคทีเรีย หรือเชื้อรา จากนั้นนิวโทรฟิลก็จะตายไปด้วยกลายเป็นเซลล์หนอง (Pus cells) ในน้ำหนองของบาดแผลเปื่อย

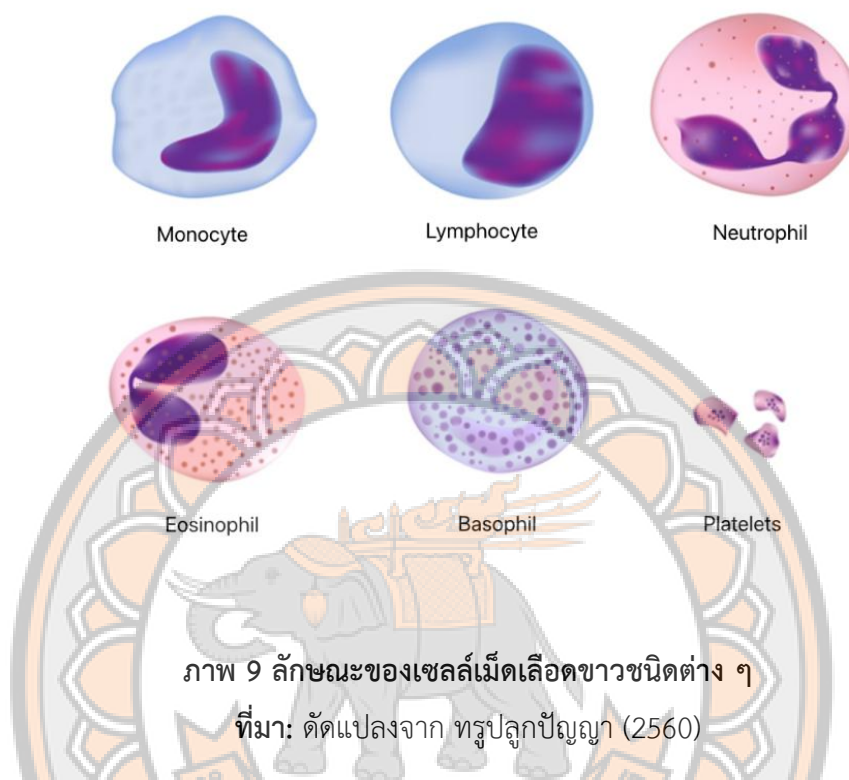
4. อีโอซิโนฟิล (Eosinophils) เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กที่สุดในบรรดากลุ่มเม็ดเลือดขาว มีนิวเคลียสหลายพู มีขนาดเล็กกว่านิวโทรฟิล มีแกรนูลรูปร่างกลมจำนวนมาก แกรนูลย้อมติดสีแดง อีโอซิโนฟิล (Eosinophils) มีความจำเพาะกับการต่อสู้กับปรสิต ทำหน้าที่เกี่ยวกับการทำลาย Histamine หรือทำลายเนื้อเยื่อ และทำลายสารที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้ ซึ่งหากปล่อยทิ้งไว้จะก่อให้เกิดอาการอักเสบ เช่น สารจากตัวอ่อน (Larva) ของพยาธิตัวกลม สารจากยาบางชนิด สารก่อภูมิแพ้จากมะเร็งบางชนิด อีโอซิโนฟิลมีความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) ได้เช่นเดียวกับนิวโทรฟิลแต่ประสิทธิภาพต่ำกว่ามาก

5. บาโซฟิล (Basophils) มีแกรนูลรูปร่างกลมย้อมติดสีน้ำเงิน และมีขนาดใหญ่ บาโซฟิล มีหน้าที่ป้องกันการเกิดอาการภูมิแพ้ กล่าวคือจะควบคุมร่างกายที่จะหลั่งสารฮิสตามีน (histamine) อันเป็นปฏิกิริยาซึ่งเกิดจากการรับสารก่อภูมิแพ้ เช่น ฝุ่น เกสรดอกไม้

2.3.4 เกล็ดเลือด หรือ thrombocyte (Platelet or Thrombocyte)

หน้าที่ของเกล็ดเลือดคือ รักษาสมดุลภายในหลอดเลือด (Hemostasis) เมื่อเกิดบาดแผล จะช่วยให้เลือดที่ไหลออกมาเกิดการแข็งตัว โดยผลิตเอนไซม์ thromboplastin (Thromboplastin) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เลือดแข็งตัว เป็นการห้ามเลือดไม่ให้ไหลพ่นออกจากร่างกายมากเกินไป โดยเกล็ดเลือดจะไปทำปฏิกิริยากับสารในพลาสมาจับกันเป็นร่างแห เม็ดเลือดจะมาติดร่างแหเกิดก้อนแข็งขึ้น

อุดรูบาดแผลเป็นการห้ามเลือด เส้นร่างแหจะยึดกับผนังหลอดเลือด และเนื้อเยื่อข้าง ๆ แล้วหดตัวรัดแน่นทำให้บาดแผลเชื่อมติดกัน



ภาพ 9 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ

ที่มา: ดัดแปลงจาก ทรุปลูกปัญญา (2560)

2.4 ระบบภูมิคุ้มกันของปลา (Fish immune system)

ระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system) เป็นส่วนประกอบของเซลล์และร่างกาย มีบทบาทสำคัญในการปกป้องร่างกายจากจุลชีพก่อโรค ได้แก่ ปรสิต แบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส รวมถึงสารพิษ หรือเซลล์ร้าย ร่างกายของปลามีกลไกการสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อเป็นการต่อต้านเชื้อโรค หรือสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่ว่ายร่างกาย สามารถแบ่งเป็นได้ 2 ระบบ คือ ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Non-specific immunity) หรือภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (Innate immunity) และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Specific immunity) หรือภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาภายหลัง (Adaptive or acquired immunity)

2.4.1 ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ หรือภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (Non-specific immunity or Innate immunity)

เป็นด่านแรกในการต่อสู้ และป้องกันเชื้อโรคที่เข้ามาในร่างกาย ซึ่งร่างกายมีภูมิคุ้มกันนี้อยู่แล้วโดยธรรมชาติ ไม่ต้องพึ่งสิ่งแปลกปลอมเป็นตัวกระตุ้นให้สร้างขึ้น กลไกนี้ไม่จำเพาะเจาะจง (Specificity) กับเชื้อโรคชนิดใดชนิดหนึ่ง แต่ป้องกันโรคได้หลายชนิด และไม่มีความสามารถในการ

จดจำเชื้อโรค (Memory) กลไกนี้จำแนกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ การป้องกันด่านที่ 1 และการป้องกันด่านที่ 2

การป้องกันด่านที่ 1 เป็นการป้องกันที่บริเวณผิวหนังหรือเยื่อบุต่าง ๆ ประกอบด้วย 3 กลไก ดังนี้

1. กลไกทางกายภาพ เป็นกลไกที่กีดขวางไม่ให้เชื้อโรค หรือสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายได้ เช่น เกล็ด ผิวหนัง เมือก เหงือก รวมทั้งจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่เมือกของปลาจะประกอบด้วย Lectins, Pentraxins, Lysozymes, Complement proteins, Antibacterial peptides และ Immunoglobulin M (IgM) เป็นต้น ส่วนประกอบเหล่านี้มีหน้าที่สำคัญในการป้องกันการติดเชื้อของปลา (สุพรรณิ และคณะ, 2558)

2. กลไกทางเคมี เป็นกลไกที่อาศัยสารเคมีที่ร่างกายสร้างขึ้นมาทำลายเชื้อโรค เช่น กรดในกระเพาะอาหาร สารคัดหลั่งชนิดต่าง ๆ จากต่อมต่าง ๆ กรดแลคติก เป็นต้น

3. กลไกทางพันธุกรรม เป็นกลไกซึ่งทำให้เชื้อโรคบางชนิดไม่สามารถติดเชื้อในคนบางกลุ่มได้ เช่น คนไม่สามารถติดเชื้อไข้หวัดแมว และแมวไม่สามารถติดเชื้อจากคนได้ หรือในคนที่ เป็นโรค Sickle cell anemia จะมีความต้านทานต่อโรคมาลาเรีย

การป้องกันด่านที่ 2 เป็นการป้องกันโดยปฏิกิริยาทางเคมีระดับเซลล์ ซึ่งจะตอบสนองทันทีที่เชื้อโรคผ่านการป้องกันด่านแรกบุกรุกเข้าสู่ร่างกายได้ ร่างกายบริเวณนั้นจะเกิดปฏิกิริยาอักเสบ (Inflammatory response) โดยมีกระบวนการกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนย้ายเม็ดเลือดขาวจำพวก Neutrophilic, Granulocyte (Phagocyte) ได้แก่ Macrophage, Dendritic cell, Neutrophils, Eosinophils และ Monocyte ออกจากเส้นเลือดไปสู่บริเวณที่มีสิ่งแปลกปลอม และจับกินเชื้อโรค (Phagocytosis) พร้อมกับกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ในขณะที่ Phagocyte กำจัดสิ่งแปลกปลอม จะมีการปล่อยสารเคมีเพื่อดึงดูดเม็ดเลือดขาวเข้ามาบริเวณนั้นเพื่อกำจัดเชื้อโรค ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นมีลักษณะ บวม แดง ร้อน เรียกว่า การอักเสบ (Inflammation) นอกจากนี้ กรณีที่เป็นการติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียบางชนิด ร่างกายจะสร้างอินเตอร์เฟอรอน (Interferons) ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญในการขัดขวางการแบ่งตัวของไวรัส ช่วยป้องกันการติดเชื้อไวรัสได้

2.4.2 ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ หรือภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาภายหลัง (Specific immunity or Adaptive or acquired immunity)

ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะที่เกิดขึ้นหลังจากได้รับสิ่งแปลกปลอม หรือการป้องกันด่านที่ 3 ในกรณีการป้องกันทั้งด่านที่ 1 และ 2 ไม่สามารถกีดกันเชื้อโรคได้ ร่างกายจะตอบสนองต่อเชื้อโรคอย่างจำเพาะเจาะจงผ่านเม็ดเลือดขาวโดยมีเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญคือ B lymphocyte ซึ่งจะ

สร้าง Antibody และ T lymphocyte ซึ่งจะสร้าง T cells ที่สามารถสร้างการตอบสนองที่หลากหลาย ทั้งต่อเชื้อในเซลล์ และนอกเซลล์การตอบสนองแบบ Adaptive มีคุณสมบัติในการจดจำเชื้อโรคได้ทำให้การตอบสนองในครั้งหลังรวดเร็วมีประสิทธิภาพดี และมีปริมาณ T cells มากกว่าการตอบสนองในครั้งแรก ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ การตอบสนองโดยใช้สารน้ำ (Humoral immune response) และการตอบสนองชนิดพึ่งเซลล์ (Cell mediated immune response)

1. การตอบสนองโดยใช้สารน้ำ (Humoral Immune Response)

เป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่อาศัยสารน้ำ (Humor) คือ แอนติบอดี (Antibody, Ab) ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในซีรัม เซลล์ที่รับผิดชอบในเรื่องนี้ คือ เม็ดเลือดขาวชนิด B lymphocytes เมื่อแอนติเจนที่มีโครงสร้างพอเหมาะมาจับ B lymphocytes จะเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงเป็น Plasma cell จากนั้น Plasma cell จะทำการหลั่งแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ ที่จำเพาะกับแอนติเจนชนิดนั้น ๆ ออกมา เรียกว่า อิมมูโนโกลบูลิน หรือย่อว่า Ig ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 5 ชนิด คือ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE ภูมิคุ้มกันที่หลั่งออกมาจะหมุนเวียนในร่างกายและทำหน้าที่ในการจับสิ่งแปลกปลอมที่มีลักษณะเหมือนแอนติเจน นอกจากนี้ B lymphocytes ส่วนหนึ่ง ยังมีการเปลี่ยนไปเป็น Memory B cells เก็บความจำ เมื่อได้รับแอนติเจนตัวเดิมอีก Memory B cells จะเปลี่ยนไปเป็น Plasma cell หลั่งสารภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ออกมาได้เร็วกว่าและมีประสิทธิภาพมากกว่าครั้งแรก ซึ่งใช้เป็นหลักการของการให้วัคซีน

2. การตอบสนองชนิดพึ่งเซลล์ (Cell mediated immune response)

เป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ เมื่อจุลินทรีย์เข้ามาภายในร่างกาย เซลล์ Macrophage จะกินจุลินทรีย์เข้าไปข้างในเซลล์และเปลี่ยนเป็น Antigen presenting cell เพื่อกระตุ้น Helper T cell ซึ่งจะสามารถหลั่งสาร Cytokine ต่าง ๆ ไปกระตุ้นเม็ดเลือดขาวทั้ง Macrophage และ Granulocytes ให้จับกินเชื้อโรคได้ดีขึ้น และ Cytokine บางตัวจะไปกระตุ้น B lymphocytes ที่รับรู้แอนติเจนเดียวกัน ให้มีการแบ่งตัว และเปลี่ยนแปลงไปเป็น Plasma cell สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนนั้น นอกจากนี้ Helper T cell ที่ถูกกระตุ้นแล้วจะกลายเป็น Cytotoxic T lymphocyte ซึ่งทำหน้าที่สำคัญคือ ฆ่าเซลล์ที่มีจุลชีพอาศัยอยู่ (Infected cell) และจะทำงานร่วมกับ Natural killer cell (NK cell) อีกด้วย

2.4.3 ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

ไซโตไคน์ (Cytokine) เป็น Polypeptide ซึ่งเป็นสารน้ำต่าง ๆ ที่สร้าง และหลั่งโดยเซลล์ของร่างกาย มีบทบาทในภูมิคุ้มกันทั้ง Non-specific immunity และ Specific immunity Cytokine ที่ช่วยใน Specific immunity ส่วนใหญ่หลั่งมาจาก T lymphocyte และ Cytokine ที่

ช่วยใน Non-specific immunity ส่วนใหญ่หลั่งมาจาก Mononuclear phagocyte ที่พบสิ่งแปลกปลอม แต่ก็ได้รับการกระตุ้นจาก T lymphocyte ด้วยเช่นกัน (มลฤดี และจันทร์จรัส, 2561)

- Interleukin-1 (IL-1) เป็น Cytokine ชนิดหนึ่ง ซึ่งช่วยควบคุมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการกระตุ้นการอักเสบ มี 2 รูปแบบที่สำคัญ ได้แก่ IL-1 α ซึ่งพบอยู่บนผิวของเซลล์ผู้สร้าง และ IL-1 β ซึ่งพบอยู่ในสารน้ำของร่างกาย โดยเซลล์สำคัญที่ทำหน้าที่สร้าง IL-1 คือ Mononuclear phagocyte ฤทธิ์ของ Interleukin-1 (IL-1) มีดังนี้

1. กระตุ้น Hypothalamus ให้สร้าง Prostaglandin E2 แล้วก่อให้เกิดไข้
2. กระตุ้น Hepatocyte ให้สร้างสารกลุ่ม Acute phase protein ซึ่งช่วยทำลายสารพิษและกำจัดจุลชีพ แต่อาจก่อให้เกิดโรค Secondary amyloidosis ได้
3. เพิ่มความสามารถของ NK cell ในการสลายเนื้องอก โดยมี Synergistic action กับ IL-2 และ Interferon
4. เป็น Co-factor ของ IL-6 ในการส่งเสริมการแบ่งตัวของ Thymocyte ที่กระตุ้นด้วย Mitogen ชักนำให้ T lymphocyte หลั่ง IL-2, IL-4 และ IL-6
5. เป็น Co-factor ของ IL-4 หรือ IL-6 ในการส่งเสริมการพัฒนาการจาก B lymphocyte ไปเป็น Plasma cell
6. ชักนำให้สร้าง และส่งเสริมการทำงานของ Colony Stimulating Factor (CSF) และป้องกันไม่ให้ Hematopoietic stem cell ถูกทำลายโดยสารพิษ
7. มีฤทธิ์ต่อเซลล์หลายชนิดและอาจเป็นสาเหตุของโรคได้ เช่น มีฤทธิ์ต่อ Synovial cell, Osteoclast, Osteoblast และ Chondrocyte ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิด Arthritis และ Bone resorption ฤทธิ์ต่อ Islet of Langerhans อาจนำไปสู่การเกิดเบาหวานชนิดที่ 1 มีฤทธิ์ต่อไต อาจเกิด Lupus nephritis และ Immune complex glomerulonephritis มีฤทธิ์สลายโปรตีนในกล้ามเนื้อ ทำให้เกิด Negative nitrogen balance ฤทธิ์ต่อ Endothelial cell อาจก่อ Vasculitis และ Atherosclerosis

- Tumor necrosis factor (TNF) มี 2 ชนิด คือ TNF- α สร้างโดย Mononuclear phagocyte และ TNF- β สร้างโดย T lymphocyte มีฤทธิ์ ดังนี้

1. ส่งเสริมการเดินทางออกจากเส้นเลือดของเม็ดเลือดขาว นั่นคือ TNF ส่งเสริม Inflammatory response
2. ส่งเสริม Phagocytosis ของ Polymorphonuclear cell และส่งเสริมการสร้าง Hydrogen peroxide ใน Macrophage

3. เพิ่มการปรากฏของ MHC ทั้ง 2 class
4. กระตุ้นเซลล์ต่างๆ ให้หลั่ง IL-1, IL-6, IL-8 และTNF เอง
5. ทำลายเซลล์เนื้อออก
6. ทำให้เกิดอาการไข้และมีการสร้าง Acute phase protein ซึ่งเกี่ยวกับ Inflammation
7. ทำให้เกิด Cachexia (การมีสุขภาพเสื่อมโทรม และอยู่ในภาวะขาดอาหารอย่างมาก)
8. ทำให้เกิด Toxic (septic) shock syndrome
9. กัดการสร้างเม็ดเลือดในไขกระดูก

2.5 ความเครียดในปลานิล (Stress in tilapia)

ปลาที่มีความเครียด จะมีอาการเบื่ออาหาร หรือกินอาหารน้อยลง มีพฤติกรรมว่ายอยู่บริเวณผิวน้ำ และอ้าปากเพื่อหายใจ เนื่องจากปลาได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอ สาเหตุอาจเกิดจากระบบหมุนเวียนน้ำไม่ดีทำให้ความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำ หรือเกิดจากระดับของแอมโมเนีย ไนโตรที่สูง เป็นต้นนอกจากนี้ปลาอาจป่วยเป็นโรคปรสิต หรือเชื้อรา เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องอันมีสาเหตุมาจากความเครียด

2.5.1 ปัจจัยที่ทำให้เกิดความเครียดในปลา

1. อุณหภูมิ (Temperature) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่อาจกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ, แสง (Light), เสียง (Sounds) และก๊าซต่าง ๆ ที่ละลายอยู่ในน้ำ (Dissolved gases)
2. คุณสมบัติของน้ำที่ไม่ดี (Poor water quality) ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำต่ำ น้ำที่ใช้มีการปนเปื้อนคลอรีน การใส่สารเคมีลงในน้ำมากเกินไป หรือเกิดจากสารฆ่าแมลงที่ปนเปื้อนมากับน้ำ เป็นต้น
3. ปริมาณของของเสียที่เกิดจากตัวสัตว์น้ำ (Metabolic wastes) หรือ จากเศษอาหาร ได้แก่ ปริมาณแอมโมเนีย และไนโตรที่ที่สูงเกิน
4. พื้นที่ในการเลี้ยงไม่เหมาะสม เช่น การเลี้ยงปลาพื้นที่แคบเกินไป ความหนาแน่นของประชากรสัตว์น้ำ และประชากรปลาชนิดอื่น ๆ ที่อาศัยอยู่ร่วมกัน (Other species of fish) ซึ่งทำให้เกิดการแก่งแย่งอาหารการกินกันเองหรือแย่งพื้นที่ที่อยู่อาศัย หรือการเลี้ยงปลาขนาดต่างกันรวมกัน ทำให้ปลาขนาดใหญ่จะกินปลาที่มีขนาดเล็ก ปลาที่มีนิสัยรักสงบจะเกิดความเครียดได้หากเลี้ยงร่วมกับปลาที่มีนิสัยก้าวร้าว
5. ด้านการปฏิบัติ หรือการจัดการ (Procedural stressors) อาจมีการจับหรือสัมผัสสัตว์น้ำ (Handling) ทำให้ปลาเกิดความเครียด การขนส่งสัตว์น้ำ (Shipping) การใส่สารเคมีเพื่อรักษาโรคสัตว์น้ำ เป็นต้น

2.5.2 ฮีตช็อกโปรตีน (Heat shock protein; HSP)

ฮีตช็อกโปรตีน (Heat shock protein; HSP) เป็นโปรตีนที่พบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด จะมีการสังเคราะห์เพิ่มมากขึ้นเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดเนื่องจากความร้อน (Heat stress) มากกว่าถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดจากปัจจัยอื่น เช่น ภาวะขาดออกซิเจน, ภาวะขาดเลือด, การอักเสบของเซลล์ และการติดเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น โดยฮีตช็อกโปรตีนแบ่งได้หลายประเภทตามน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weights) ซึ่งฮีตช็อกโปรตีน 70 (Heat shock protein; HSP) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 70 กิโลดาลตัน (kDa) และ HSP70 เป็นกลุ่มที่ได้รับความสนใจ และมีการศึกษาความสัมพันธ์กับการทนต่อความร้อนมากที่สุดคือ เนื่องจากไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมากที่สุด (อิรดา, ม.ป.ป.)

ฮีตช็อกโปรตีน 70 (Heat shock protein; HSP) มีโครงสร้างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีเสถียรภาพสูงมาก เมื่อสิ่งมีชีวิตเผชิญกับสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ เช่น การชะลอกระบวนการสร้างโปรตีนทั่วไป และโปรตีนที่มีอยู่ในเซลล์ตลอดจนสายโพลีเปปไทด์ที่อยู่ระหว่างการม้วนพับตัวเกิดความผิดปกติซึ่งนำไปสู่การม้วนพับกลายเป็นโมเลกุลที่ผิดปกติ หรือเกิดการเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนของโปรตีน ในสภาวะความเครียดเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะกระตุ้นให้สังเคราะห์ HSP โดยเฉพาะ HSP70 เพิ่มมากขึ้น เพื่อช่วยในกระบวนการรักษาโมเลกุลโปรตีนให้เกิดการม้วนพับตัวที่ถูกต้อง ช่วยป้องกันการเกาะกลุ่มกันของโปรตีน ช่วยซ่อมแซมป้องกันเซลล์ไม่ได้รับความเสียหายจากความร้อนให้สามารถกลับมาทำหน้าที่ได้ถูกต้องเหมือนเดิม และทำให้เซลล์สามารถมีชีวิตต่อไปได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง

2.5.3 แนวทางการป้องกัน และแก้ไขปัญหาคความเครียดในปลา

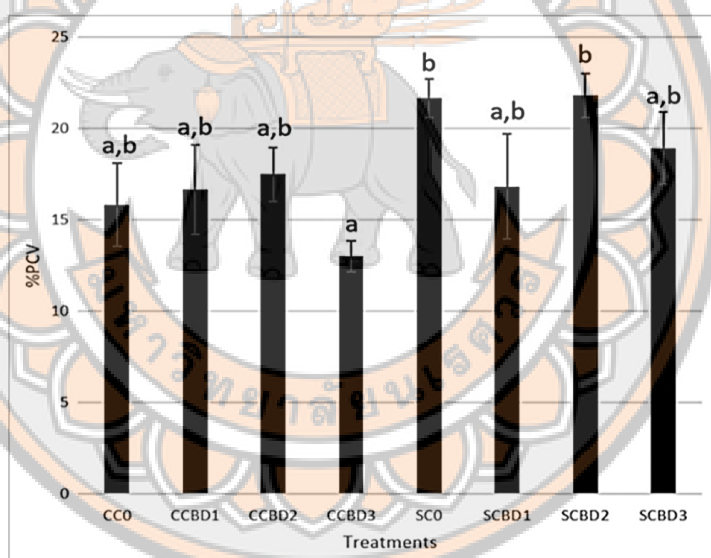
แนวทางในการป้องกันไม่ให้เกิดความเครียดสามารถทำได้หลายวิธี เช่น บ่อเลี้ยงต้องมีขนาดเหมาะสม ไม่เล็กหรือไม่ใหญ่จนเกินไป ไม่เลี้ยงปลาด้วยความหนาแน่นจนเกินไป คุณภาพน้ำ โดยเฉพาะปริมาณออกซิเจนควรมีปริมาณที่เพียงพอ อุณหภูมิของน้ำต้องเหมาะสมกับชนิดปลาที่เลี้ยง การเลี้ยงปลาในน้ำที่ร้อน หรือเย็นเกินไปจะสร้างความเครียดให้กับปลา ควรเปลี่ยนถ่ายน้ำอย่างสม่ำเสมอจะช่วยให้ปลาที่เลี้ยงในถังมีสุขภาพดี ไม่เครียด

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาครั้งนี้ ได้รวบรวมมาโดยมีการศึกษาทั้งในประเทศ และต่างประเทศพอสรุปได้ ดังนี้

2.6.1 การใช้กัญชาในสัตว์น้ำ

Mortuza et al. (2021) ได้ศึกษาผลของสารสกัด Cannabidiol (CBD) ต่อค่าโลหิตวิทยาของปลานิล โดยการทดลองแบ่ง 8 กลุ่มการทดลอง แบ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับความเครียด และกลุ่มที่ไม่ได้รับความเครียด ให้อาหารที่มีความเข้มข้นของ CBD 4 ระดับที่แตกต่างกันคือ 0%, 0.001%, 0.002% และ 0.003% ของน้ำหนักอาหาร ปลากลุ่มที่เครียด 4 กลุ่มจะได้รับอาหารเสริมด้วยไฮโดรคอร์ติโซน 98% และร่างกายจะเผาผลาญไฮโดรคอร์ติโซนเพื่อผลิตคอร์ติซอล ซึ่งเป็นฮอร์โมนความเครียดที่สำคัญ ซึ่งทำให้สามารถเปรียบเทียบผลของ CBD ต่อปลานิลที่เครียดและไม่เครียด ที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ CBD ผลการศึกษาพบว่า ปลากลุ่มที่ไม่เครียดที่เลี้ยงด้วยความเข้มข้นสูงสุดของ CBD (0.003%) แสดงให้เห็นว่ามีความเครียดน้อยที่สุดเนื่องจาก ปลา มี % PCV (Haematocrit or Packed cell volume) ต่ำสุด ในขณะที่ปลากลุ่มที่ได้รับความเครียดที่ไม่ได้รับ CBD พบว่ามี % PCV สูงที่สุดซึ่งเป็นการบ่งบอกว่าปลาอยู่ในภาวะมีความเครียด (ภาพ 10)



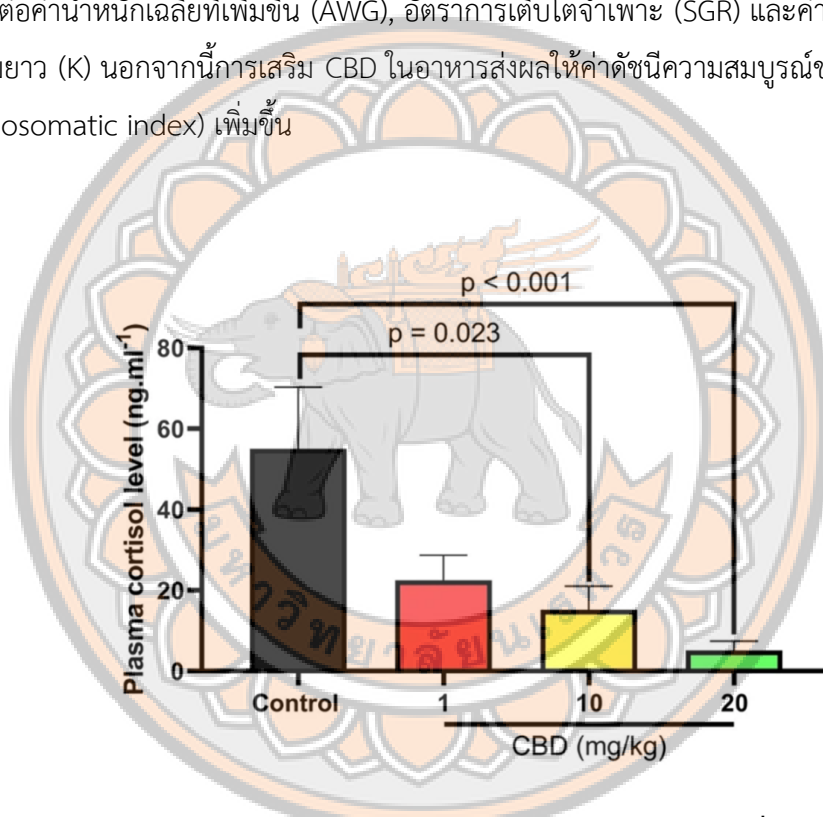
ภาพ 10 เปอร์เซนต์ฮีมาโตคริต (% PCV) ในเลือดปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารกลุ่มต่าง ๆ

โดย CC0 (อาหารควบคุม ไม่มี CBD), CCBD1 (อาหารควบคุมที่มี 0.001% CBD), CCBD2 (อาหารควบคุมที่มี 0.002% CBD), CCBD3 (อาหารควบคุมที่มี 0.003% CBD) และกลุ่มที่ให้อาหารเพื่อให้ปลามีความเครียด ได้แก่ SC0 (Stress feed, ไม่มี CBD), SCBD1 (Stress feed, อาหารที่มี 0.001% CBD), SCBD2 (Stress feed, อาหารที่มี 0.002% CBD) และ SCBD3 (Stress feed, อาหารที่มี 0.003% CBD)

หมายเหตุ: ตัวอักษรต่างกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ที่มา: Mortuza et al. (2021)

Camargo-dos-Santos et al. (2022) ศึกษาผลของ Cannabidiol (CBD) ต่อความก้าวร้าว ความเครียด และการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของปลานิล โดยให้อาหารเสริม Cannabidiol (CBD) ในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ (0, 1, 10 และ 20 มก./กก.) ผลการศึกษาพบว่า การให้อาหารเสริม Cannabidiol (CBD) ที่ระดับ 10 มก./กก. ช่วยลดพฤติกรรมความก้าวร้าวของปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพ และการให้อาหารเสริม Cannabidiol (CBD) ที่ระดับ 10 และ 20 มก./กก. สามารถลดระดับคอร์ติซอลในเลือดโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพ 11) โดยที่ไม่ส่งผลต่อค่าน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (AWG), อัตราการเติบโตจำเพาะ (SGR) และค่าปัจจัยน้ำของหนักต่อความยาว (K) นอกจากนี้การเสริม CBD ในอาหารส่งผลให้ค่าดัชนีความสมบูรณ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonadosomatic index) เพิ่มขึ้น



ภาพ 11 ผลของอาหารเสริม Cannabidiol (CBD) ในปริมาณที่แตกต่างกัน

โดย 0 (กลุ่มควบคุม), 1 มก./กก. (CBD 1), 10 มก./กก. (CBD 10) และ 20 มก./กก. (CBD 20) ต่อระดับคอร์ติซอลในเลือดของปลานิล (n = 8)

หมายเหตุ: ตัว p แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ที่มา: Camargo-dos-Santos et al. (2022)

Wang et al. (2023) ศึกษาผลของ Cannabidiol (CBD) ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต และการแสดงออกของยีนในปลาโครเกอร์ (*Larmichthys crocea*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับน้ำมันถั่วเหลืองสูง โดยมีการเสริมด้วย CBD ที่ระดับ 25, 50, 100 และ 250 มก./กก. ผลการศึกษาพบว่าค่าน้ำหนักสุดท้าย (FBW) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) ในปลาที่เลี้ยงด้วย CBD 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร แสดงค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่า CBD 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลาโครเกอร์สีเหลืองขนาดใหญ่ได้ แต่ในด้านอัตราการรอดตาย ค่าปัจจัยน้ำของหนักต่อความยาว ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักตับ และค่าดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักอวัยวะภายใน ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ในปลาที่เลี้ยงด้วย CBD ที่แตกต่างกันในทุกๆระดับ อัตราการกินอาหาร (FI) ในปลาที่เลี้ยงด้วย CBD 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร แสดงค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ ปลาโครเกอร์ที่เลี้ยงด้วย CBD ที่ระดับ 100 และ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร มีระดับการแสดงออกของยีน TNF- α ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่า CBD สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ทำให้เกิดการอักเสบ และบรรเทาการอักเสบได้หลังจากให้ปลากินเป็นเวลา 9 สัปดาห์

Pandelides et al. (2020) ศึกษาการแสดงออกของยีนในปลาม้าลาย (*Danio rerio*) รุ่น F0 และ F1 ที่ได้สัมผัสสาร Cannabidiol (CBD) ในความเข้มข้นที่ต่างกันคือ 0.02, 0.1, 0.5 ไมโครโมลาร์ (0.006, 0.03, 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าระดับ IL-6 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในปลาที่ได้รับ CBD ที่ระดับ 0.1 และ 0.5 ไมโครโมลาร์ และปลาที่ได้รับ CBD ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นมีระดับการแสดงออกของยีน TNF- α ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าปลาม้าลายตัวผู้ (*Danio rerio*) ที่ได้สัมผัสกับสาร Cannabidiol (CBD) ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นจะมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

2.6.2 การใช้กัญชงในสัตว์อื่น ๆ

Zhu et al. (2021) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากน้ำใบกัญชงต่อการต้านความเหนียวล้าในหนู พบว่าสารสกัดน้ำจากใบกัญชงสามารถควบคุมเมแทบอลิซึมของกรดแลคติก ลดการสะสมของกรดแลคติกในเลือด และชะลอการเกิดอาการอ่อนเพลียหรือเร่งการฟื้นตัวจากความเหนียวล้าในหนู ด้วยการปรับปรุงกิจกรรมของเอนไซม์ป้องกันสารต้านอนุมูลอิสระ จึงสามารถดออกซิเจนที่ทำปฏิกิริยาเพื่อป้องกันความเสียหายของเนื้อเยื่อ และช่วยต่อต้านกับความเมื่อยล้า โดยสันนิษฐานว่าสารโพลีแซคคาไรด์ แคนนาบินอล ฟลาโวนอยด์ และเทอร์ปีนอยด์ในใบกัญชงอาจมีส่วนช่วยในการต่อต้านความเหนียวล้าในหนู

Bielawiec et al. (2023) ที่ใช้ CBD การฉีดเข้าช่องท้องของหนูที่เป็นโรคอ้วนซึ่งเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีไขมันสูง ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของมวลกาย เป็นเวลาสองสัปดาห์ พบว่า สามารถลดการสะสมของกรดไขมันในกล้ามเนื้อ (FAs) ได้อย่างมีนัยสำคัญ

ทั้งนี้ งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์จากใบกัญชงในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีเพียงรายงานเฉพาะในส่วนของการใช้สาร Cannabidiol (CBD) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในกัญชงเท่านั้น ซึ่งยังขาดในส่วนของการใช้ผงใบกัญชงเสริมในอาหารปลานิลเพื่อศึกษาการเจริญเติบโต และภูมิคุ้มกัน ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จะเป็นการเติมเต็มในส่วนของการศึกษาในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งถือเป็นอาชีพที่สร้างรายได้หลักของประเทศชาติเช่นกัน



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง (Population and sample)

ปลานิลน้ำหนักเริ่มต้น 2-3 กรัมต่อตัว จำนวน 400 ตัว ซื้อมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด จังหวัดพิษณุโลก

3.2 ตัวแปรที่ใช้ในการวิจัย (Variables in research)

ตัวแปรต้น: อาหารผสมกัญชงที่ระดับต่าง ๆ (0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร)

ตัวแปรตาม: การเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน และความเครียดในปลานิล

ตัวแปรควบคุม: จำนวนปลานิล ขนาดบ่อเลี้ยง และระยะเวลาเลี้ยง 10 สัปดาห์

3.3 เครื่องมือ และอุปกรณ์ (Tools and equipment)

เครื่องมือ

- 1) เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)
- 2) กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
- 3) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 4) เครื่องผสมอาหาร (Food mixer)
- 5) เครื่องอัดเม็ดอาหาร (Die feed pellet mill)
- 6) ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)
- 7) ปัมลมพร้อมหัวทราย (Air compressor)
- 8) เครื่อง Haematocrit centrifuge
- 9) เครื่องเขย่าสาร (Vortex meter)
- 10) เครื่องวัดค่ากรด-ด่าง (pH meter)
- 11) เครื่องวิเคราะห์โปรตีน (Gerhardt/เยอรมัน)
- 12) เครื่องวิเคราะห์ไขมัน (Gerhardt/เยอรมัน)
- 13) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
- 14) เครื่องฮีตเตอร์ปรับอุณหภูมิ (Heater)

อุปกรณ์

- 1) ตะแกรงตาถี่ขนาด 250 ไมครอน (Colander)
- 2) ถาดสแตนเลส (Stainless steel food pans)
- 3) ถุงมือยาง (Latex gloves)
- 4) ไม้บรรทัด (Ruler)
- 5) ปากคีบ (Forceps)
- 6) ขวดเก็บสารละลาย (Duran)
- 7) แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
- 8) กระดาษทิชชู (Tissue paper)
- 9) หลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Microcentrifuge tube)
- 10) ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (Erlenmeyer flask)
- 11) หลอดทดลอง (Test tube)
- 12) กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร (Cylinder)
- 13) ปีกเกอร์ ขนาด 200 มิลลิลิตร (Beaker)
- 14) ถังไฟเบอร์กลาส 500 ลิตร (Fiberglass tank)
- 15) ตู้กระจกความจุ 150 ลิตร (Glass tanks)
- 16) สายออกซิเจนยาว 80 เซนติเมตร (Oxygen tube)
- 17) กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร (Syringe)
- 18) สวิงตักปลา (Fish net scoop)
- 19) สไลด์นับเม็ดเลือด (Blood counting chamber)
- 20) สายยางถ่ายน้ำ (Water hoses)
- 21) หลอดเก็บเลือด (Blood tube)
- 22) หลอดคาพิลลารี (Capillary tube)

3.4 การเตรียมอาหารทดลอง (Experimental diets preparation)

3.4.1 การเตรียมกัญชง

ใบกัญชงใต้ช่อดอก (Sugar leaf) ได้รับการสนับสนุนจากฟาร์มกัญชง Mr.Hemp นำมาผึ่งให้แห้ง และหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปอบในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นบดให้เป็นผงละเอียด (Powder) และนำไปตรวจหาปริมาณสาร CBD ด้วยวิธีการ In housed method based on AOAC 2018.10 ก่อนที่จะผสมลงในอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ

3.4.2 การเตรียมวัตถุดิบอาหารทดลอง

วัตถุดิบอาหารที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ กากถั่วเหลือง ปลาป่น รำข้าว ข้าวโพด ปลาเยลลี่ ข้าว แป้งข้าวเจ้า น้ำมันพืช วิตามินซี แร่ธาตุรวม วิตามินรวม และผงใบกัญชง นำวัตถุดิบอาหารที่เตรียมไว้มาร่อนผ่านตะแกรง (Sieve) ที่มีขนาด 30 เมช (Mesh) เพื่อร่อนเอากาก หรือสิ่งแปลกปลอมในวัตถุดิบอาหารออก จากนั้นนำวัตถุดิบอาหารไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ความชื้น เถ้า และเยื่อใย ตามวิธีของ AOAC (1990) ดังตาราง 6

ตาราง 6 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบอาหาร (เปอร์เซ็นต์)

วัตถุดิบ	โปรตีน	ไขมัน	ความชื้น	เถ้า	เยื่อใย
กากถั่วเหลือง	46.40±0.21	1.52±0.10	9.96±0.07	6.65±0.04	6.53±0.07
ปลาป่น	60.56±1.44	7.33±0.13	6.66±0.07	21.41±0.16	0.15±0.05
รำข้าว	11.99±0.45	13.45±0.67	7.42±0.03	9.95±0.07	0.18±0.09
ข้าวโพดป่น	7.84±0.56	2.22±0.77	9.79±0.06	1.80±0.01	1.65±0.12
ปลาเยลลี่	7.71±0.58	0.98±0.02	10.49±0.10	0.69±0.09	0.21±0.08
แป้งข้าวเจ้า	7.18±0.57	0.70±0.34	9.57±0.10	0.73±0.05	0.50±0.25
กัญชง	17.04±0.63	19.05±0.53	7.96±0.03	18.05±0.04	16.43±0.67

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D., n=3)

3.4.3 การเตรียมอาหารทดลอง

นำวัตถุดิบอาหารที่เตรียมไว้แต่ละชนิดมาชั่งตามสูตรอาหารแต่ละสูตรโดยละเอียด ดังตาราง 7 อาหารทดลองมีทั้งหมด 4 สูตร ได้แก่ อาหารที่ไม่มีการเสริมกัญชงใช้เป็นอาหารสูตรควบคุม (Control) หรือ (T1) ส่วนอาหารทดลองสูตรที่ 2-4 จะเสริมกัญชงที่ระดับ 10, 20 และ 40 กรัมต่อ

กิโลกรัมอาหาร (T2-T4) ผสมวัตถุดิบแบบแห้งให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร โดยใช้เวลา 15 นาที จากนั้นเติมน้ำมันปลาแล้วผสมต่อให้ส่วนผสมเข้ากันใช้เวลา 10 นาที และเติมน้ำสะอาด 350 มิลลิลิตร และทำการผสมต่อจนเป็นเนื้อเดียวกันอีก 5 นาที จึงนำวัตถุดิบอาหารที่ผสมกันดีแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ด อาหารที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร และตัดเป็นความยาว 2-3 มิลลิเมตร ใส่ลงถาดสแตนเลส และนำอาหารไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เก็บอาหารทดลอง ออกจากตู้อบ และนำไปบรรจุถุงพลาสติกแบบสุญญากาศ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส อาหารบางส่วนนำไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ความชื้น เหนือใย และเถ้า ตามวิธีของ AOAC (1990) ดังตาราง 8

ตาราง 7 องค์ประกอบของอาหารทดลอง (กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร)

วัตถุดิบ	T1 (สูตรควบคุม)	T2 (10 กรัม/กก.)	T3 (20 กรัม/กก.)	T4 (40 กรัม/กก.)
กากถั่วเหลือง	360	360	360	360
ปลาป่น	160	160	160	160
รำข้าว	150	150	150	150
ข้าวโพดป่น	140	140	140	140
ปลายข้าวหัก	60	60	60	60
แป้งข้าวเจ้า	70	60	50	30
น้ำมันปลา	35	35	35	35
กากถั่ว	0	10	20	40
วิตามิน	10	10	10	10
แร่ธาตุ	10	10	10	10
วิตามินซี	5	5	5	5
รวม	1000	1000	1000	1000

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D., n=3)

T1 อาหารสูตรควบคุมไม่มีส่วนผสมของใบกัญชง

T2 อาหารผสมใบกัญชงบดละเอียดที่ระดับ 10 กรัมต่อกิโลกรัม

T3 อาหารผสมใบกัญชงบดละเอียดที่ระดับ 20 กรัมต่อกิโลกรัม

T4 อาหารผสมใบกัญชงบดละเอียดที่ระดับ 40 กรัมต่อกิโลกรัม

ตาราง 8 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง (เปอร์เซ็นต์)

อาหารทดลอง	โปรตีน	ไขมัน	ความชื้น	เถ้า	เยื่อใย
T1 (0 ก./กก.)	31.44±0.52	7.26±0.39	4.68±0.07	8.01±0.01	3.23±0.30
T2 (10 ก./กก.)	31.59±0.41	7.39±0.07	4.87±0.05	8.17±0.10	3.15±0.34
T3 (20 ก./กก.)	31.62±1.25	7.81±0.12	4.78±0.03	8.37±0.02	3.24±0.21
T4 (40 ก./กก.)	31.48±0.35	7.58±0.30	4.50±0.05	8.73±0.06	3.44±0.15

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D., n=3)

T1 อาหารสูตรควบคุมไม่มีส่วนผสมของใบกล้วย

T2 อาหารผสมใบกล้วยขบละเอียดที่ระดับ 10 กรัมต่อกิโลกรัม

T3 อาหารผสมใบกล้วยขบละเอียดที่ระดับ 20 กรัมต่อกิโลกรัม

T4 อาหารผสมใบกล้วยขบละเอียดที่ระดับ 40 กรัมต่อกิโลกรัม

3.5 การเตรียมสัตว์ทดลอง (Experimental fish)

ซื้อลูกปลานิลจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพิษณุโลกจำนวน 400 ตัว น้ำหนักเริ่มต้น 2-3 กรัมต่อตัว นำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 500 ลิตร ให้อาหารสูตรที่มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ วันละ 2 ครั้ง คือ ช่วงเช้า เวลา 08.00 น. และช่วงเย็น เวลา 16.00 น. โดยให้ปลากินจนอิ่ม มีการให้อาหารตลอดเวลา เพื่อให้ปลาสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม เป็นระยะเวลา 30 วัน จนได้ปลาตามขนาดที่ต้องการ 6-7 กรัมต่อตัว ทำการงดให้อาหารปลาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวางยาสลบด้วยน้ำมันกานพลูเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (น้ำมันกานพลู : 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอล = 1:9) จากนั้นคัดปลาขนาดใกล้เคียงกันจำนวน 240 ตัว มาชั่งน้ำหนักเริ่มต้น และนำไปใส่ถังทดลองที่เติมน้ำปริมาตร 200 ลิตร จำนวน 15 ตัวต่อถัง ทั้งหมด 4 ถัง บันทึกข้อมูลน้ำหนักเริ่มต้น และเลี้ยงปลาด้วยอาหารทดลองทดลองเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ โดยให้อาหารกินจนอิ่ม และเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ในสัดส่วน 70% ของน้ำในถัง สภาพแวดล้อมการเลี้ยงอยู่ภายใต้ช่วงแสงธรรมชาติ (มืด 12 ชม. : สว่าง 12 ชม.)

การทดลองนี้ใช้ปลานิลในการทดลอง โดยได้รับการพิจารณา และอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (รหัสข้อเสนอโครงการเลขที่ NU-AQ660101 ออกให้ ณ วันที่ 23 มีนาคม 2566)

3.6 การวัดการเจริญเติบโต (Growth performance)

วัดการเจริญเติบโตของปลา ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ โดยนำปลาทุกตัวจากแต่ละการทดลองมาชั่งน้ำหนักรวม เพื่อคำนวณค่าการเจริญเติบโต และนับจำนวนปลาที่เหลือเพื่อคำนวณอัตราการรอดตาย การคำนวณค่าการเจริญเติบโตต่าง ๆ คำนวณตามสมการต่อไปนี้

3.6.1 น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (Weight gain, WG, %)

$$= [\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)} / \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น (กรัม)}] \times 100$$

3.6.2 น้ำหนักเพิ่มต่อวัน (Average daily gain, ADG, กรัม/วัน)

$$= \text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)} / \text{ระยะเวลาทดลองเลี้ยง (วัน)}$$

3.6.3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, SGR, %/วัน)

$$= 100 \times [(\ln \text{ น้ำหนักตัวสุดท้าย} - \ln \text{ น้ำหนักตัวเริ่มต้น}) / \text{ระยะเวลาทดลองเลี้ยง (วัน)}]$$

3.6.4 อัตราการรอดตาย (Survival rate, SR, %)

$$= 100 \times (\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} / \text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้น})$$

3.7 การวัดประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed performance)

วัดประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลา ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ โดยสุ่มปลาทุกตัวมาจากแต่ละการทดลองชั่งน้ำหนักรวม และชั่งน้ำหนักอาหารที่เหลือ เพื่อคำนวณค่าต่าง ๆ ตามสมการต่อไปนี้

3.7.1 อัตราการกินอาหาร (Rate of feed intake, FI, %)

$$= [\text{น้ำหนักอาหารแห้งที่ปลากิน (กรัม)} \times 100] / [(\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)} / 2) \times \text{จำนวนวัน}]$$

3.7.2 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (Feed conversion ratio, FCR)

$$= \text{น้ำหนักอาหารที่ปลากินทั้งหมด (กรัม)} / \text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}$$

3.7.3 ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed efficiency, FE, %)

$$= (1 / \text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก}) \times 100$$

3.8 การวัดค่าดัชนีน้ำหนักตัวต่อดับ อวัยวะภายใน และค่าปัจจัยของน้ำหนักต่อความยาวของปลาทดลอง

เมื่อสิ้นสุดการทดลองการให้อาหารผสมกันอยู่เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ มีการงดให้อาหารปลาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สุ่มปลาจำนวน 3 ตัวต่อถัง หรือ 12 ตัวต่อชุดการทดลองจากนั้นให้ยาสลบด้วยน้ำมันกานพลู 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (น้ำมันกานพลู และ 95% เอทานอล, 1:9) ปลาแต่ละถังจะถูกสุ่มมาชั่งน้ำหนัก และวัดความยาวมาตรฐาน (Standard length, SL) ของปลาแต่ละตัว โดยการใช้ไม้บรรทัดวัดจากปลายสุดของจงอยปากจนถึงโคนครีบหางของปลา บันทึกหน่วยเป็นเซนติเมตร (cm) จากนั้นทำการการุณยฆาตด้วยน้ำมันกานพลู 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อนำอวัยวะภายในทั้งหมดมาชั่งน้ำหนัก และน้ำหนักตับเพื่อคำนวณหาค่าดัชนีต่าง ๆ คำนวณตามสมการต่อไปนี้

3.8.1 ค่าปัจจัยของน้ำหนักต่อความยาว (Condition factors, K, g/cm³)

$$= [\text{น้ำหนักตัวปลา (กรัม)} / \text{ความยาวปลา (เซนติเมตร)}^3] \times 100$$

3.8.2 ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักตับ (Hepatosomatic index, HIS, %)

$$= [\text{น้ำหนักตับ (กรัม)} / \text{น้ำหนักตัวปลา (กรัม)}] \times 100$$

3.8.3 ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักอวัยวะภายใน (Viscerosomatic index, VSI, %)

$$= [\text{น้ำหนักอวัยวะภายใน (กรัม)} / \text{น้ำหนักตัวปลา (กรัม)}] \times 100$$

3.9 การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของซากปลาทั้งตัว

สุ่มปลาก่อนการทดลอง (Initial fish) จำนวน 15 ตัว และหลังการทดลองจำนวน 3 ตัวต่อตู้ นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีตามวิธีการของ AOAC (1990) นำผลมาวิเคราะห์หาค่า ดังนี้

3.9.1 การเก็บรักษาโปรตีน (Protein retention, PR, เปอร์เซ็นต์)

$$= \text{ปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้น (กรัม)} / \text{ปริมาณโปรตีนเริ่มแรก (กรัม)} \times 100$$

3.9.2 การเก็บรักษาไขมัน (Lipid retention, LR, เปอร์เซ็นต์)

$$= \text{ปริมาณไขมันเพิ่มขึ้น (กรัม)} / \text{ปริมาณไขมันเริ่มแรก (กรัม)} \times 100$$

3.10 การเก็บตัวอย่างเลือด (Blood Sample collection)

ทำการสุ่มปลาจำนวน 6 ตัวต่อถังจากทุกชุดการทดลอง นำมาสลบด้วยน้ำมันกานพลู 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (น้ำมันกานพลู และ 95% เอทานอล, 1:9) จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดปลาโดยเก็บจากหลอดเลือดดำบริเวณคอคอดหาง ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตรที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (10% Ethylenediaminetetraacetate, EDTA) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เพื่อนำไปนับจำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC), จำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC) และฮีมาโตคริต (Hct) ในห้องปฏิบัติการต่อไป

3.11 การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา (Hematology analysis)

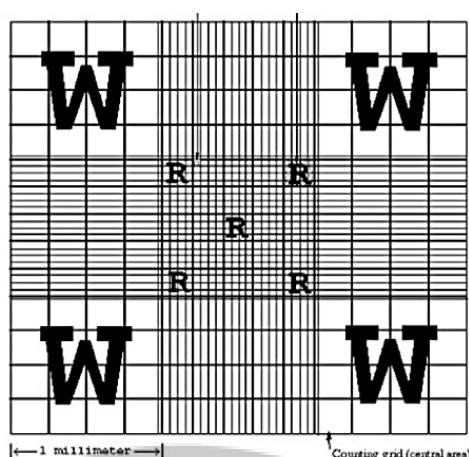
3.11.1 ปริมาณเม็ดเลือดแดง (Red blood cell; RBC)

การนับปริมาณเม็ดเลือดแดง ทำโดยเก็บตัวอย่างเลือดปลาบริเวณคอคอดหาง เก็บตัวอย่างเลือดไว้ในหลอดสุญญากาศ จากนั้นนำตัวอย่างเลือดมาเจือจางด้วย Grower's solution อัตราส่วน 1 ต่อ 10 แล้วใช้ Micropipette หยดตัวอย่างเลือดลงบนสไลด์นับเม็ดเลือด (Haemocytometer) ด้านละ 10 ไมโครลิตร และนำไปนับด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า โดยนับปริมาณเม็ดเลือดแดงที่ปรากฏในช่องสี่เหลี่ยมเล็กทั้ง 4 มุมรวมกับช่องตรงกลาง (R) ของช่องสี่เหลี่ยมใหญ่กลางสไลด์นับเม็ดเลือด นับจำนวนเม็ดเลือดแดงใน 5 ช่องเล็กที่มุม บน ล่าง ซ้าย ขวา และตรงกลาง (ภาพ 12)

วิธีคำนวณปริมาณเม็ดเลือดแดง

พื้นที่ช่องใหญ่ $1 \times 1 \text{ mm}^3$ มีปริมาตร	$= 1 \times 1 \times 0.1 = 0.1 \text{ mm}^3$
นับพื้นที่เพียง 5 ช่องเล็กใน 25 ช่องจะมีปริมาตร	$= (5 / 25) \times 0.1 \text{ mm}^3$
ปริมาตร $(5 / 25) \times 0.1 \text{ mm}^3$ นับเม็ดเลือดแดงได้	$= d \text{ cell}$
ปริมาตร 1 mm^3 จะนับเม็ดเลือดแดงได้	$= d \times (25 / 5) \times 0.1$
	$= 50 \times d \text{ cell}$
เจือจางเม็ดเลือดแดง 1 ต่อ 200 นับจำนวนเม็ดเลือดได้	$= 50 \times d \text{ cell}$
ถ้าไม่เจือจางเม็ดเลือดแดงจะนับได้จำนวน	$= 50 \times d \times 200 \text{ cell}$
	$= 10,000 \times d \text{ cell}$

ดังนั้นตัวคูณสำหรับการนับเม็ดเลือดแดงที่เจือจางอัตราส่วน 1 : 200 และนับในพื้นที่ 5 ช่องเล็กมีค่าเท่ากับ 10,000



ภาพ 12 ตำแหน่งการนับเซลล์เม็ดเลือดแดง (R) และเซลล์เม็ดเลือดขาว (W)

บนสไลด์นับเม็ดเลือด (Blood counting chamber)

ที่มา: Patterson (2019)

3.11.2 ปริมาณเม็ดเลือดขาว (White blood cell; WBC)

การนับปริมาณเม็ดเลือดขาว ขั้นแรกเก็บตัวอย่างเลือดปลาจากบริเวณคอดหางและเก็บตัวอย่างเลือดไว้ในหลอดสุญญากาศ จากนั้นนำเลือดที่ได้มาเจือจางด้วย 3% acetic acid อัตราส่วน 1 ต่อ 20 และใช้ Micropipette หยดตัวอย่างเลือดลงบนสไลด์นับเม็ดเลือด (Haemocytometer) ด้านละ 10 ไมโครลิตร และนำไปนับด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า โดยนับปริมาณเม็ดเลือดขาวที่ปรากฏในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ (W) ทั้ง 4 ช่อง (ภาพ 12)

วิธีคำนวณคำนวณปริมาณเม็ดเลือดขาว

พื้นที่ 1 ช่อง เท่ากับ $1 \times 1 \text{ mm}^3$ นับจำนวนทั้งหมด 4 ช่อง	$= 4 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$
ความลึกของ counting chamber	$= 0.1 \text{ mm}^3$
ปริมาตรที่ใช้ับเม็ดเลือดขาว	$= 4 \times 1 \times 1 \times 0.1 \text{ mm}^3$
	$= 0.4 \text{ mm}^3$
ปริมาตร 0.4 mm^3 นับเม็ดเลือดขาวได้	$= a \text{ cell}$
ปริมาตร 1 mm^3 จะนับได้	$= a \times 1 / 0.4 \text{ cell}$
เจือจางเม็ดเลือด 1 ต่อ 20 มีจำนวนเม็ดเลือดขาว	$= a / 0.4 \text{ cell}$
ถ้าไม่เจือจางจะมีจำนวนเม็ดเลือดขาว	$= (a / 0.4) \times (20 / 1) \text{ cell}$
	$= 50 a \text{ cell}$

ดังนั้นตัวคูณของการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวที่เจือจาง 1 : 20 และนับในพื้นที่ใหญ่ 4 ช่อง คือ 50

3.11.3 การจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาว

สำหรับการแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวด้วยวิธีการย้อมสีดิปควิก (Dip quick stain) โดยนำเลือดของปลานิลจำนวน 1 หยด มาหยดบนสไลด์แก้วที่ทำความสะอาดแล้ว 1 หยด ใช้สไลด์อีกแผ่นวางข้างหน้าหยดเลือด ทำมุม 45 องศา แล้วถอยกลับด้านหลังรอให้เลือดแผ่เต็มขอบสไลด์ จากนั้นไถเลือดให้แผ่เป็นฟิล์มบาง ๆ ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำสไลด์เลือดมาจุ่มใน Methyl alcohol จุ่มขึ้นลง 3-4 ครั้ง เพื่อตรึงสภาพ (Fix) ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วหยด Eosin เป็นเวลา 10 วินาที เทสีส่วนที่เกินจากสไลด์ออกให้สะอาด จากนั้นหยดด้วย Methylene Blue ทิ้งไว้ 10 วินาที จากนั้นล้างสีย้อมด้วยน้ำสะอาด ทิ้งไว้จนแห้ง หลังจากนั้นจึงนำสไลด์ไปจำแนกชนิดเม็ดเลือดขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพชนิดของเม็ดเลือดขาวที่จำแนก ได้แก่ โมโนไซต์, ลิมโฟไซต์, นิวโทรฟิล, อีโอซิโนฟิล และบาโซฟิล

3.11.4 ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit; Hct)

การวัดปริมาตรของเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Packed red blood cell volume) หรือฮีมาโตคริต ทำตามวิธีการของ Blaxhall and Daisley (1973) โดยจะใช้วิธี Micro capillary heamatocrit method ซึ่งจะเป็นการบรรจุเลือดปลาเข้าไปในหลอด Micro capillary ขนาดเล็กที่มีการเคลือบสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Heparinized) ไว้ที่ผิวด้านในปริมาตร 2 ใน 3 ของความยาวหลอด ดูดเลือดเข้าหลอดโดยการเอียงหลอดให้เลือดเข้าไปเกือบเต็มหลอด ให้เลือดอยู่ห่างจากปลายอีกด้านหนึ่งประมาณ 1 เซนติเมตร และปิดปลายด้านหนึ่งของหลอดด้วยดินน้ำมัน ทำตัวอย่างละ 5 หลอด จากนั้นนำไปวางบนจานเครื่องปั่น (Micro-haematocrit centrifuge) ควรวางปลายหลอดด้านที่มีดินน้ำมันอุดให้อยู่ชิดกับขอบนอกของจาน เพื่อป้องกันหลอดแตก ปิดฝาให้เข้าล็อก และปั่นตกตะกอนที่ความเร็วประมาณ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ปิดเครื่องร่อนเครื่องหยุด นำหลอดมาเปรียบเทียบกับ Haematocrit-reader อ่านค่า Packed cell volume คำนวณค่า Hematocrit (%) โดยวัดสัดส่วนของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่อปริมาตรของเลือดทั้งหมด ดังสูตร

$$\text{Hematocrit (\%)} = [\text{ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (ชม.)} / \text{ปริมาตรเม็ดเลือดทั้งหมด (ชม.)}] \times 100$$

3.12 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อวิทยาของปลานิล (Histological)

เมื่อสิ้นสุดการให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ สุ่มเก็บปลานิล 3 ตัวจากแต่ละชุด การทดลอง นำมาการุณยฆาตในน้ำมันกานพลู จากนั้นใช้อุปกรณ์ผ่าตัด เปิดช่องท้องปลา เพื่อนำ ตับ ม้าม ไต ลำไส้ และเหงือกออก นำมาดองใน 10% ฟอर्मาลีนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เมื่อครบจึงเปลี่ยนไป ดองใน 70% เอธิลแอลกอฮอล์ จนกว่าจะนำไปเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีการของ Humason (1962) ต่อไป

ขั้นตอนการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อ (Processing) ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (Dehydration)

การดึงน้ำออก เป็นขั้นตอนแรกในการเตรียมเนื้อเยื่อ โดยมีจุดประสงค์ในการกำจัดน้ำทั้งหมดที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อ เพื่อให้พาราฟินแว็กซ์จะสามารถแทรกซึมเข้าไปแทนที่ได้ การดึงน้ำออกจะใช้วิธีดุน้ำยาตองตัวอย่าง (Fixative) ออกจากขวดตัวอย่าง และล้างน้ำยาตองด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ โดยเติมให้ท่วมตัวอย่างแล้วดูดทิ้ง และแช่ 70% Ethanol ไว้อย่างน้อย 2 ชม. แล้วดูดทิ้ง จากนั้นแช่เนื้อเยื่อในสารละลายแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์อย่างน้อย 2 ชม. แล้วดูดทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) และสุดท้ายจะเป็นการแช่เนื้อเยื่อในสารละลายแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ (Absolute alcohol) (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) เพื่อให้การดึงน้ำออกเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์

2. การดึงแอลกอฮอล์ออกจากเนื้อเยื่อ (Clearing)

เนื่องจากแอลกอฮอล์ไม่สามารถรวมเป็นเนื้อเดียวกันกับพาราฟินแว็กซ์ได้ จึงจำเป็นต้องแช่เนื้อเยื่อในสารละลายที่สามารถผสมเป็นเนื้อเดียวกับทั้งแอลกอฮอล์ และพาราฟินแว็กซ์ (Clearing agent) ก่อน เป็นขั้นตอนเพื่อดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ ก่อนที่จะให้พาราฟินแว็กซ์แทรกซึมเข้าไป โดยทำการดุน 100% Ethanol ทิ้ง แล้วเติมไซลีน (Xylene) จากนั้นทิ้งไว้ 1 ชม.

3. การแทรกซึมด้วย Paraffin wax (Wax infiltration)

เป็นขั้นตอนในการให้พาราฟินแว็กซ์แทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะทำให้เนื้อเยื่อมีความแข็ง สามารถตัดออกเป็นแผ่นบาง ๆ ได้ ความแข็งของพาราฟินแว็กซ์ จะขึ้นอยู่กับจุดหลอมเหลว (Melting point) ยังมีจุดหลอมเหลวสูงก็ยิ่งมีความแข็งมากพาราฟินแว็กซ์ ที่ใช้กันทั่วไป จะมีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 54-58 องศาเซลเซียส ดำเนินการในตู้อบโดยใช้ Xylene:Wax1 ในอัตราส่วน 1:1 ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชม. เมื่อครบเวลา เท Xylene:Wax1 ทิ้ง แล้วเติม Wax1 ทิ้งไว้ 1 ชม. เมื่อครบเวลา เท Wax1 ทิ้ง แล้วเติม Wax2 ทิ้งไว้ 1 ชม. จากนั้นนำออกจากตู้อบมาไว้ในอุณหภูมิห้องเพื่อรอเข้าสู่กระบวนการฝังเนื้อเยื่อ (Embedding)

4. ขั้นตอนการฝังเนื้อเยื่อ และการตัดชิ้นเนื้อ (Embedding and sectioning)

นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อแล้วไปฝังในแว็กซ์ พาราฟิน (Wax paraffin) (โดยทั่วไปจะใช้ Paraplast) เรียกขั้นตอนนี้ว่าการตัดโดยวางชิ้นเนื้อเยื่อลงในเบ้า (Embedding mould) แล้วเติมพาราพลาส (Paraplast) เหลวลงไปจนเต็มเบ้า วางบนภาชนะเครื่องให้ความเย็น (Cooling) ทิ้งไว้พาราพลาสแข็ง จะได้ชิ้นเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ในพาราพลาส (Tissue block) ถอดเบ้าออก นำบล็อกเนื้อเยื่อ (Tissue block) ที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการตัด (Section) ต่อไป

การทริม (Trimming) ตัดแต่งหน้าตัด บล็อกตัวอย่างเนื้อเยื่อให้มีขนาด และรูปร่างพอดีกับสไลด์ที่จะใช้วางแผ่นเนื้อเยื่อ แล้วนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (Microtome) ให้มีขนาดความหนาประมาณ 5-7 ไมโครเมตร นำไปลอยในอ่างน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส (อาจเติมเจลาติน (gelatin) ลงไปในน้ำเล็กน้อย) แล้วใช้แผ่นสไลด์ซ้อนแผ่นเนื้อเยื่อที่ลอยอยู่ในอ่างน้ำขึ้นมา แล้วยกขึ้นเพื่อให้แผ่นเนื้อเยื่อติดกับสไลด์ นำสไลด์ไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 48 ชม. เพื่อให้แผ่นเนื้อเยื่อเกาะติดกับแผ่นสไลด์ดีขึ้น

5. ขั้นตอนการย้อมสีเนื้อเยื่อ (Tissue staining)

นำแผ่นสไลด์ไปผ่านการย้อมด้วยสีฮีมาท็อกซิลิน และอีโอซิน (Haematoxylin & Eosin; H&E) ขั้นตอนการย้อมสีหลัก ๆ ประกอบด้วย การละลายพาราพลาส (De-wax) ในแผ่นเนื้อเยื่อด้วยไซลีน จากนั้นจึงนำไปแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ที่ค่อย ๆ ลดความเข้มข้นลง เช่น จาก 100 เปอร์เซ็นต์ เป็น 95 เปอร์เซ็นต์, 70 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แล้วจึงผ่านการแช่ในสารละลายสีฮีมาท็อกซิลิน (Haematoxylin) และอีโอซิน (Eosin) ดังตาราง 9

ตาราง 9 ขั้นตอนการย้อมสีเนื้อเยื่อ (Tissue staining)

ขั้นตอน	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	Xylene	2
2	Xylene	2
3	Xylene	2
4	Isopropyl alcohol	2
5	Isopropyl alcohol	2
6	Absolute alcohol	2
7	95 % alcohol	2
8	95 % alcohol	2
9	70 % alcohol	2

ขั้นตอน	สารละลาย	เวลา (นาที)
10	70 % alcohol	2
11	50 % alcohol	2
12	Distilled water	1
13	Hematoxylin	5-20
14	Distilled water	1
15	50% alcohol	2
16	Eosin	2-3
17	70 % alcohol	2
18	70 % alcohol	2
19	95 % alcohol	2
20	95 % alcohol	2
21	Absolute alcohol	2
22	Isopropyl alcohol	2
23	Isopropyl alcohol	2
24	Xylene	2
25	Xylene	2

6. การปิดผนึกเป็นสไลด์ถาวร (Mounting)

นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมสีมาปิดผนึกเป็นสไลด์ถาวร โดยใช้ น้ำยาเปอร์เมาท์ (Permout) หยดลงบนสไลด์เนื้อเยื่อแล้วปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์ (Cover slip) ที่งอไว้ให้แห้ง และนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยที่นิวเคลียสจะย้อมติดสีน้ำเงินของฮีมาทอกซิลิน (Haematoxylin) ส่วนไซโตพลาสซึมเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เม็ดเลือดแดง และกล้ามเนื้อจะย้อมติดสีแดงหรือสีชมพูของอีโอซิน (Eosin)

3.13 การทดสอบการแสดงออกของยีน HSP70 และยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล (Gene expression in Nile tilapia)

เมื่อสิ้นสุดการให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ ทำการสุ่มเก็บปลานิล 3 ตัวในถังจากแต่ละชุดการทดลอง มาทำการการุณยฆาตด้วยน้ำมันกานพลู 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และผ่าช่องท้องเพื่อนำตับมาแช่ด้วยไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen) และทำให้ตัวอย่างเนื้อเยื่อตับละเอียดเป็นผงด้วยโกร่งบด ก่อนที่จะนำไปทดสอบการแสดงออกของยีน ซึ่งมีวิธีการ ดังนี้

3.13.1 การสกัด RNA (Total RNA extraction)

- 1) นำตัวอย่างตับที่ละเอียดแล้วใส่ลงในหลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม TRK Lysis Buffer 700 ไมโครลิตร
- 2) นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนใสมาใส่หลอด centrifuge อันใหม่
- 3) เติม 70% ethanol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำมา vortex ผสมให้เข้ากัน
- 4) ปิเปิดตัวอย่างที่ vortex แล้ว ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำมาใส่ใน mini column ที่อยู่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที และทำซ้ำ 1 ครั้ง
- 5) เติม RNA Wash Buffer (I) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบ เป็นเวลา 30 วินาที
- 6) เติม RNA Wash Buffer (II) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที และทำซ้ำ 1 ครั้ง
- 7) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 2 นาที เพื่อบั่นให้แห้ง จากนั้นย้ายตัวอย่างจาก mini column นำใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร
- 8) เติม Nuclease free water ปริมาตร 40 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 2 นาที
- 9) นำตัวอย่างไปตรวจสอบความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของ RNA โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3.13.2 การสังเคราะห์ cDNA (cDNA synthesis)

นำ total RNA มาทำการสังเคราะห์ cDNA ด้วยกระบวนการ Reverse transcription โดยใช้ชุดสำเร็จรูป iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR เตรียมดังนี้

- 1) iScript RT Supermix 4 ไมโครลิตร
- 2) RNA template 1 ไมโครลิตร
- 3) Nuclease free water 15 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันโดยการปิเปิดขึ้นลงหลาย ๆ ครั้ง และนำเข้าเครื่อง Thermal Cycler ตั้งค่าปฏิกิริยา ดังนี้ Priming 25 องศาเซลเซียส 5 นาที, Reverse transcription 46 องศาเซลเซียส 20 นาที และ RT inactivation 95 องศาเซลเซียส 1 นาที จากนั้นนำ cDNA ที่ได้เก็บไว้ที่ -20 °C จนกว่าจะใช้สำหรับการวิเคราะห์ PCR แบบเรียลไทม์

3.13.3 PCR แบบเรียลไทม์ (Quantitative real-time PCR)

การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อตับของปลาทดลอง โดยยีนที่ศึกษา ได้แก่ HSP70, TNF- α , และ IL-6 โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบลำดับเบสที่จำเพาะเจาะจงไว้ และใช้ยีน β -actin เป็นยีนควบคุม จากนั้นทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเครื่อง Real-time qPCR โดยใช้ SensiFAST SYBR No-ROX Mix (2x) โดยกำหนดให้มีสภาวะการทำงาน ดังนี้ ช่วงแรกใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที 1 รอบ ตามด้วย 40 รอบ ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที (Denaturation) และช่วงที่สาม 60 องศาเซลเซียส (Annealing/Extension) เป็นเวลา 30 วินาที

3.14 การทดสอบการเคลื่อนที่ของแผ่นปิดเหงือกในปลานิลที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Operculum movement)

เมื่อสิ้นสุดการให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ สุ่มเก็บปลานิล 5 ตัวจากแต่ละชุดการทดลอง นำมาเลี้ยงในถังพลาสติกที่บรรจุน้ำ จากนั้นใช้เครื่องฮีตเตอร์ปรับอุณหภูมิ ให้เพิ่มขึ้น 1 องศาเซลเซียสทุก 1 ชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ที่อุณหภูมิ 28, 32, 36, และ 40 องศาเซลเซียส บันทึกพฤติกรรมของปลาระหว่างการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ นับจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือก (Operculum) (จำนวนครั้งต่อนาที) สังเกตอาการของปลาหากปลาเกิดการสูญเสียสมดุล เช่น จมลงด้านล่างภาชนะเลี้ยง ปลามีอาการหายใจหอบ หรือลอยตัวนิ่งไม่เคลื่อนไหว ถือเป็นอันสิ้นสุดการทดลอง (Khieokhajonkhet et al., 2022)

3.15 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical analysis)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD, completely randomized design) นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้งหมดไปหาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ข้อมูลของการทดลอง โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA (Analysis of variance) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติ โดยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS (Version 27.0)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การศึกษานี้แบ่งเป็น 6 หัวข้อ คือ ศึกษาปริมาณสารสำคัญในใบกัญชาได้ช่อดอก (Sugar leaf), ผลของอาหารเสริมใบกัญชาต่อการเจริญเติบโต (Growth performance), ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed performance) และองค์ประกอบทางเคมีของซากปลานิล (Chemical composition), ผลของอาหารเสริมใบกัญชาต่อค่าโลหิตวิทยาของปลานิล (Hematology), ผลของอาหารเสริมใบกัญชาต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของปลานิล (Histological assessments), ผลของอาหารเสริมใบกัญชาต่อการแสดงออกของยีน HSP70 และยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในปลานิล (Gene expression) และผลของอาหารเสริมใบกัญชาต่อจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกในปลานิลที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Operculum movement) ซึ่งผลการทดลองแต่ละหัวข้อมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

4.1 ปริมาณสารสำคัญในใบกัญชาได้ช่อดอก

จากการนำใบกัญชาได้ช่อดอกไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยวิธีการ Inhouse method based on AOAC 2018.10 พบว่า ใบกัญชาได้ช่อดอกมีสาร Cannabidiol (CBD) ปริมาณ 10.42 ppm หรือ (0.001042 เปอร์เซ็นต์) และ Tetrahydrocannabinol (THC) ปริมาณ 0.51 ppm หรือ (0.000051 เปอร์เซ็นต์) และการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการต่าง ๆ ในใบกัญชาได้ช่อดอกตามวิธีของ AOAC (1990) ผลการศึกษา พบว่า ใบกัญชาได้ช่อดอก ประกอบด้วย โปรตีน 17.04 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 19.05 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 7.96 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 18.05 เปอร์เซ็นต์ และเยื่อใย 16.43 เปอร์เซ็นต์

4.2 ผลของอาหารเสริมใบกัญชาต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และองค์ประกอบทางเคมีของซากปลานิล

การใช้ใบกัญชาเสริมในอาหารปลานิล ซึ่งแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง โดยให้อาหารเสริมกัญชาในปริมาณที่ต่างกันทั้งหมด 4 ชุด คือ การทดลองที่ 1 อาหารที่ไม่มีการเสริมใบกัญชา (Control) (T1), การทดลองที่ 2 อาหารเสริมใบกัญชาที่ระดับ 10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (T2), การทดลองที่ 3 อาหารเสริมใบกัญชาที่ระดับ 20 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (T3) และการทดลองที่ 4 อาหารเสริมใบกัญชาที่ระดับ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (T4) ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

4.2.1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว (Average body weight)

การศึกษาการใช้อาหารเสริมไบโกลูซิงที่ระดับแตกต่างกัน 4 ระดับ ประกอบด้วย 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่า ปลาที่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นจากน้ำหนักเริ่มต้น (ตาราง 10) โดยปลาจากแต่ละชุดการทดลองมีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ยต่อตัวอยู่ในช่วง 6.65 ± 0.02 - 6.69 ± 0.04 กรัม ($p > 0.05$) น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสัปดาห์ที่ 2 มีค่าอยู่ในช่วง 8.91 ± 0.24 - 9.49 ± 0.1 กรัม โดยปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่ 1 มีค่าสูงสุด มีค่าเท่ากับ 9.49 ± 0.1 กรัม รองลงมาคือ ปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่ 2 และ 3 มีค่าเท่ากับ 9.47 ± 0.36 และ 9.14 ± 0.37 กรัม ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ส่วนปลาที่ได้รับอาหาร T4 มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวต่ำสุด มีค่าเท่ากับ 8.91 ± 0.24 กรัม ซึ่งแตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่ 1 และ 2 ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่ 3 ($p > 0.05$) น้ำหนักเฉลี่ยสัปดาห์ที่ 4 มีค่าอยู่ในช่วง 13.06 ± 0.30 - 13.74 ± 0.61 กรัม โดยปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่ 2 มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวมากที่สุด เท่ากับ 13.74 ± 0.61 กรัม รองลงมาคือ ปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่ 1, 4 และ 3 เท่ากับ 13.50 ± 0.80 , 13.09 ± 0.44 และ 13.06 ± 0.30 กรัม ตามลำดับ ($p > 0.05$) สอดคล้องไปยังสัปดาห์ที่ 6 พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสัปดาห์ที่ 6 มีค่าอยู่ในช่วง 18.24 ± 0.69 - 19.39 ± 0.79 กรัม โดยปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่ 2 มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวมากที่สุด รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่ 1, 3 และ 4 ตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 19.39 ± 0.79 , 19.31 ± 1.47 , 18.52 ± 0.17 และ 18.24 ± 0.69 กรัม ตามลำดับ ($p > 0.05$) น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสัปดาห์ที่ 8 อยู่ในช่วง 22.38 ± 0.72 - 24.96 ± 1.45 ซึ่งปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่ 1 มีค่าสูงสุด เท่ากับ 24.96 ± 1.45 กรัม รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่ 2 และ 3 เท่ากับ 23.57 ± 0.97 และ 23.38 ± 0.76 กรัม ตามลำดับ ($p > 0.05$) และปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่ 4 มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวต่ำสุด มีค่าเท่ากับ 22.38 ± 0.72 กรัม ซึ่งแตกต่างกันเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่ 2 และ 3 ($p > 0.05$) และสัปดาห์ที่ 10 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว ค่าอยู่ในช่วง 25.52 ± 1.50 - 27.67 ± 1.51 กรัม โดยปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่ 1 มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวมากที่สุด รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่ 2, 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 27.67 ± 1.51 , 26.58 ± 1.03 , 26.28 ± 1.92 และ 25.52 ± 1.50 กรัม ตามลำดับ ($p > 0.05$)

ตาราง 10 น้ำหนักเฉลี่ยของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมใบกล้วยงที่ระดับต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ (กรัม/ตัว)

สัปดาห์ที่/ ชุดการ ทดลอง	น้ำหนักเฉลี่ยของปลานิลในแต่ละสัปดาห์ (กรัม/ตัว)			
	T1	T2	T3	T4
	(0 ก./กก.)	(10 ก./กก.)	(20 ก./กก.)	(40 ก./กก.)
0	6.65±0.02 ^a	6.69±0.04 ^a	6.68±0.02 ^a	6.66±0.04 ^a
2	9.49±0.15 ^a	9.47±0.36 ^a	9.14±0.37 ^{ab}	8.91±0.24 ^b
4	13.50±0.80 ^a	13.74±0.61 ^a	13.06±0.30 ^a	13.09±0.44 ^a
6	19.31±1.47 ^a	19.39±0.79 ^a	18.52±0.17 ^a	18.24±0.69 ^a
8	24.96±1.45 ^a	23.57±0.97 ^{ab}	23.38±0.76 ^{ab}	22.38±0.72 ^b
10	27.67±1.51 ^a	26.58±1.03 ^a	26.28±1.92 ^a	25.52±1.50 ^a

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D., n=4) ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวนอน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05)

4.2.2 การเจริญเติบโต (Growth performance)

การศึกษาการใช้อาหารเสริมใบกล้วยงที่ระดับแตกต่างกัน 4 ระดับประกอบด้วย 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ต่อการเจริญเติบโตของปลานิล พบว่า มีค่าใกล้เคียงกัน (ตาราง 11) และไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) ประกอบด้วย น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย โดยในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 มีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายสูงสุด เท่ากับ 27.67±1.51 กรัมต่อตัว รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2, 3 และ 4 เท่ากับ 26.58±1.03, 26.28±1.92 และ 25.52±1.50 กรัมต่อตัว ตามลำดับ (p>0.05) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 มีค่าสูงสุด เท่ากับ 316.12±21.98 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2, 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 297.12±13.66, 293.64±28.99 และ 283.18±23.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (p>0.05) น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มต่อวันในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 มีค่าสูงสุด เท่ากับ 0.30±0.02 กรัมต่อตัว รองลงมาคือ ปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2, 3 และ 4 ค่าเท่ากับ 0.28±0.01, 0.28±0.03 และ 0.27±0.03 กรัมต่อตัว ตามลำดับ (p>0.05) อัตราการเจริญเติบโตเฉพาะในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 มีค่าสูงสุด เท่ากับ 2.04±0.08 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2, 3 และปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 4 มีอัตราการเจริญเติบโตเฉพาะต่ำสุด เท่ากับ 1.93±0.10 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน (p>0.05) ค่าปัจจัยน้ำของหนักต่อความยาวในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 มีค่าสูงสุด เท่ากับ 3.52±0.22 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับ

อาหารในการทดลองที่ 3 และปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2 และ 4 มีค่าปัจจัยน้ำหนักต่อความยาวต่ำสุด เท่ากับ 3.41 ± 0.33 และ 3.41 ± 0.26 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ ($p > 0.05$) ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักตับในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 มีค่าสูงสุด เท่ากับ 1.89 ± 0.80 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 4, 2 และ 3 มีค่าเท่ากับ 1.50 ± 0.36 และ 1.50 ± 0.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ($p > 0.05$) ค่าดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักอวัยวะภายในในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2 และ 4 มีค่าสูงสุด เท่ากับ 8.41 ± 0.83 และ 8.41 ± 0.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 3 และ 1 มีค่าดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักอวัยวะภายในต่ำสุด เท่ากับ 8.19 ± 0.96 เปอร์เซ็นต์ ($p > 0.05$) อัตราการรอดตายของปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 3 มีค่าสูงสุด คือ 95.00 ± 6.38 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2 และ 4 ส่วนปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 มีอัตราการรอดตายต่ำสุด เท่ากับ 86.67 ± 10.89 เปอร์เซ็นต์ ($p > 0.05$)



ตาราง 11 การเจริญเติบโตของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมใบกล้วยที่ระดับต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

ตัวชี้วัด	T1 (0 ก./กก.)	T2 (10 ก./กก.)	T3 (20 ก./กก.)	T4 (40 ก./กก.)
น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัม/ตัว)	6.65±0.02 ^a	6.69±0.04 ^a	6.68±0.02 ^a	6.66±0.04 ^a
น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม/ตัว)	27.67±1.51 ^a	26.58±1.03 ^a	26.28±1.92 ^a	25.52±1.50 ^a
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%)	316.12±21.98 ^a	297.12±13.66 ^a	293.64±28.99 ^a	283.18±23.50 ^a
น้ำหนักเพิ่มต่อวัน (กรัม/ตัว)	0.30±0.02 ^a	0.28±0.01 ^a	0.28±0.03 ^a	0.27±0.02 ^a
อัตราการเติบโตจำเพาะ (%/วัน)	2.04±0.08 ^a	1.97±0.05 ^a	1.95±0.10 ^a	1.92±0.09 ^a
ค่าปัจจัยของน้ำหนักต่อความยาว (กรัม/ลบ.ซม.)	3.52±0.22 ^a	3.41±0.33 ^a	3.45±0.36 ^a	3.41±0.26 ^a
ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักตับ (%)	1.89±0.80 ^a	1.50±0.36 ^a	1.50±0.64 ^a	1.75±0.83 ^a
ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักอวัยวะภายใน (%)	8.19±0.96 ^a	8.41±0.83 ^a	8.37±1.92 ^a	8.41±0.64 ^a
อัตราการรอดตาย (%)	86.67±10.89 ^a	93.33±5.44 ^a	95.00±6.38 ^a	88.33±10.00 ^a

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D., n=4) ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวนอน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

4.2.3 ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed performance)

ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมไบโกลูซิง 4 ระดับ ประกอบด้วย 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (ตาราง 12) พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 มีปริมาณการกินอาหารสูงสุด มีค่าเท่ากับ 39.38 ± 4.79 กรัมต่อตัว รองลงมาคือ การทดลองที่ 4 และ 2 ($p > 0.05$) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมในการทดลองที่ 3 มีปริมาณการกินอาหารต่ำสุด ค่าเท่ากับ 32.82 ± 2.55 กรัมต่อตัว และมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2 และ 4 ($p > 0.05$) อัตราการกินอาหารในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 4 มีค่าสูงสุด มีค่าเท่ากับ 71.11 ± 5.58 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ กลุ่มที่ 2, 1 และ 3 ($p > 0.05$) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 และ 4 มีค่าสูงสุด รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2, 1 และ 3 มีค่าเท่ากับ 1.89 ± 0.34 , 1.89 ± 0.10 , 1.75 ± 0.17 และ 1.68 ± 0.14 ตามลำดับ ($p > 0.05$) ประสิทธิภาพการใช้อาหารในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 3 มีค่าสูงสุด เท่ากับ 59.81 ± 4.96 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2, 1 และปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 4 มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำสุด แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตาราง 12 ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมไบโกลูซิงที่ระดับต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

ตัวชี้วัด	T1 (0 ก./กก.)	T2 (10 ก./กก.)	T3 (20 ก./กก.)	T4 (40 ก./กก.)
ปริมาณอาหารที่ปลากิน (กรัม/ตัว)	39.38 ± 4.79^a	34.65 ± 2.05^{ab}	32.82 ± 2.55^b	35.61 ± 4.10^{ab}
อัตราการกินอาหาร (%)	69.02 ± 4.38^a	69.64 ± 3.55^a	68.37 ± 6.51^a	71.11 ± 5.58^a
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก	1.89 ± 0.34^a	1.75 ± 0.17^a	1.68 ± 0.14^a	1.89 ± 0.10^a
ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (%)	54.23 ± 9.63^a	57.61 ± 5.38^a	59.81 ± 4.96^a	53.16 ± 2.89^a

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ S.D., n=4) ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวนอน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.2.4 องค์ประกอบทางเคมีของซากปลานิล (Chemical composition)

องค์ประกอบทางเคมีของซากปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมไบโกลูซิงระดับแตกต่างกัน 4 ระดับ ประกอบด้วย 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ (ตาราง 13) พบว่าโปรตีนในปลาสิ้นสุดการทดลอง มีค่าเท่ากับ 61.69 ± 2.32 , 60.20 ± 3.73 , 60.27 ± 1.59 และ

60.13±1.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งโปรตีนในปลาสิ้นสุดการทดลองมีค่ามากกว่าในปลาเริ่มต้นการทดลองซึ่งมีค่าเท่ากับ 57.12±1.72 เปอร์เซ็นต์ ในทุกหน่วยทดลอง ไขมันในปลาเริ่มต้นในทุกหน่วยทดลองมีค่าเท่ากับ 14.30±1.86 เปอร์เซ็นต์ และไขมันในปลาสิ้นสุดการทดลองของปลานิลที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 มีค่าสูงสุด และมีค่าเท่ากับ 20.07±0.18 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ส่วนไขมันในปลาสิ้นสุดการทดลองในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 4 ที่มีค่าต่ำสุด มีค่าเท่ากับ 14.45±0.28 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกันกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) ความชื้นในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 4 มีค่าสูงสุด มีค่าเท่ากับ 9.30±0.07 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 3 ($p>0.05$) ส่วนในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 มีความชื้นต่ำสุด และแตกต่างกันกับปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2, 3 และ 4 ($p<0.05$) ถ้าในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 4 มีค่าสูงสุด มีค่าเท่ากับ 21.53±0.67 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1, 2 และ 3 ($p<0.05$) การเก็บรักษาโปรตีนในปลาที่ได้รับอาหารจากการทดลองที่ 1 มีค่าสูงสุด มีค่าเท่ากับ 8.00±4.07 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 4, 3 และ 2 ($p>0.05$) การเก็บรักษาไขมันของปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 มีค่าสูงสุด มีค่าเท่ากับ 40.31±1.27 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2 ($p>0.05$) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 4 มีการเก็บรักษาไขมันต่ำสุด มีค่าเท่ากับ 1.08±2.01 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกันกับปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1, 2 และ 3 ($p<0.05$)

ตาราง 13 องค์ประกอบทางเคมีของซากปลานิล (เปอร์เซ็นต์)

ตัวชี้วัด	T1 (0 ก./กก.)	T2 (10 ก./กก.)	T3 (20 ก./กก.)	T4 (40 ก./กก.)
โปรตีนปลาเริ่มต้น (%)	57.12±1.72 ^a	57.12±1.72 ^a	57.12±1.72 ^a	57.12±1.72 ^a
โปรตีนปลาสิ้นสุด (%)	61.69±2.32 ^a	60.20±3.73 ^a	60.27±1.59 ^a	60.13±1.80 ^a
ไขมันปลาเริ่มต้น (%)	14.30±1.86 ^a	14.30±1.86 ^a	14.30±1.86 ^a	14.30±1.86 ^a
ไขมันปลาสิ้นสุด (%)	20.07±0.18 ^a	19.53±0.90 ^a	17.79±0.13 ^b	14.45±0.28 ^c
ความชื้น (%)	7.62±0.37 ^c	8.58±0.08 ^b	8.92±0.02 ^b	9.30±0.07 ^a
เถ้า (%)	18.36±0.18 ^b	18.29±0.11 ^b	17.99±0.22 ^b	21.53±0.67 ^a
การเก็บรักษาโปรตีน (%)	8.00±4.07 ^a	5.39±6.53 ^a	5.52±2.78 ^a	6.60±3.71 ^a
การเก็บรักษาไขมัน (%)	40.31±1.27 ^a	36.54±6.32 ^a	24.39±0.96 ^b	1.08±2.01 ^c

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D., n=3) ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวนอน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

4.3 ผลของอาหารเสริมไบโกลูซังต่อค่าโลหิตวิทยาของปลานิล (Hematology)

4.3.1 ค่าโลหิตวิทยาของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมไบโกลูซัง

ค่าโลหิตวิทยาของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมไบโกลูซังระดับแตกต่างกัน 4 ระดับ ประกอบด้วย 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ (ตาราง 14) พบว่า จำนวนเม็ดเลือดขาวในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 มีค่าสูงสุด มีค่าเท่ากับ $1.74 \pm 0.68 \times 10^5$ เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2 และ 4 ส่วนปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 3 มีจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำสุด ($p > 0.05$) จำนวนเม็ดเลือดแดงในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 4 มีค่าสูงสุด มีค่าเท่ากับ $9.27 \pm 1.92 \times 10^6$ เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 3 และ 2 ส่วนปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 มีจำนวนเม็ดเลือดแดงต่ำสุด ($p > 0.05$) ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2 มีค่าสูงสุด มีค่าเท่ากับ 23.83 ± 6.42 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 3 และ 4 ส่วนปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 มีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่ำสุด ($p > 0.05$)

ตาราง 14 ค่าโลหิตวิทยาของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมกัญชง เป็นเวลา 10 สัปดาห์

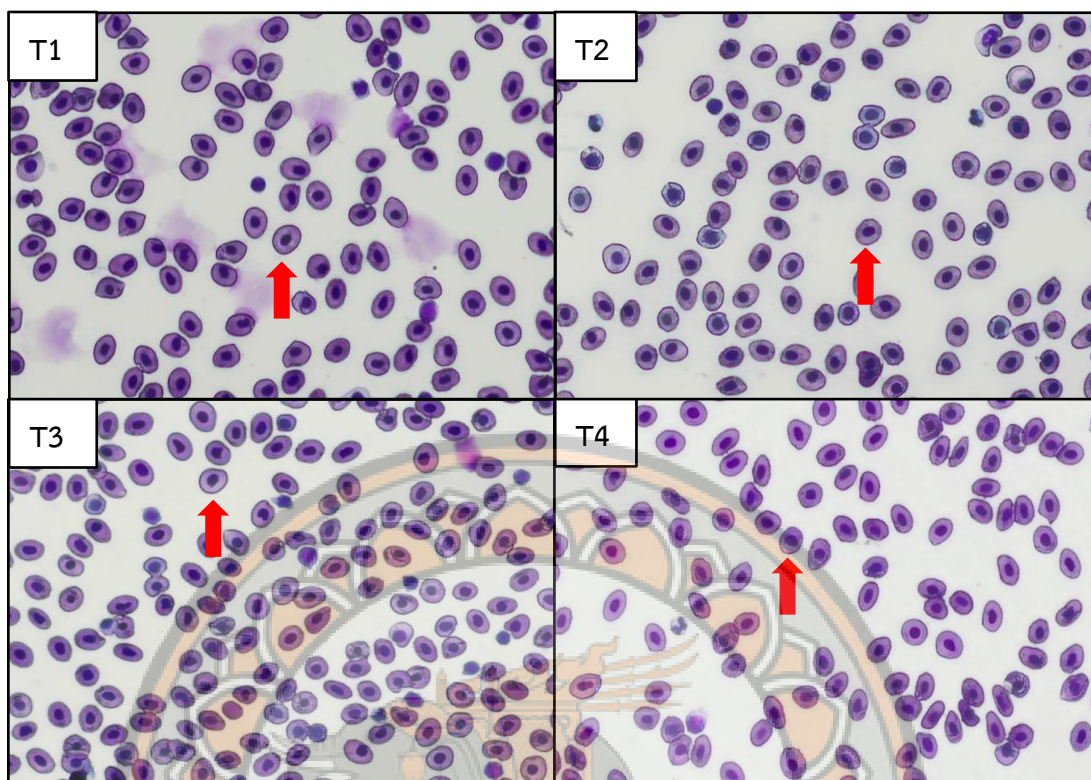
ตัวชี้วัด	T1 (0 ก./กก.)	T2 (10 ก./กก.)	T3 (20 ก./กก.)	T4 (40 ก./กก.)
จำนวนเม็ดเลือดขาว ($\times 10^5$ เซลล์/ลบ.มม.)	1.74 $\pm$ 0.68 ^a	1.72 $\pm$ 0.51 ^a	1.51 $\pm$ 0.65 ^a	1.64 $\pm$ 0.63 ^a
จำนวนเม็ดเลือดแดง ($\times 10^6$ เซลล์/ลบ.มม.)	8.88 $\pm$ 1.05 ^a	8.94 $\pm$ 3.01 ^a	9.01 $\pm$ 1.03 ^a	9.27 $\pm$ 1.92 ^a
ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%)	19.42 $\pm$ 6.05 ^a	23.83 $\pm$ 6.42 ^a	22.33 $\pm$ 6.51 ^a	22.25 $\pm$ 5.47 ^a

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ S.D., n=4) ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวนอน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

4.3.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาเซลล์เม็ดเลือดของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชง

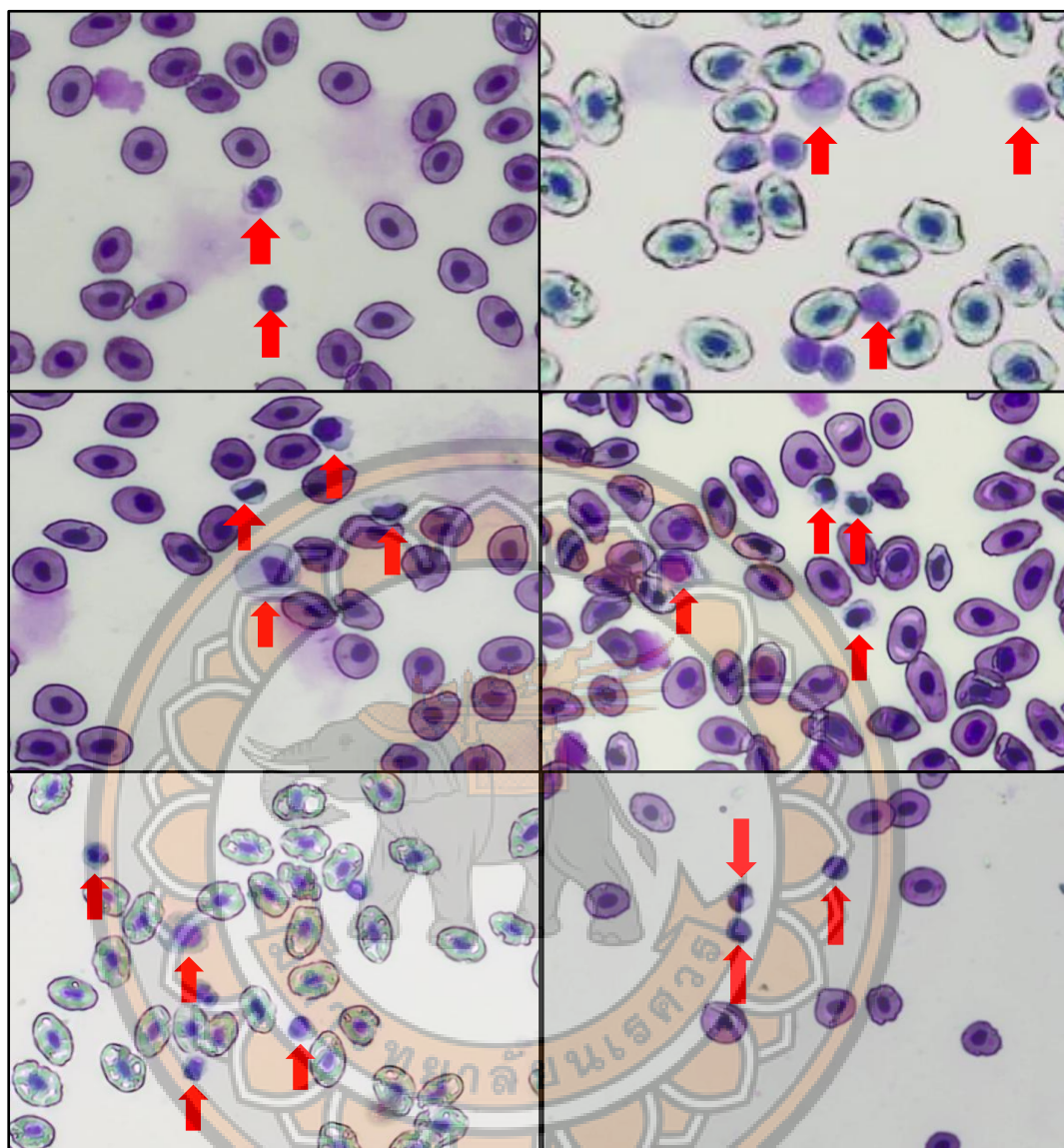
จากการศึกษาสัณฐานวิทยาเซลล์เม็ดเลือดของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชง โดยใช้เทคนิคการย้อมสี Dip Quick แล้วเปรียบเทียบลักษณะรูปร่าง และการติดสีของเซลล์เม็ดเลือด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x เพื่อจำแนกชนิด และลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

- 1) กลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Red blood cell) มีนิวเคลียสตรงกลางเซลล์ สามารถมองเห็นได้ชัด ขอบเซลล์ย้อมติดสีม่วงชัดเจน (ภาพ 13)
- 2) กลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดขาวซึ่งสามารถจำแนกออกเป็นกลุ่มที่มีนิวเคลียสหลายรูปร่าง ได้แก่ Lymphocyte, Monocyte, Neutrophil, Eosinophil และ Basophil (ภาพ 14-17)

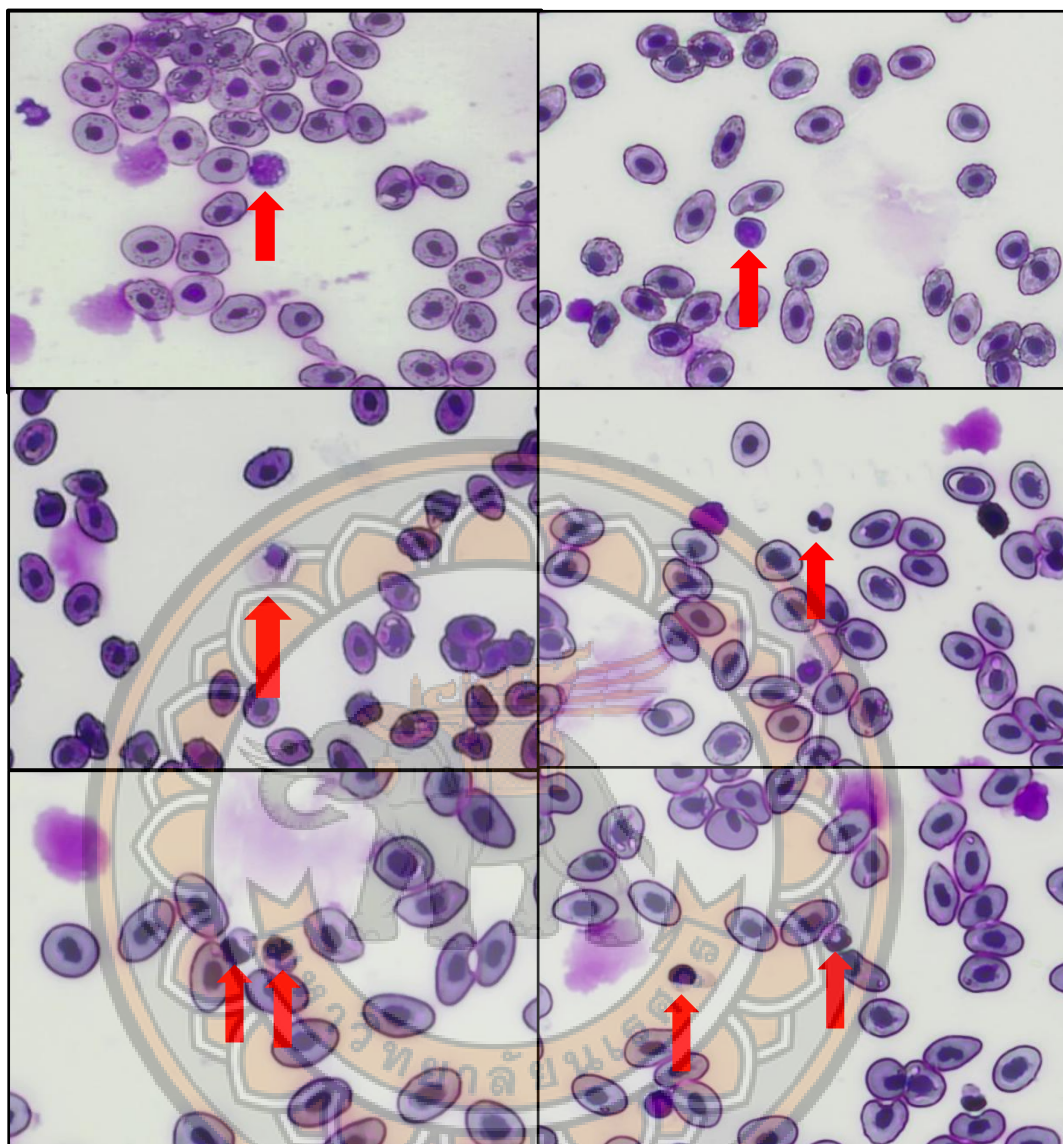


ภาพ 13 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดแดง (ลูกศรสีแดง) ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมไบโกลูซิงที่ระดับต่าง ๆ

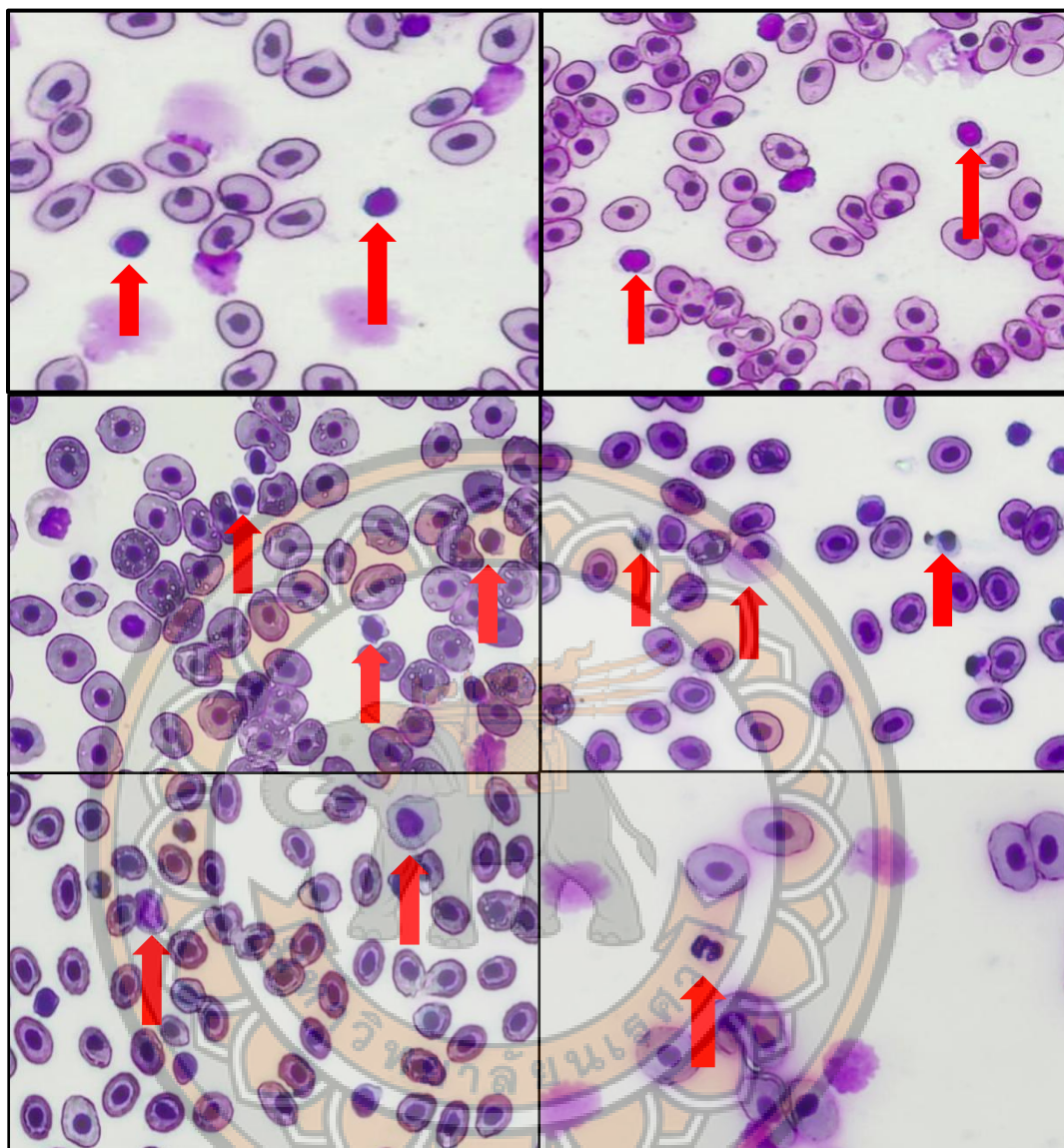
การทดลอง T1 (0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร), การทดลอง T2 (10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร), การทดลอง T3 (20 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) และการทดลอง T4 (40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร), ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x



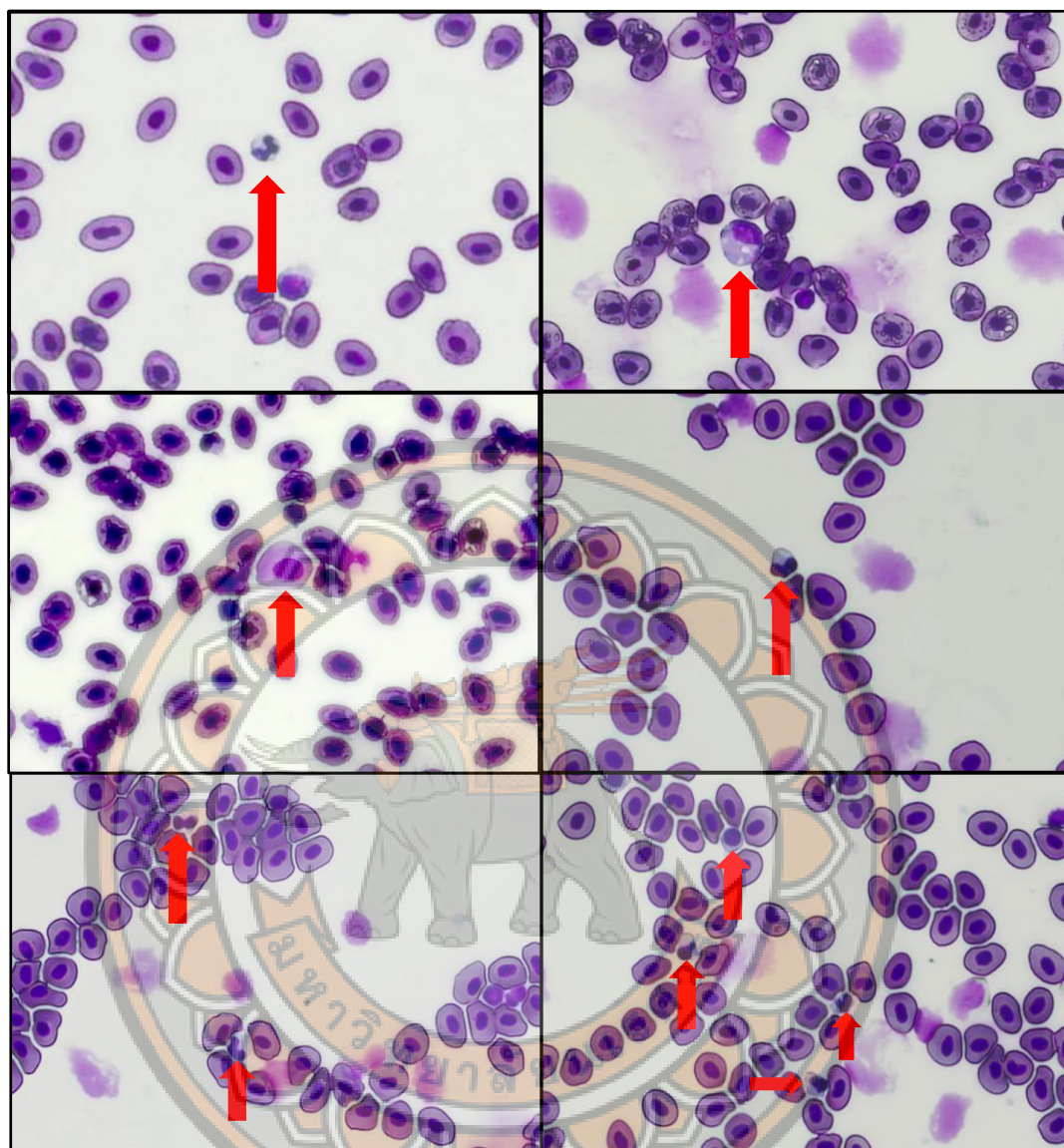
ภาพ 14 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาว (ลูกศรสีแดง) ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกล้วยง
การทดลอง T1 (0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร), ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x



ภาพ 15 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาว (ลูกศรสีแดง) ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกล้วยง
การทดลอง T2 (10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร), ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x



ภาพ 16 ลักษณะของเซลล์เม็ตเล็ดขาว (ลูกศรสีแดง) ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกล้วยง
การทดลอง T3 (20 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร), ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x



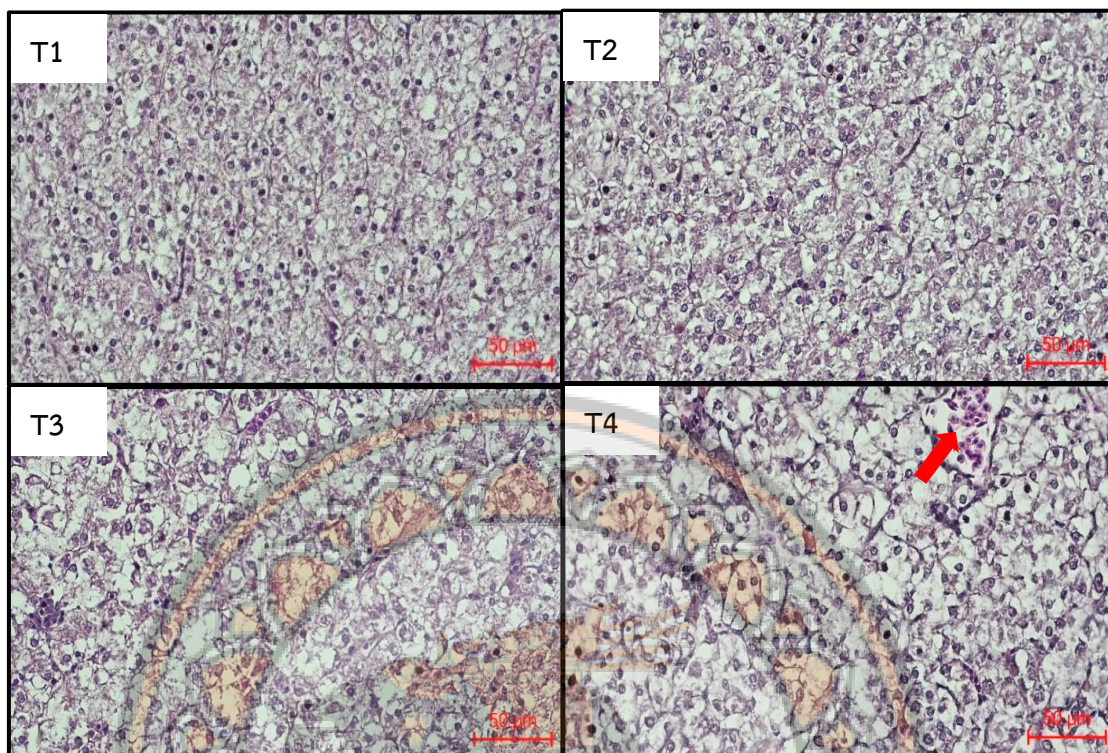
ภาพ 17 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาว (ลูกศรสีแดง) ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกล้วยง
การทดลอง T4 (40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร), ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์กำลังขยาย 40x

4.4 ผลของอาหารเสริมไบโกลูซงต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของปลานิล

4.4.1 เนื้อเยื่อตับ (Liver tissues)

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของตับปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมไบโกลูซง ระดับแตกต่างกัน 4 ระดับ ประกอบด้วย 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า ในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารในการทดลองที่ 1 และ 2 พบว่า เนื้อเยื่อตับเห็นช่องว่างในไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) และมีนิวเคลียส (Nucleus) กลมอยู่ตรงกลางเซลล์ ในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารในการทดลองที่ 3 และ 4 พบว่า มีการสะสมของเม็ดไขมันที่มีลักษณะเป็นแวนคิวโอล (Vacuole) แทรกอยู่ในเนื้อตับ มีบางเซลล์ที่นิวเคลียสถูกดันไปอยู่ริมเซลล์ ทำให้สังเกตเห็นช่องว่างในไซโตพลาสซึมมากขึ้น (Vacuolation) นอกจากนี้ในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารในการทดลองที่ 4 มีการซึมของเลือด (Hemorrhage) อยู่บางจุด (ลูกศรสีแดง) (ภาพ 18) แสดงให้เห็นว่าการเสริมไบโกลูซงในการทดลองที่ 1 และ 2 ปลา มีลักษณะเนื้อเยื่อตับที่มีสภาพปกติ แต่ในการทดลองที่ 3 และ 4 ที่มีการเสริมไบโกลูซงที่ระดับ 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาไปในทางที่แย่ลง



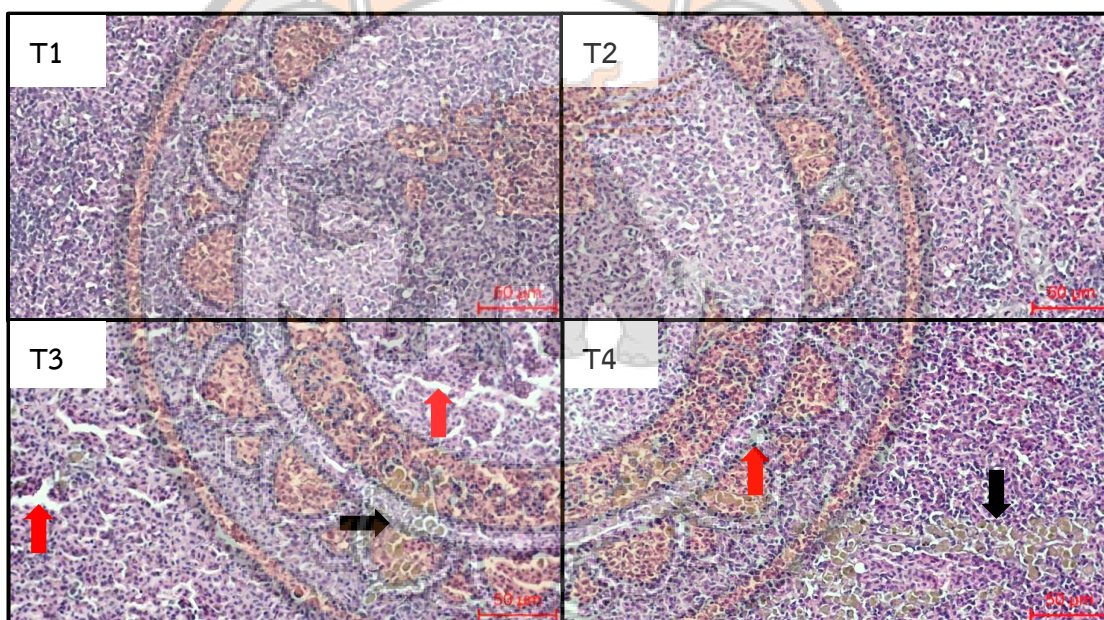


ภาพ 18 ลักษณะของเนื้อเยื่อตับของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกล้วยขง

การทดลอง T1 (0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร), การทดลอง T2 (10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร),
การทดลอง T3 (20 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) และการทดลอง T4 (40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร),
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x, ลูกศรสีแดงแสดงถึงการการซึมของเลือด (Hemorrhage)

4.4.2 เนื้อเยื่อม้าม (Spleen tissues)

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของม้ามปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมไบโกลูซิงระดับแตกต่างกัน 4 ระดับ ประกอบด้วย 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า ในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารในการทดลองที่ 1 และ 2 เนื้อเยื่อมีความแน่น แต่ในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารในการทดลองที่ 3 และ 4 เนื้อเยื่อม้ามมีลักษณะแตกออกจากกัน (ลูกศรสีแดง) พบ Melano-macrophage centers (MMC) กระจายอยู่ (ลูกศรสีดำ) (ภาพ 19) แสดงให้เห็นว่าการเสริมไบโกลูซิงในการทดลองที่ 1 และ 2 ปลามีลักษณะเนื้อเยื่อม้ามที่มีสภาพปกติ แต่ในการทดลองที่ 3 และ 4 ที่มีการเสริมไบโกลูซิงที่ระดับ 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาไปในทางที่แย่ลง

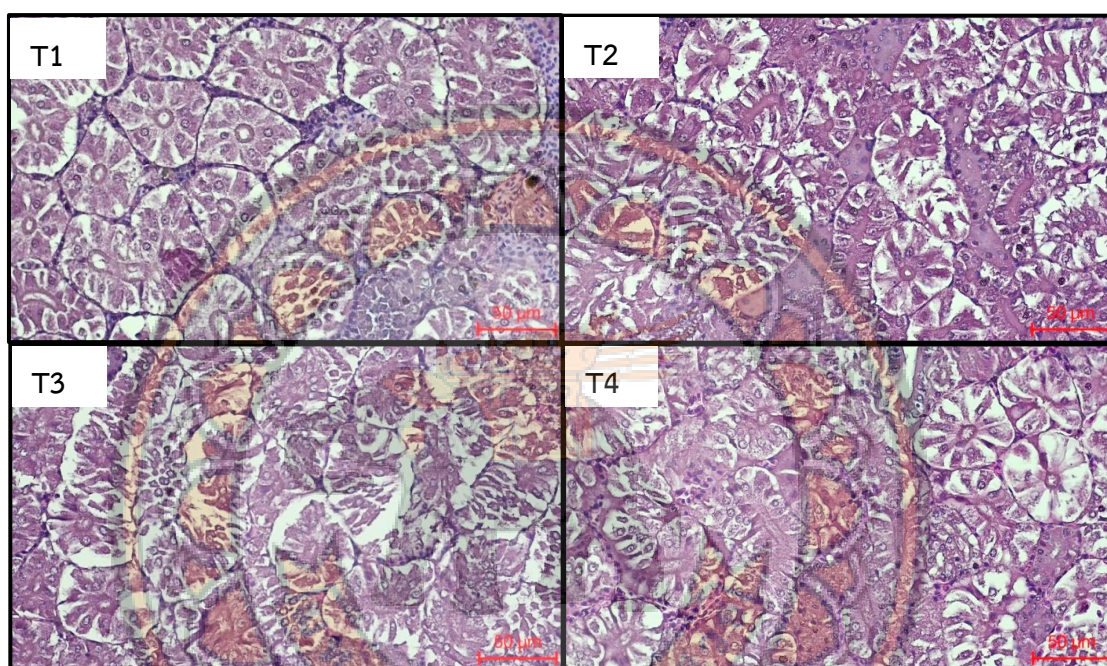


ภาพ 19 ลักษณะของเนื้อเยื่อม้ามของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมไบโกลูซิง

การทดลอง T1 (0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร), การทดลอง T2 (10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร), การทดลอง T3 (20 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) และการทดลอง T4 (40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร), ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x, ลูกศรสีแดงแสดงถึงเซลล์ที่แตกออกจากกัน และลูกศรสีดำแสดงถึง Melano-macrophage centers (MMC)

4.4.3 เนื้อเยื่อไต (Kidney tissues)

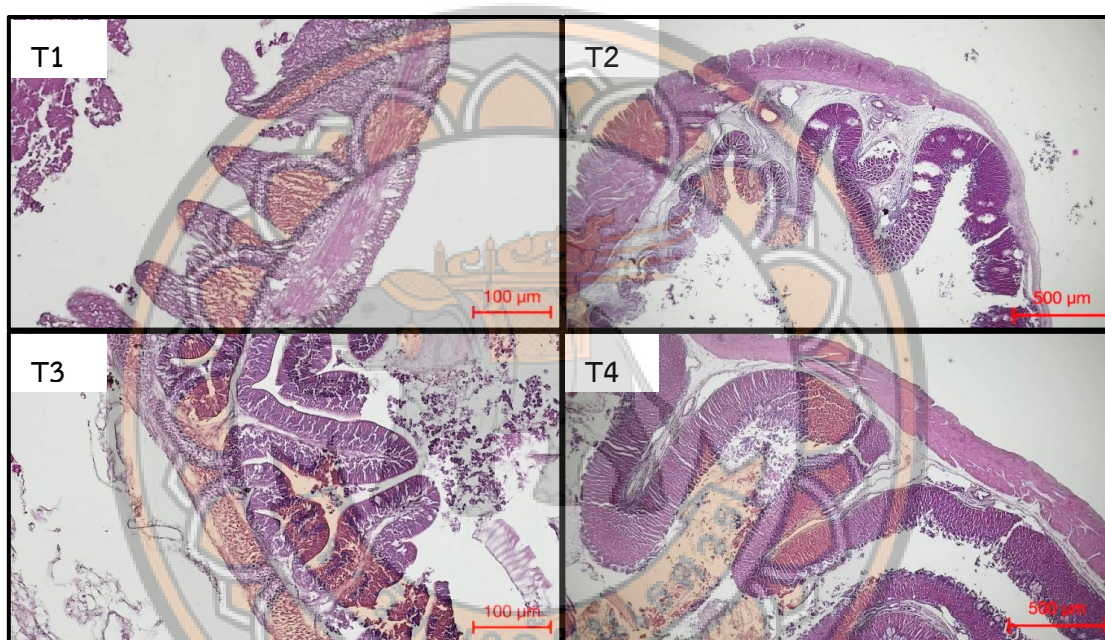
การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของไตปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกล้วย ระดับแตกต่างกัน 4 ระดับ ประกอบด้วย 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า ไม่พบความผิดปกติ (ภาพ 20) แสดงให้เห็นว่าการเสริมใบกล้วยในทุกชุดการทดลองไม่ส่งผลเสียต่อลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของไต



ภาพ 20 ลักษณะของเนื้อเยื่อไตของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกล้วย
การทดลอง T1 (0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร), การทดลอง T2 (10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร),
การทดลอง T3 (20 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) และการทดลอง T4 (40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร),
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x

4.4.4 เนื้อเยื่อลำไส้ (Intestine tissues)

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของลำไส้ปลาไนที่ได้รับอาหารเสริมไบโกลูซิง ระดับแตกต่างกัน 4 ระดับ ประกอบด้วย 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า เนื้อเยื่อในลำไส้ของปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 มีความเสื่อมสภาพ แต่ในปลาที่ได้รับอาหารเสริมไบโกลูซิงในการทดลองที่ 2, 3 และ 4 มีสภาพของเนื้อเยื่อในลำไส้ที่ปกติ (ภาพ 21) แสดงให้เห็นว่าการเสริมไบโกลูซิงในการทดลองที่ 2, 3 และ 4 ที่มีการเสริมไบโกลูซิงที่ระดับ 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาไปในทางที่ดีขึ้น

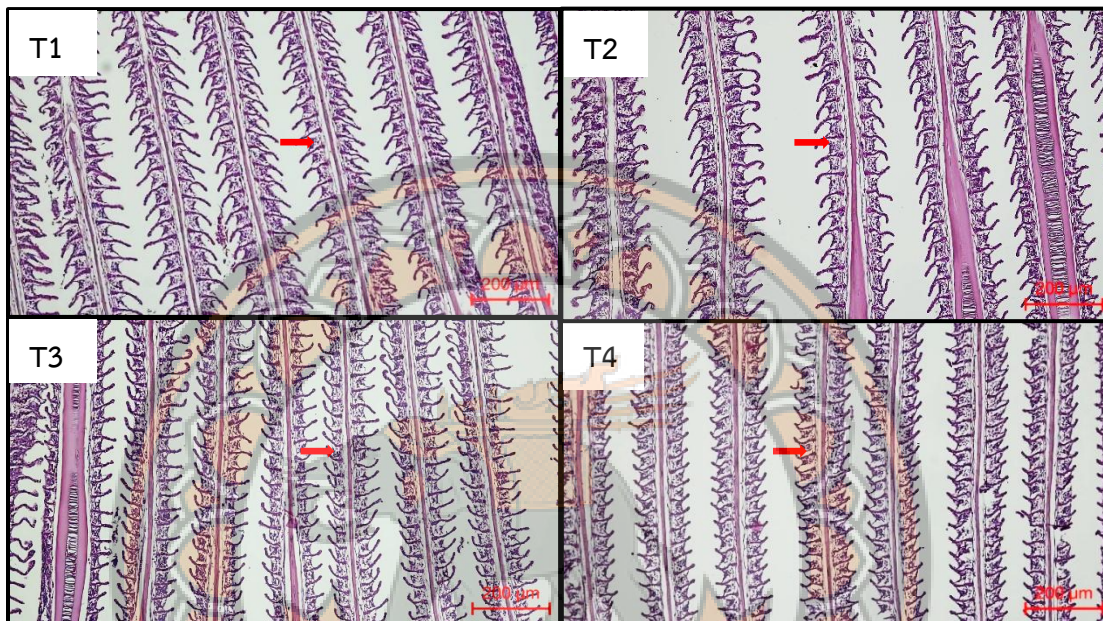


ภาพ 21 ลักษณะของเนื้อเยื่อลำไส้ของปลาไนที่ได้รับอาหารเสริมไบโกลูซิง, ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การทดลอง T1 (0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) (กำลังขยาย 20x), การทดลอง T2 (10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) (กำลังขยาย 4x), การทดลอง T3 (20 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) (กำลังขยาย 20x), และการทดลอง T4 (40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) (กำลังขยาย 4x)

4.4.5 เนื้อเยื่อเหงือก (Gill tissues)

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาเหงือกปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกล้วย ระดับแตกต่างกัน 4 ระดับ ประกอบด้วย 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า มีการบวมน้ำ (ลูกศรสีแดง) (Edema, E) (ภาพ 22)



ภาพ 22 ลักษณะของเนื้อเยื่อเหงือกของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกล้วย, ภายใต้กล้อง

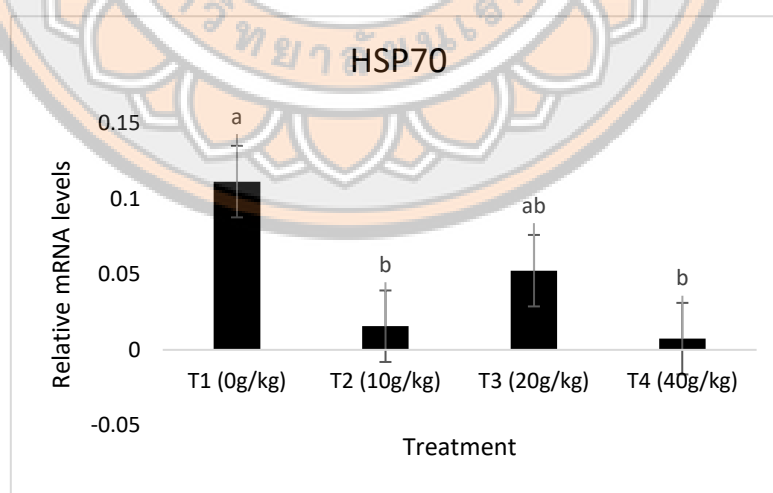
จุลทรรศน์

การทดลอง T1 (0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) (กำลังขยาย 10x), การทดลอง T2 (10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) (กำลังขยาย 4x), การทดลอง T3 (20 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) (กำลังขยาย 10x), และการทดลอง T4 (40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) (กำลังขยาย 10x)

4.5 ผลของอาหารเสริมไบโกลูซิงต่อการแสดงออกของยีน HSP70 และยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในปลานิล

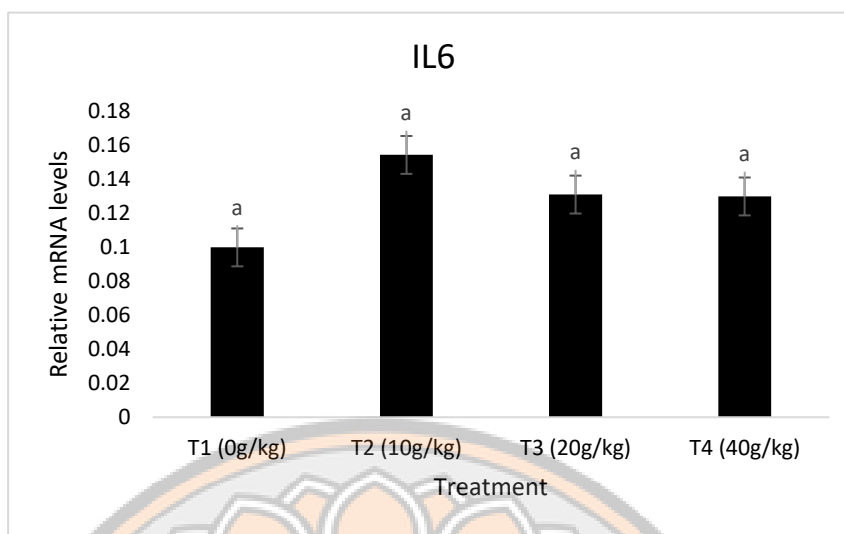
เมื่อสิ้นสุดการทดลองให้อาหารเสริมไบโกลูซิงที่ระดับแตกต่างกัน 4 ระดับ ประกอบด้วย 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า ในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารในการทดลองที่ 1 มีระดับการแสดงออกของยีน HSP70 สูงสุด รองลงมา คือ ในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 3 ($p>0.05$) ในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 4 มีระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ต่ำสุด แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2 และ 3 ($p>0.05$) (ภาพ 23) แสดงให้เห็นว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมไบโกลูซิงได้ช่วยลดระดับสูงสุดส่งผลให้ปลา มีความเครียดน้อยที่สุด

ผลของอาหารเสริมไบโกลูซิงต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในปลานิล คือ ยีน IL-6 และ TNF- α พบว่าระดับการแสดงออกของยีน IL-6 ในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2, 3 และ 4 มีระดับที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้อาหารในการทดลองที่ 1 แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) (ภาพ 24) ในทางตรงกันข้ามระดับการแสดงออกของยีน TNF- α ในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารในการทดลองที่ 3 และ 4 มีระดับการแสดงออกของยีน TNF- α ต่ำกว่าในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารในการทดลองที่ 1 และ 2 และมีความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาพ 25) แสดงให้เห็นว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมไบโกลูซิงในการทดลองที่ 3 และ 4 สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน TNF- α ที่ทำให้เกิดการอักเสบได้



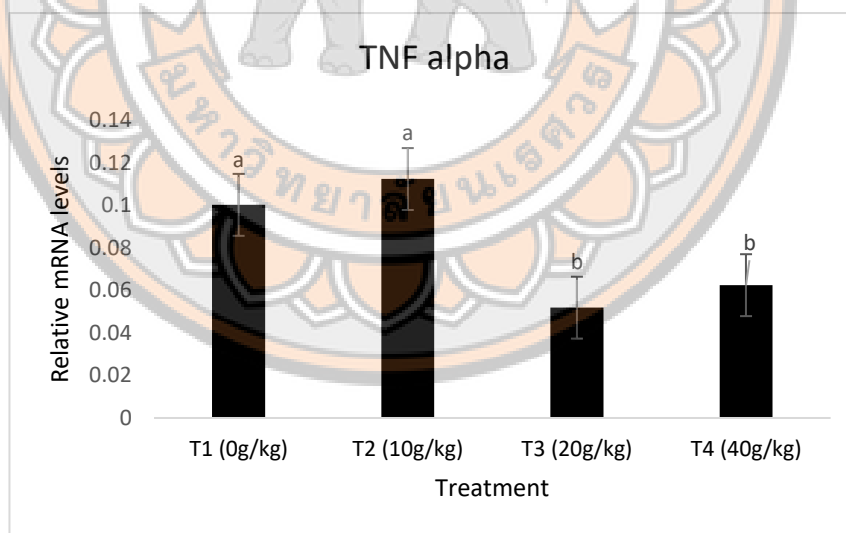
ภาพ 23 การแสดงออกของยีน HSP70 ในตับของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมไบโกลูซิงที่ระดับ 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารเป็นเวลา 10 สัปดาห์

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย (n=3) ตัวอักษรแตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพ 24 การแสดงออกของยีน IL6 ในตับของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมไบโกลูซิง
ที่ระดับ 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารเป็นเวลา 10 สัปดาห์

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย (n=3) ตัวอักษรแตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพ 25 การแสดงออกของยีน TNF alpha ในตับของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมไบโกลูซิง
ที่ระดับ 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารเป็นเวลา 10 สัปดาห์

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย (n=3) ตัวอักษรแตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.6 ผลของอาหารเสริมไบโกลูซิงต่อจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกในปลานิลที่ได้รับ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

เมื่อสิ้นสุดการทดลองให้อาหารเสริมไบโกลูซิงที่ระดับแตกต่างกัน 4 ระดับ ประกอบด้วย 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ ทำการสุ่มปลาจำนวน 5 ตัว ต่อชุด การทดลองมาทดสอบจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกในปลานิลที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 28, 32, 36 และ 40 องศาเซลเซียส (ตาราง 15) พบว่าในอุณหภูมิน้ำปกติ คือ 28 องศาเซลเซียส ปลา ที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 มีจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกสูงสุด มีค่าเท่ากับ 173.20 ± 6.46 ครั้ง/นาที่ รองลงมา คือ ในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2 มีความแตกต่างกัน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 4 มีจำนวนการเคลื่อนไหว ของแผ่นปิดเหงือกต่ำสุด ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 3 ($p > 0.05$) ปลาที่ได้รับการทดสอบที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส พบว่าปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 มี จำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกสูงสุด มีค่า 204.07 ± 4.45 ครั้ง/นาที่ รองลงมา คือ ปลาที่ ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2 และ 4 ($p < 0.05$) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 3 มีจำนวน การเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกต่ำสุด ไม่แตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 3 ($p > 0.05$) แต่แตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 และ 2 ($p < 0.05$) ปลาที่ได้รับการทดสอบที่ อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส พบว่าปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2 มีจำนวนการเคลื่อนไหว ของแผ่นปิดเหงือกสูงสุด มีค่าเท่ากับ 215.00 ± 9.14 ครั้ง/นาที่ รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับอาหารใน การทดลองที่ 1 ($p > 0.05$) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 3 มีจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่น ปิดเหงือกต่ำสุด โดยไม่แตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 4 ($p > 0.05$) แต่มีความแตกต่าง ทางสถิติเมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 และ 2 ($p < 0.05$) และในปลาที่ได้รับการ ทดสอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 2 มีจำนวนการ เคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกสูงสุด มีค่าเท่ากับ 202.47 ± 10.11 ครั้ง/นาที่ รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับ อาหารในการทดลองที่ 1, 3 และในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 4 มีจำนวนการเคลื่อนไหวของ แผ่นปิดเหงือกต่ำสุด โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับทุกหน่วยการทดลอง ($p > 0.05$) จากตาราง 15 จะเห็นได้ว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นส่งผลทำให้ปลานิลมีจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือก สูงขึ้น และเมื่อปลาได้รับอาหารเสริมไบโกลูซิงได้ข้อดอกในระดับที่สูงขึ้น ส่งผลให้ปลามีจำนวนการ เคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าการเสริมไบโกลูซิงได้ข้อ ดอกในอาหารสามารถช่วยลดความเครียดจากการได้รับความร้อนได้

ตาราง 15 จำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือก (ครั้ง/นาที) เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยในแนวนอน และแนวตั้ง

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	T1 (0 ก./กก.)	T2 (10 ก./กก.)	T3 (20 ก./กก.)	T4 (40 ก./กก.)
28	173.20±6.46 ^a	152.07±7.68 ^b	134.47±4.85 ^{bc}	129.80±1.97 ^c
32	204.07±4.45 ^a	174.73±3.45 ^b	154.40±5.64 ^c	159.60±3.42 ^c
36	211.47±6.94 ^a	215.00±9.14 ^a	156.40±4.40 ^b	173.13±2.33 ^b
40	197.27±4.79 ^a	202.47±10.11 ^a	195.80±7.44 ^a	182.40±11.96 ^a

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D., n=5) ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวนอน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	T1 (0 ก./กก.)	T2 (10 ก./กก.)	T3 (20 ก./กก.)	T4 (40 ก./กก.)
28	173.20±6.46 ^b	152.07±7.68 ^c	134.47±4.85 ^b	129.80±1.97 ^c
32	204.07±4.45 ^a	174.73±3.45 ^b	154.40±5.64 ^b	159.60±3.42 ^b
36	211.47±6.94 ^a	215.00±9.14 ^a	156.40±4.40 ^b	173.13±2.33 ^{ab}
40	197.27±4.79 ^a	202.47±10.11 ^a	195.80±7.44 ^a	182.40±11.96 ^a

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D., n=5) ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

บทที่ 5

บทสรุป

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการใช้ประโยชน์จากใบกล้วยงัดช่อดอกเสริมในอาหารปลานิลที่ระดับต่าง ๆ ประกอบด้วย 0, 10, 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ตลอดระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า การเสริมใบกล้วยงัดช่อดอกในอาหารทุกระดับไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของปลานิล รวมถึงน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ค่าปัจจัยของน้ำหนักต่อความยาวของปลาทดลอง ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักตับและอวัยวะภายใน อัตราการกินอาหาร อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก และประสิทธิภาพการใช้อาหาร อัตราการรอดตายของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมใบกล้วยงัดช่อดอกที่ระดับ 20 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีค่าสูงที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของซากปลา พบว่า การเสริมใบกล้วยงัดช่อดอกที่ระดับ 40 กรัมต่อกิโลกรัมในอาหารทำให้ค่าไขมันในซากปลามีค่าลดลง นอกจากนี้การเสริมใบกล้วยงัดช่อดอกในอาหารทุกระดับไม่ส่งผลต่อค่าโลหิตวิทยาของปลานิล รวมถึงจำนวนเม็ดเลือดขาว จำนวนเม็ดเลือดแดง และปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของปลานิล พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเนื้อเยื่อตับและม้ามในปลาที่ได้รับอาหารเสริมใบกล้วยงัดช่อดอกที่ระดับ 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร แต่ไม่พบความผิดปกติในเนื้อเยื่อไต นอกจากนี้พบความผิดปกติที่เนื้อเยื่อลำไส้ในปลาที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุม เนื้อเยื่อเหงือกพบความผิดปกติในปลาที่ได้รับอาหารในทุกชุดการทดลอง ระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ในปลาที่ได้รับอาหารเสริมใบกล้วยงัดช่อดอก พบว่ามีค่าต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม จำนวนการเคลื่อนไหวนของแผ่นปิดเหงือกในปลานิลที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารเสริมใบกล้วยงัดช่อดอกที่ระดับ 40 กรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร มีจำนวนการเคลื่อนไหวนของแผ่นปิดเหงือกที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

ดังนั้นการศึกษานี้สรุปได้ว่าการเสริมใบกล้วยงัดช่อดอกที่ระดับ 40 กรัมต่อกิโลกรัมในอาหารไม่ได้ผลต่อการเจริญเติบโต การใช้อาหารของปลา ดัชนีร่างกาย อัตราการรอดตายของปลานิล ค่าโลหิตวิทยา แต่ส่งผลให้การแสดงออกของยีน HSP70 ลดลง และสามารถทนต่อสภาวะความเครียดจากความร้อนได้ดีกว่าปลาที่ไม่ได้รับอาหารเสริมใบกล้วยงัดช่อดอก

5.2 อภิปรายผล

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาการใช้ประโยชน์จากใบกัญชงได้ช่อดอกที่ระดับต่าง ๆ ในอาหารปลานิล เพื่อให้ทราบระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน และความเครียดในปลานิล ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

5.2.1 ปริมาณสารสำคัญในใบกัญชงได้ช่อดอก

ปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญในกัญชง ได้แก่ สายพันธุ์กัญชง สภาพภูมิประเทศ อุณหภูมิ ปริมาณน้ำฝน ระยะเวลาในการปลูก เป็นต้น (Turner et al., 1982) สาร Cannabidiol (CBD) และ Tetrahydrocannabinol (THC) เป็นสารสำคัญที่พบได้ในพืชกัญชง กัญชา ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ใบกัญชงได้ช่อดอกมีสาร Cannabidiol หรือ CBD ปริมาณ 10.42 ppm และ Tetrahydrocannabinol หรือ THC ปริมาณ 0.51 ppm ปัจจุบันงานวิจัยเกี่ยวกับปริมาณสาร CBD ในใบกัญชงพบจำนวนน้อย จากรายงานของ กรรณก และคณะ (2563) ได้ศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในใบกัญชง พบว่า ในใบกัญชง มีสาร CBD มากสุดในส่วนของช่อดอกกัญชง ส่วนในใบกัญชงมี CBD เท่ากับ $0.55 \pm 0.02\%$ w/w นอกจากนี้รายงานของ มัลลิกา และสุทธิ (2565) ศึกษาการแยกชนิดของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (Cannabinoids) ในกัญชงทั้ง 10 สายพันธุ์ ได้แก่ ปางอุ๋ง สองแคว ปางแก พงพระ ปางดอง แม่ตะละ ห้วยห้อย ห้วยแล้ง เวียดนาม และกัญชา โดยใช้เทคนิคก๊าซโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) พบว่า กัญชงทุกสายพันธุ์มีปริมาณสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (Cannabinoids) ที่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยพบสาร CBD ค่าเฉลี่ยปริมาณสาร CBD อยู่ระหว่าง 0.96 ± 0.18 - 3.97 ± 0.18 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปริมาณ CBD มากที่สุดในกัญชงสายพันธุ์เวียดนาม และค่าเฉลี่ยปริมาณสาร THC อยู่ระหว่าง 0.65 ± 0.15 - 6.76 ± 0.21 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น การเลือกสายพันธุ์กัญชงสำหรับนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ควรเลือกสายพันธุ์ที่มีปริมาณ CBD สูง และ THC ต่ำ เนื่องจากสาร THC ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทไม่เหมาะนำมาใช้เสริมอาหารสัตว์น้ำ นอกจากนี้รายงานของ Nagy et al. (2019) พบว่าในใบกัญชงมีปริมาณ CBD มากกว่าในช่อดอกเพศผู้ โดยในช่อดอกเพศผู้ มีปริมาณ CBD 7.4 ± 1.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในใบมี CBD 11.2 ± 1.9 เปอร์เซ็นต์ แต่ในดอกเพศเมียพบ CBD มากที่สุด คือ 24.9 ± 3.9 เปอร์เซ็นต์

การศึกษานี้พบว่า คุณค่าทางโภชนาการต่าง ๆ ในใบกัญชงได้ช่อดอก ประกอบด้วย โปรตีน 17.04 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 19.05 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 7.96 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 18.05 เปอร์เซ็นต์ และเยื่อใย 16.43 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากยังไม่พบการรายงานเกี่ยวกับการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการในใบกัญชง มีเพียงการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการในใบกัญชา ซึ่งพบในรายงานของ Ishaq et al (2015) และ Audu et al (2014) พบว่า ในส่วนของใบกัญชามีคุณค่าทางโภชนาการที่ใกล้เคียงกันกับการศึกษาครั้งนี้ โดยมีค่าโปรตีนอยู่ในช่วง 8.63 - 23.78 เปอร์เซ็นต์ ไขมันมีค่าอยู่ในช่วง 5.81 - 19.97

เปอร์เซ็นต์ ความชื้นมีค่าอยู่ในช่วง 6.87 - 8.46 เปอร์เซ็นต์ ถ้ามีค่าอยู่ในช่วง 10.67 - 11.18 เปอร์เซ็นต์ และเยื่อใยมีค่าอยู่ในช่วง 13.49 - 18.95 เปอร์เซ็นต์

5.2.2 ผลของอาหารเสริมใบกัญชงต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และองค์ประกอบทางเคมีของซากปลา

จากการศึกษาการใช้ประโยชน์จากใบกัญชงได้ข้อดีในอาหารปลานิลในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การเสริมใบกัญชงได้ข้อดีในอาหารปลานิลในทุกชุดการทดลองตลอดระยะเวลา 10 สัปดาห์ ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของปลานิล รวมถึงน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย (FBW), น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (AWG), น้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน (ADG), อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR), ค่าปัจจัยของน้ำหนักต่อความยาวของปลาทดลอง (K), ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักตับ (HSI), และดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักอวัยวะภายใน (VSI) การศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Camargo-dos-Santos et al. (2022) ที่ได้ศึกษาการเสริมสาร Cannabidiol (CBD) ในอาหารปลานิลที่ระดับ 0, 1, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของปลา ผลพบว่าไม่ส่งผลต่อค่าน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (AWG), อัตราการเติบโตจำเพาะ (SGR) และค่าปัจจัยน้ำหนักต่อความยาว (K) แต่ในทางตรงกันข้าม Wang et al. (2023) ศึกษาผลของ Cannabidiol (CBD) ต่อการเจริญเติบโตในปลาโครเกอร์ (*Larmichthys crocea*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับน้ำมันถั่วเหลืองสูง โดยมีการเสริมด้วย CBD ที่ระดับ 25, 50, 100 และ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ผลการศึกษาพบว่าค่าน้ำหนักสุดท้าย (FBW) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) ในปลาที่เลี้ยงด้วย CBD 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร แสดงค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่า CBD 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลาโครเกอร์สีเหลืองขนาดใหญ่ได้ แต่ในด้านอัตราการรอดตาย ค่าปัจจัยน้ำหนักต่อความยาว ดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักตับ และค่าดัชนีน้ำหนักปลาต่อน้ำหนักอวัยวะภายใน ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ในปลาที่เลี้ยงด้วย CBD ที่แตกต่างกันในทุกระดับ นอกจากนี้ ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Juries (2021) ศึกษาผลของน้ำมัน Cannabidiol (CBD) ที่ได้จากกัญชงต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลานิล โดยให้ CBD ที่ระดับ 0, 20, 40 และ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ผลพบว่าไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของปลานิล น้ำหนักสุดท้าย (FBW) และอัตราการเติบโตจำเพาะ (SGR) ตรงข้ามกับการศึกษาในปลาม้าลายตัวเมีย (*Danio rerio*) ที่ได้สัมผัสกับสาร CBD (0.1 และ 0.5 ไมโครโมลาร์) ส่งผลให้ความยาว และน้ำหนักตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Pandelides et al., 2020) อัตราการรอดตายของปลานิลในการศึกษานี้พบว่า ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมใบกัญชงได้ข้อดีในทุกระดับมีอัตราการรอดตายมากกว่าปลาที่ไม่ได้รับการเสริมใบกัญชงได้ข้อดีในอาหาร ($p > 0.05$) สอดคล้องกับ Pandelides et al. (2020) รายงานว่าปลาม้าลาย

ตัวผู้ (*Danio rerio*) ที่ได้สัมผัสกับสาร CBD ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นจะมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นมากกว่า กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชงได้ช่อดอกในทุกชุดการทดลอง ไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหาร ทั้งในด้านอัตราการกินอาหาร (FI), อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (FCR) และประสิทธิภาพการใช้อาหาร (FE) สอดคล้องกับรายงานของ Camargo-dos-Santos et al. (2022) สาร Cannabidiol (CBD) ในอาหารปลานิลที่ระดับ 0, 1, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของปลา พบว่าไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (FCR) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Juries. (2021) ที่ให้ CBD ที่ระดับ 0, 20, 40 และ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ผลพบว่าไม่ส่งผลต่ออัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (FCR) ของปลานิล การศึกษาครั้งนี้ ตรงกันข้ามกับรายงานของ Wang et al. (2023) ศึกษาผลของ cannabidiol (CBD) ต่อการเจริญเติบโตในปลาโครเกอร์ (*Larmichthys crocea*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับน้ำมันถั่วเหลืองสูง โดยมีการเสริมด้วย CBD ที่ระดับ 25, 50, 100 และ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ผลการศึกษาพบว่าอัตราการกินอาหาร (FI) ในปลาที่เลี้ยงด้วย CBD 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร แสดงค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของซากปลาที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชงได้ช่อดอกที่ระดับต่าง ๆ พบว่า โปรตีนซากปลาหลังการทดลอง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ค่าไขมันลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งผลลัพธ์สอดคล้องกับรายงานของ Wang et al. (2023) ศึกษาผลของ Cannabidiol (CBD) ในปลาโครเกอร์ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับน้ำมันถั่วเหลืองสูง โดยมีการเสริมด้วย CBD ที่ระดับ 25, 50, 100 และ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ผลการศึกษาพบว่า โปรตีนมีค่าไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) และค่าไขมันลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า Cannabidiol (CBD) ในใบกัญชงได้ช่อดอกสามารถลดปริมาณไขมันในตัวปลาได้ โดยไม่ส่งผลต่อน้ำหนักสุดท้าย (FBW) ของปลา โดยปลามีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายใกล้เคียงกันแต่มีปริมาณไขมันที่ลดลง อาจเป็นไปได้ว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชงได้ช่อดอกจะมีมวลกล้ามเนื้อมากกว่า และมีไขมันน้อยกว่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bielawiec et al. (2023) ที่ใช้ CBD การฉีดเข้าช่องท้องของหนูที่เป็นโรคอ้วนซึ่งเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีไขมันสูง ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของมวลกาย เป็นเวลาสองสัปดาห์ พบว่า สามารถลดการสะสมของกรดไขมันในกล้ามเนื้อ (FAs) ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของซากปลาที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชงได้ช่อดอกที่ระดับต่าง ๆ พบว่า ค่าความชื้น และปริมาณเถ้าในซากปลามีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจากผลการศึกษาปริมาณเถ้าในใบกัญชงได้ช่อดอก พบว่า มีค่าสูงถึง 18.05 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น หากเพิ่มปริมาณของใบกัญชงได้ช่อดอกในอาหารมากขึ้น จึงส่งผลให้ปริมาณเถ้าในซากปลาเพิ่มขึ้น แต่

ในทางกลับกันรายงานของ Wang et al. (2023) พบว่า ค่าความชื้น และเถ้ามีค่าไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

5.2.3 ผลของอาหารเสริมใบกัญชงต่อค่าโลหิตวิทยาของปลานิล (Hematology)

การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยามีความสำคัญในการใช้วินิจฉัยโรค และการประเมินสุขภาพของปลา รวมถึงประเมินสภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียด ซึ่งในปลาที่มีสภาวะเครียดจะมีระดับเซลล์เม็ดเลือดแดงสูงขึ้น ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริตสูงขึ้น (Asmathulla et al., 2011) เนื่องจากความเครียดเกี่ยวข้องกับการใช้พลังงานที่สูงขึ้น และการเพิ่มขึ้นของการขนส่งออกซิเจน ซึ่งเป็นกลไกการปรับตัวที่เกี่ยวข้องกับความเครียดอย่างหนึ่ง (Witeska, et al., 2022) นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่ทำให้ค่าโลหิตวิทยาเปลี่ยนแปลงไป เช่น สายพันธุ์ อายุ เพศ คุณภาพน้ำ การติดเชื้อแบคทีเรีย การให้อาหาร ความหนาแน่นของการเลี้ยง แหล่งที่อยู่อาศัย และสภาพอากาศก็สามารถมีอิทธิพลต่อค่าทางโลหิตวิทยาได้เช่นกัน การศึกษาครั้งนี้พบว่า การเสริมใบกัญชงได้ช่วยลดค่าในอาหารปลานิล ไม่ส่งผลต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่จำนวนเม็ดเลือดขาวมีแนวโน้มลดลงในปลาได้รับอาหารเสริมใบกัญชงได้ช่วยลดค่าที่ระดับ 20 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ตรงข้ามกับรายงานของ Juries. (2021) จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) เพิ่มขึ้นในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่ได้รับน้ำมัน CBD ที่สกัดจากเมล็ดกัญชงที่ระดับสูงขึ้น ($p>0.05$) ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาวเป็นตัวชี้วัดสุขภาพของปลา ใช้บ่งบอกเกี่ยวกับการติดเชื้อแบคทีเรีย หากปริมาณเม็ดเลือดขาวมีค่าสูงบ่งบอกถึงสภาวะการติดเชื้อแบคทีเรีย (Grant, 2015) การศึกษาครั้งนี้พบว่า การเสริมใบกัญชงได้ช่วยลดค่าในอาหารปลานิล ไม่ส่งผลต่อจำนวนเม็ดเลือดแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่จำนวนเม็ดเลือดแดงมีแนวโน้มที่สูงขึ้นเมื่อปลาได้รับอาหารเสริมใบกัญชงได้ช่วยลดค่าในระดับที่สูงขึ้น เช่นเดียวกันกับปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นในปลาที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชงได้ช่วยลดค่าทุกระดับมีค่าสูงกว่าในปลาที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุม (Control) แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) การเพิ่มขึ้นของเซลล์เม็ดเลือดแดง และปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ส่งผลให้ออกซิเจนไหลเวียนในระบบไหลเวียนโลหิตได้ดีขึ้น การลดลงของจำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC) อาจหมายความว่าภูมิคุ้มกันลดลง และการเพิ่มขึ้นจำนวนเม็ดเลือดแดงสามารถบ่งบอกปลาภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น (Juries, 2021) โดยทั่วไปค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นจะอยู่ที่ 20 – 45 เปอร์เซ็นต์ หากมีค่าต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์บ่งบอกถึงสภาวะโลหิตจาง (Anemia) หากมีมากกว่า 45 เปอร์เซ็นต์ อาจเกิดจากการขาดน้ำ ภาวะขาดออกซิเจน หรือความเครียด (Grant, 2015) นอกจากนี้ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Saoud (2018). ที่ศึกษาผลของน้ำมันกัญชงต่อค่าโลหิตวิทยาของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่ระดับ 21.3 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่าไม่ส่งผลต่อปริมาณเม็ดเลือดแดง และปริมาณเม็ดเลือดขาวอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ตรงข้ามกับ

การศึกษาในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่ได้รับอาหารเสริม Cannabidiol (CBD) ที่ระดับ 0.003% ของน้ำหนักอาหาร ส่งผลทำให้ปลา มีเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริตต่ำสุด เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารเสริม CBD แสดงให้เห็นว่าปลา มีระดับความเครียดต่ำที่สุด ($p>0.05$) (Mortuza et al., 2021) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาผลของผงเมล็ดกัญชา (*Cannabis sativa*) ในหนูตะเภา ปริมาณ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นเวลา 60 วัน ต่อค่าโลหิตวิทยา พบว่าหนูตะเภาที่เลี้ยงด้วยผงเมล็ดกัญชา มีปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit) ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารเสริมผงกัญชา และจำนวนเม็ดเลือดขาวลดลงอย่างต่อเนื่องแต่ไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) (Karimi, Hayatghaibi, Yousefi, Saberivand, & Zavareh, 2007) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยดังกล่าวใช้เพียงผงแห้งของเมล็ดกัญชา ไม่ใช่สาร CBD บริสุทธิ์ ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับผลของ CBD ต่อค่าโลหิตวิทยาของปลานั้นยังพบจำนวนน้อย

5.2.4 ผลของอาหารเสริมใบกัญชงต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของปลานิล

การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในลำไส้ขึ้นอยู่กับการใช้แหล่งโปรตีนจากพืชในอาหาร (Rodiles et al., 2015) สารต้านโภชนาการที่อยู่ในพืช เช่น กรดไฟติก ซาโปนิน แทนนิน สารยับยั้งทริปซิน เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลกระทบต่อเนื้อเยื่อในลำไส้ และทำให้เกิดลำไส้อักเสบในปลา ซึ่งยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับปริมาณสารต้านโภชนาการในใบได้ช่อดอกกัญชง แต่พบสารต้านโภชนาการที่อยู่ในเมล็ดกัญชง (Axentii et al., 2024) การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของปลานิล ในการศึกษาครั้งนี้ พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเนื้อเยื่อตับ และม้ามในปลาที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชงได้ช่อดอกที่ระดับ 20 และ 40 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร แต่ไม่พบความผิดปกติในเนื้อเยื่อไต นอกจากนี้พบความผิดปกติที่เนื้อเยื่อลำไส้ในปลาที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุม เนื้อเยื่อเหงือกพบความผิดปกติในปลาที่ได้รับอาหารในทุกชุดการทดลอง อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบรายงานผลของการใช้ใบกัญชงได้ช่อดอก หรือสาร CBD เสริมในอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของปลานิล จากรายงานของ Mobisson et al. (2023) รายงานว่าหนูที่ได้รับน้ำมัน CBD (0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) พบความเสื่อมของเซลล์ตับ ความแออัดของหลอดเลือด (Vascular congestion) การยึดเกาะของเยื่อบุผนังหลอดเลือด (Endothelial adhesion) และการแทรกซึมของเม็ดเลือดขาว (Lymphocyte infiltration) ซึ่งส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ตับ นอกจากนี้รายงานของ Cocetta et al. (2021) ยังรายงานว่า Cannabidiol เป็นสารประกอบที่มีความสามารถในการต้านภาวะการอักเสบในลำไส้ได้

5.2.5 ผลของอาหารเสริมไบโกลูซิงต่อการแสดงออกของยีน HSP70 และยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในปลานิล

ปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนในปลานิล เช่น TNF- α และ IL-6 (Wang et al., 2023), HSP70 (Khieokhajonkhet et al., 2022) เป็นต้น Tumor necrosis factor α (TNF- α) เป็นไซโตไคน์ที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการอักเสบ และกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน และสภาวะสมดุลของระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ยังเป็นตัวกลางสำคัญของการตายของเซลล์ การเพิ่มจำนวน และการแบ่งเซลล์ (Eggestøl et al., 2020) Interleukin-6 (IL-6) เป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญในการส่งสัญญาณ และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด และภูมิคุ้มกันที่ได้รับมา (Kishimoto, 2010) Heat Shock Proteins (HSP) มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อความเครียดของสัตว์ โดยปกติแสดงออกในเซลล์ของปลาที่ได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อม หากปลาอยู่ภายใต้สภาวะความเครียดจากความร้อน HSP70 จะถูกหลั่งออกมาเพื่อช่วยปกป้องการทำงานของเซลล์ ปกป้องการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน (Magouz, 2022) HSP70 ทำหน้าที่ในการตอบสนองต่อความร้อน ป้องกันการพับตัวของโปรตีน เมื่อสิ่งมีชีวิตสัมผัสกับความเครียดจากความร้อน (Dumas, 2022) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เกี่ยวกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน การตายของเซลล์ และเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบในสัตว์น้ำ (Roberts, 2010)

การศึกษานี้พบว่า ในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารในการทดลองที่ 1 หรือกลุ่มควบคุม มีระดับการแสดงออกของยีน HSP70 สูงสุด ในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริมไบโกลูซิงได้ข้อดอกระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ที่ลดลง และมีค่าต่ำสุดในปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 4 แสดงให้เห็นว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมไบโกลูซิงได้ข้อดอกระดับสูงสุดส่งผลให้มีความเครียดน้อยที่สุด และการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเสริมไบโกลูซิงได้ข้อดอในอาหารปลานิลทุกชุดการทดลอง ไม่ส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีน IL-6 ในปลานิล ($p>0.05$) การศึกษานี้พบระดับการแสดงออกของยีน TNF- α ในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารในการทดลองที่ 3 และ 4 มีระดับการแสดงออกของยีน TNF- α ต่ำกว่าในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารในการทดลองที่ 1 และ 2 ($p<0.05$) สอดคล้องกับ Wang et al. (2023) พบว่า ปลาโครเกอร์ (*Larmichthys crocea*) ที่เลี้ยงด้วย CBD ที่ระดับ 100 และ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร มีระดับการแสดงออกของยีน TNF- α ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แสดงให้เห็นว่า CBD สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ทำให้เกิดการอักเสบ และบรรเทาการอักเสบได้ หลังจากให้ปลากินเป็นเวลา 9 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Pandelides et al. (2020) ที่ศึกษาการแสดงออกของยีนในปลาหมอสี (*Danio rerio*) รุ่น F0 และ F1 ที่ได้สัมผัสสาร Cannabidiol (CBD) ในความเข้มข้นที่ต่างกันคือ 0.02, 0.1, 0.5 ไมโครโมลาร์ (0.006, 0.03, 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าระดับ IL-6 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในปลาที่ได้รับ CBD ที่ระดับ 0.1 และ

0.5 ไมโครโมลาร์ และปลาที่ได้รับ CBD ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นมีระดับการแสดงออกของยีน $\text{TNF-}\alpha$ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งให้เห็นว่าการแสดงออกของยีนที่ลดลงอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกันอย่างยั่งยืน นอกจากนี้ CBD สามารถยับยั้งการผลิต $\text{TNF-}\alpha$ และสามารถรักษาอาการอักเสบและแผลในช่องปากได้ (Kongkadee et al., 2022) สารสกัดจากใบกัญชงสายพันธุ์ D132 ลดการหลั่งของไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ ($\text{TNF-}\alpha$ และ IL-6) ในเซลล์ไตสุนัขได้อย่างมีนัยสำคัญ (Liu et al., 2022)

5.2.6 ผลของอาหารเสริมใบกัญชงต่อจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกในปลานิลที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

อุณหภูมิ ถือเป็นปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อพฤติกรรมการดำรงชีวิตของปลา การเจริญเติบโต ความอยากอาหาร การอยู่รอด และการสืบพันธุ์ของปลาทุกชนิด (Dupree & Hunner, 1984) อุณหภูมิร่างกายของปลาจะเทียบเท่ากับอุณหภูมิของน้ำ และผันผวนตามการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม (Alfonso, Gesto, & Sadoul, 2021) ปลาแต่ละสายพันธุ์จะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการดำรงชีวิต โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปลานิลอยู่ในช่วง 20 - 30 องศาเซลเซียส (Dawood et al., 2020; Santos et al., 2013; Mirea et al., 2013) และปลาจะเริ่มเครียดเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 37-38 องศาเซลเซียส (Abd El-Hack et al., 2022) เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลง อัตราการเผาผลาญจึงเพิ่มขึ้นหรือลดลงตามไปด้วย ทำให้ความต้องการออกซิเจนในร่างกายเปลี่ยนแปลงไป โดยสังเกตได้จากความถี่ในการหายใจของปลา หรือจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือก ซึ่งมีการศึกษาจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าความผันผวนของอุณหภูมิจึงมีผลกระทบอย่างมากต่อสัตว์น้ำ (Panase et al., 2018; Sun et al., 2019; Ashaf-Ud-Doulah et al., 2020)

เนื่องจากอุณหภูมิน้ำส่งผลต่อกิจกรรมการเผาผลาญ การเจริญเติบโต การกินอาหาร ดังนั้นปลาที่สัมผัสกับอุณหภูมิน้ำที่สูงจะต้องใช้พลังงานในการเผาผลาญ โดยมีความถี่ในการหายใจที่เพิ่มขึ้น สังเกตได้จากการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกของปลา ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ในสภาวะปกติที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 หรือกลุ่มควบคุมมีจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกสูงที่สุด แต่เมื่อได้รับอาหารเสริมใบกัญชงได้ข้อดอกที่ระดับที่สูงขึ้นส่งผลให้มีจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นถึงอุณหภูมิ 32 และ 36 องศาเซลเซียสพบว่าปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 1 มีจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกสูงที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารในการทดลองที่ 4 ที่มีจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกต่ำที่สุด แสดงให้เห็นว่าการได้รับอาหารเสริมใบกัญชงได้ข้อดอกสามารถช่วยลดความเครียดจากการได้รับความร้อนได้ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นถึงอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสพบว่าปลาที่ได้รับอาหารในทุกชุดการทดลองมีจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกที่

ใกล้เคียงกัน และไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติ เนื่องจากปลานิลเริ่มเข้าสู่ช่วงค่าความร้อนวิกฤตสูงสุด หรือ Critical thermal maximum (CTmax) ซึ่ง CTmax ของปลานิลที่เคยมีรายงานอยู่ที่ 42.25 และ 44.5 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะขาดออกซิเจนและภาวะปกติในปลานิล ตามลำดับ (Islam et al., 2020) ปลาที่ได้รับอุณหภูมิสูงจะแสดงอาการที่ผิดปกติ เช่น หยุดการเคลื่อนไหว ร่างกายสูญเสียสมดุล และมีการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกอย่างรวดเร็ว แต่ถ้าหากอุณหภูมิน้ำลดลง ความถี่ในการเคลื่อนไหวแผ่นปิดเหงือกต่อนาทีจะลดลงตามไปด้วย (Dan-kishiya et al., 2016) การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิทำให้ความสามารถในการละลายของออกซิเจนในน้ำลดลง และกระตุ้นให้ปลาเกิดความเครียดในที่สุด

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ จำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกของปลานิล มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิของน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Khieokhajonkhet et al. (2022) พบว่า ปลาดุกลูกผสม (*Clarias gariepinus* X *C. macrocephalus*) ที่สัมผัสกับอุณหภูมิน้ำที่สูงขึ้นส่งผลให้ปลามีจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และในทำนองเดียวกันรายงานของ Ayanwale et al. (2020) ศึกษาผลของระดับอุณหภูมิที่แตกต่างกันต่ออัตราการหายใจของลูกปลา Mudfish (*Clarias anguillaris*) โดยทดสอบที่อุณหภูมิน้ำตั้งแต่ 26.66, 30, 32 และ 34 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิน้ำที่สูงขึ้นส่งผลให้อัตราการหายใจของลูกปลา Mudfish เพิ่มขึ้น แต่มีอัตราการหายใจที่ลดต่ำลงเมื่อลูกปลามีขนาด และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิน้ำส่งผลให้อัตราการหายใจของปลาเพิ่มขึ้น เพื่อพยายามปรับตัวกับสิ่งแวดล้อม และต้องการที่จะดึงออกซิเจนมาใช้ในการหายใจมากขึ้น เพื่อให้ร่างกายสามารถทนต่ออุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น (Ayanwale et al., 2015) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Panase et al. (2019) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิน้ำที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 25, 27, 29, 33 และ 37 องศาเซลเซียส ในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.) ต่อจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือก พบว่า เมื่ออุณหภูมิน้ำเพิ่มสูงถึง 37 องศาเซลเซียส ปลามีจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่เลี้ยงในอุณหภูมิน้ำ 25 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิของน้ำที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วอาจกระตุ้นให้ปลาเกิดความเครียดได้ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Rahman et al. (2021) ที่เลี้ยงปลาเก๋าคอดแดง (*Epinephelus akaara*) ภายใต้อุณหภูมิน้ำแตกต่างกัน คือ 24, 28 และ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และทำการเพิ่มอุณหภูมิในน้ำ 1 องศาเซลเซียสทุก 1 ชั่วโมง ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า จำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่สูงขึ้น และในปลาที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 24 และ 28 องศาเซลเซียสมีจำนวนการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เนื่องจากปลาถูกปรับสภาพให้เคยชินกับอุณหภูมิที่สูง

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 การศึกษาปริมาณสารสำคัญในกัญชงสายพันธุ์ต่าง ๆ และคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมมาใช้ในการทดลอง

5.3.2 ควรใช้ปริมาณกัญชงเสริมในอาหารปลาในระดับที่หลากหลาย เพื่อเปรียบเทียบค่าต่าง ๆ

5.3.3 ควรศึกษาปริมาณสาร Cannabidiol (CBD) ในอาหารทดลองแต่ละสูตรที่ใช้เลี้ยงปลานิล

5.3.4 ศึกษาค่าโลหิตวิทยาอื่น ๆ เช่น ค่าคอรีติซอลในเลือด กลูโคส เป็นต้น

5.3.5 ศึกษาการเสริมสาร Cannabidiol (CBD) บริสุทธิ์ในอาหารทดลองของปลานิล เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มปลาที่ได้รับอาหารเสริมใบกัญชงได้ช่อดอก



บรรณานุกรม

- กรกนก อิงคินันท์, ปณัฐพงศ์ บุญนวล, สุดาพร วงศ์वार, อรรระวี คงสมบัติ, พรนรินทร์ เทพาวรา พฤกษ์, เนติ วรณช, เพ็ญศรี เจริญสิทธิ์, วุฒิชัย วิสุทธิพรต, มนุષั โลหิตนาวิ, และพีระศักดิ์ ฉายประสาท. (2563). *การวิจัยและพัฒนาสมุนไพรเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์* (รายงานผลการวิจัย). พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- กรกมล วีระพันธุ์, นพรัตน์ ยวงกระโทก, และภราดา ณ นคร. (2557). *ผลของการทำวัคซีนอะควาแวกสเตอร์ปอสเอน์ต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวแยกชนิดของปลาไนที่ได้รับโปรไบโอติกส์*. (จุลนิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยศิลปากร, กรุงเทพฯ). สืบค้นจาก <http://www.sure.su.ac.th>
- กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ. (2564). *ปลาไนและผลิตภัณฑ์*. สืบค้น 10 สิงหาคม 2565, จาก <https://api.dtn.go.th/>
- กองนโยบาย และแผนพัฒนาการประมง กลุ่มเศรษฐกิจการประมง. (2565). *Monitoring report สินค้าปลาไน และผลิตภัณฑ์ ประจำเดือนมกราคม 2565*. สืบค้น 25 สิงหาคม 2565, จาก <https://www.fisheries.go.th>
- กิตตา หัสนา. (ม.ป.ป.). *รูปแบบจีโนมไทป์ของยีน HSP 70 ในโคนมต่อการทนความเครียดเนื่องจากความร้อน*. สืบค้น 13 กุมภาพันธ์ 2566, จาก <http://www.agri.ubu.ac.th>
- ทรูปลูกปัญญา. (2560). *ส่วนประกอบของเลือด*. สืบค้น 25 สิงหาคม 2565, จาก <https://www.truelookpanya.com>
- นภดล ศุกระกาญจน์, สุภา ศิริรัฐนิคม, กฤษณะ เรืองคล้าย, และพันธสิทธิ์ โชคสวัสดิกร. (2555). ค่าโลหิตวิทยาของปลาดุกลำพัน (*Clarias nieuhofii*) ในระบบการเพาะเลี้ยง. ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50: สาขาสัตว์, สาขาสัตวแพทยศาสตร์, สาขาประมง* (น. 534-543). กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- นฤชยา ไกรเนตร (2553). *การเพาะเลี้ยงปลาไน*. สืบค้น 21 พฤษภาคม 2565, จาก https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20200415152840_1_file.pdf
- ปวีณา ยะปัญญา และกลุ่มงานการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลพระปกเกล้า จังหวัดจันทบุรี. (2562). *กัญชง (hemp). วารสารศูนย์การศึกษาแพทยศาสตร์คลินิก โรงพยาบาลพระปกเกล้า, 36(3), 258-260.*
- ประภัสสร ทิพย์รัตน์, พิกพ ชำนิวิทย์พงศ์, และสิโรตม์ ชูดีวัตร. (2550). *ปริมาณสารสำคัญในกัญชง*. เชียงใหม่: ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์.

- ปาริชาติ พจนศิลป์. (2562). “เสมหหรือกัญชง” พืชเส้นใยคุณภาพ ต่อยอดสู่พืชเศรษฐกิจ. สืบค้น 10 สิงหาคม 2565, จาก <https://www.doa.go.th>
- พิเชต พลายเพชร. (2559). การจัดการทางโภชนาการสำหรับการเลี้ยงปลานิล. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 24(1), 13-39.
- พิเชต พลายเพชร. (2562). ความหนาแน่นที่เหมาะสมในการอนุบาลปลานิลแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus*) ในกระชังอวนมุ้งแบบให้อากาศจนได้ขนาดน้ำหนักไม่ต่ำกว่า 30 กรัม. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 24(3), 901-912.
- ภัทธีรา ยิ่งเลิศรัตนกุล, สายพิน โขติวิเชียร, ภัทราภรณ์ นุชกระแส, สไบ อินทโชติ, จุฑารัตน์ สุภา นุวัฒน์, วรภัสร์ แป้นจันทร์, ปัทมาภรณ์ อักษรชู, ภัทธีญา พวงแก้ว, และณิชาพัฒน์ จูริโกมลพงศ์. (2565). กัญชาอาหารทางเลือกเพื่อความปลอดภัยและมีคุณค่าทางโภชนาการ. ใน *การประชุมวิชาการส่งเสริมสุขภาพและอนามัยสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ครั้งที่ 15*. นนทบุรี: สำนักส่งเสริมสุขภาพ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข.
- มลฤดี สอนิ, และจันทร์จรัส วัฒนะโชติ. (2561). ความชุกชุมของปรสิต *Lernanthropus* sp. ในปลา กะพงขาวการเปลี่ยนแปลงลักษณะพยาธิสภาพของเหงือกและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลาต่อเชื้อปรสิต. (รายงานผลการวิจัย). ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.
- มัลลิกา จินดาสิงห์, และสุทธิ รัชผลเจริญ. (2565). การระบุชนิดของสารกลุ่ม Cannabinoids และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกัญชง และกัญชาโดยโมเลกุลเครื่องหมายเอสเอสอาร์. *วารสารผลิตภัณฑ์เกษตร*, 4(2), 80-91.
- เมดไทย. (2563). *กัญชง สรรพคุณและประโยชน์ของต้นกัญชง 14 ข้อ*. สืบค้น 19 สิงหาคม 2565, จาก <https://medthai.com>
- ลิลลี่ กาวิตะ, กมรินทร์ พรหมรัตน์รักษ์, มาลี ณ นคร, ยุพดี เผ่าพันธุ์, ศรีสม สุวรรณวงศ์, สุริยา ตันติวิวัฒน์, และวีระชัย ณ นคร. (2547). สันฐานวิทยาและกายวิภาคของกัญชง. ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42: สาขาพืช สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร* (น. 576-583). กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย.
- สุพรรณิ ลิ้มทอวณิช, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, จารุพันธ์ ประทุมยศ, และนาริรัตน์ ฤทธิรัตน์. (2558). การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตตัวน้ำหรือแบคทีเรีย. (รายงานผลการวิจัย). ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.
- อภิชาติ ภาวนา, สมชาย หวังวิบูลย์กิจ, และนางนุช เลหาะวิสุทธิ. (2560). การเสริมสารสกัดจากใบชะครามในอาหารปลากะพงขาว. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า*, 35(3), 42-48.
- Abd El-Hack, M.E., El-Saadony, M.T., Nader, M.M., Salem, H.M., El-Tahan, A.M., Soliman, S.M., & Khafaga, A.F. (2022). Effect of environmental factors on growth

- performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International journal of biometeorology*, 66(11), 2183-2194.
- Alfonso, S., Gesto, M., & Sadoul, B. (2021). Temperature increase and its effects on fish stress physiology in the context of global warming. *Journal of Fish Biology*, 98(6), 1496-1508.
- Andre, C.M., Hausman, J.F., & Guerriero, G. (2016). *Cannabis sativa*: the plant of the thousand and one molecules. *Front Plant Sci*, 7, 1-17.
- Antonelli, M., Benedetti, B., Cannazza, G., Cerrato, A., Citti, C., Montone, C.M., Piovesana, S., & Laganà, A. (2020). New insights in hemp chemical composition: A comprehensive polar lipidome characterization by combining solid phase enrichment, high-resolution mass spectrometry, and cheminformatics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(2), 413-423.
- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis, 15th Ed. The Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C, USA.
- AOAC. (2018). Determination of Cannabinoids in *Cannabis sativa* Dried Flowers and Oils.
- Ashaf-Ud-Doulah, M., Al Mamun, A., Rahman, M.L., Islam, S.M., Jannat, R., Hossain, M.A. R., & Shahjahan, M. (2020). High temperature acclimation alters upper thermal limits and growth performance of Indian major carp, rohu, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Journal of Thermal Biology*, 93, 1-9.
- Asmathulla, S., Koner, B., & Papa, D. (2011). Does oxidative stress play a role in altered plasma protein homeostasis in pregnancy-induced hypertension?. *Acta Physiologica Hungarica*, 98(3), 339-346.
- Audu, B. S., Ofojekwu, P.C., Ujah, A., & Ajima, M.N.O. (2014). Phytochemical, proximate composition, amino acid profile and characterization of Marijuana (*Cannabis sativa* L.). *The Journal of Phytopharmacology*, 3(1), 35-43.
- Axentii, M., & Codină, G.G. (2024). Exploring the Nutritional Potential and Functionality of Hemp and Rapeseed Proteins: A Review on Unveiling Anti-nutritional Factors, Bioactive Compounds, and Functional Attributes. *Plants*, 13(9), 1-21.
- Ayanwale, V.A., Tsadu, S.M., Lamai, S.L., Kolo, R.J., Auta, Y.I., & Mohammed, A.Z. (2015). Physiological Responses of the *Heterobranchus Bidorsalis* (Male) X *Clarias*

Gariepinus (Female) Hybrid (Heteroclarias) Fingerlings to Different Temperature Levels under Laboratory Conditions.

- Ayanwale, A., Oloruntoba, O., Keke, U., & Samuel, P. (2020). Temperature effects on the opercular respiratory rates of *Clarias anguillaris* fingerlings reared under Laboratory conditions in Minna, Nigeria. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 24(6), 47-58.
- Behera, B.K., Pradhan, P.K., Swaminathan, T.R., Sood, N., Paria, P., Das, A., Verma, D.K., Kumar, R., Yadav, M.K., Dev, A.K., Parida, PK., Das, B.K., Lal, K.K., & Jena, J.K. (2018). Emergence of Tilapia Lake Virus associated with mortalities of farmed Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) in India. *Aquaculture*, 484(2018), 168-174.
- Bielawiec, P., Dziemitko, S., Konstantynowicz-Nowicka, K., Chabowski, A., Dziecioł, J., & Harasim-Symbor, E. (2023). Cannabidiol improves muscular lipid profile by affecting the expression of fatty acid transporters and inhibiting de novo lipogenesis. *Scientific Reports*, 13(1).
- Blaxhall, P.C. & Daisley, K.W. (1973). Routine hematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5(6), 771-781.
- Camargo-dos-Santos, B., Bellot, M.S., Guermandi, I.I., Favero-Neto, J., da Silva Rodrigues, M., da Costa, D.F., Nóbrega, R.H., Filev, R., Gonçalves-de-Freitas, E., & Giaquinto, P.C. (2022). Cannabidiol improves Nile tilapia cichlid fish welfare. *Scientific Reports*, 12(1), 1-14.
- Cocetta, V., Governa, P., Borgonetti, V., Tinazzi, M., Peron, G., Catanzaro, D., Berretta, M., Biagi, M., Manetti, F., Dall'Acqua, S. & Montopoli, M. (2021). Cannabidiol isolated from *Cannabis sativa* L. protects intestinal barrier from in vitro inflammation and oxidative stress. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 1-14.
- Dan-kishiya, A.S., Solomon, J.R., & Alhaji, U.A. (2016). Influence of temperature on the respiratory rate of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) in the laboratory. *UNED Research Journal*, 8(1), 27-30.
- Das, P.C., Vista, A.R., Tabil, L.G., & Baik, O.D. (2022). Postharvest operations of cannabis and their effect on cannabinoid content: a review. *Bioengineering*, 9(8), 1-24.

- Dawood, M.A., Eweedah, N.M., El-Sharawy, M.E., Awad, S.S., Van Doan, H., & Paray, B.A. (2020). Dietary white button mushroom improved the growth, immunity, antioxidative status and resistance against heat stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 523, 1-9.
- Deonne. (2020). *Moving Forward in 2020 with the UF/IFAS Industrial Hemp Pilot Program*. Retrieved February 10, 2023, from <https://nwdistrict.ifas.ufl.edu>.
- Dumas, A., Liao, K.L., & Jeffries, K.M. (2022). Mathematical modeling and analysis of the heat shock protein response during thermal stress in fish and HeLa cells. *Mathematical Biosciences*, 346, 1-24.
- Dupree, H.K. & Hunner, J.V. (1984). Third Report to the Fish Farmers. The status of warm water fish farming and progress In: Fish Farming Research. U. S. Dept. of the Interior Fish and Wildlife Services, Washington D.C. 270.
- Dutta, S.S. (2022). *The Immunological Functions of Red Blood Cells*. Retrieved August 28, 2022, from <https://www.news-medical.net>.
- Eggestøl, H.Ø., Lunde, H.S., & Haugland, G.T. (2020). The proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) identification, molecular characterization, phylogeny and gene expression analyses. *Developmental & Comparative Immunology*, 105, 1-15.
- Grant, K.R. (2015). Fish hematology and associated disorders. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 18(1), 83-103.
- Humason, G.L. (1962). *Animal tissue techniques*. W.H. Freeman: San Francisco.
- Ishaq, M.S., Afridi, M.S., Ali, J., Hussain, M.M., Ahmad, S., & Kanwal, F. (2015). Proximate composition, phytochemical screening, GC-MS studies of biologically active cannabinoids and antimicrobial activities of *Cannabis indica*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(11), 897-902.
- Islam, S.M., Zahangir, M.M., Jannat, R., Hasan, M.N., Suchana, S.A., Rohani, M.F., & Shahjahan, M. (2020). Hypoxia reduced upper thermal limits causing cellular and nuclear abnormalities of erythrocytes in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Thermal Biology*, 90, 102604.
- Jauncey, K. (1998). *Tilapia Feeds and Feeding*. Pisces Press Sterling: Scotland.

- Jie, C., Limin, H., Liming, Z., Meng, X., Huanhuan, G., Caicai, K., Jianyong, Y., & Zongzhen, W. (2018). Optimization of microwave-assisted extraction of total flavonoids from china-hemp leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Lecture Notes in Electrical Engineering*, 444, 555-567.
- Jin, D., Dai, K., Xie, Z., & Chen, J. (2020). Secondary metabolites profiled in cannabis inflorescences, leaves, stem barks, and roots for medicinal purposes. *Scientific Reports*, 10(1), 1-14.
- Juries, T.C. (2021). The effects of Cannabidiol oil derived from Hemp on the growth performance and wellbeing of *Oreochromis niloticus* (Doctoral dissertation, Stellenbosch: Stellenbosch University).
- Karimi, I., Hayatghaibi, H., Yousefi, J., Saberivand, A., & Zavareh, S. (2007). The effect of *Cannabis sativa* L. (hemp seed) on hematological parameters in guinea pigs. *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders)*, 7(4), 288-290.
- Kishimoto, T. (2010). IL-6: from its discovery to clinical applications. *International immunology*, 22(5), 347-352.
- Khieokhajonkhet, A., Aeksiri, N., Ratanasut, K., Kannika, K., Suwannalers, P., Inyawilert, W., & Kaneko, G. (2022). Effects of dietary *Hericium erinaceus* powder on growth, hematology, disease resistance, and expression of genes related immune response against thermal challenge of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Feed Science and Technology*, 290, 1-14.
- Khieokhajonkhet, A., Sangphrom, S., Aeksiri, N., Tatsapong, P., Wuthijaree, K., & Kaneko, G. (2022). Effects of long-term exposure to high temperature on growth performance, chemical composition, hematological and histological changes, and physiological responses in hybrid catfish [σ *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) $\times$ ϕ *C. macrocephalus* (Günther, 1864)]. *Journal of Thermal Biology*, 105, 1-11.
- Kongkadee, K., Wisutiprot, W., Ingkaninan, K., & Waranuch, N. (2022). Anti-inflammation and gingival wound healing activities of *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* (hemp) extract and cannabidiol: An in vitro study. *Archives of Oral Biology*, 140.

- Lattos, A., Giantsis, I.A., Tsavea, E., Kolygas, M., Athanassopoulou, F., & Bitchava, K. (2022). Virulence genes and in vitro antibiotic profile of *Photobacterium damsela* strains, isolated from fish reared in Greek aquaculture facilities. *Animals*, 12(22), 1-14.
- Libanori, M.C.M., Santos, G.G., Pereira, S.A., Lopes, G.R., Owatari, M.S., Soligo, T.A., Yamashita, E., Pereira, U.P., Martins, M.L., & Mouriño, J.L.P. (2021). Dietary supplementation with benzoic organic acid improves the growth performance and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after challenge with *Streptococcus agalactiae* (Group B). *Aquaculture*, 545(2021), 1-8.
- Liu, Y., Xiao, A.P., Cheng, H., Liu, L.L., Kong, K.W., Liu, H.Y., ... & Gan, R.Y. (2022). Phytochemical differences of hemp (*Cannabis sativa* L.) leaves from different germplasms and their regulatory effects on lipopolysaccharide-induced inflammation in Martin-Darby canine kidney cell lines. *Frontiers in nutrition*, 9, 1-12.
- Mc Partland, J. (2018). *Cannabis* Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 3(1). 203-212.
- Madyod, S., Khongthong, S., & Khimmakthong, U. (2019). *Prevalence and risk factor for tilapia pathogen bacteria in cage-cultured tilapia (Oreochromis niloticus) and investigate drug resistance bacteria of tilapia pathogen bacteria in Tapi river, Nakhonsithammarat province*. (Research report). Songkhla: Rajamangala University of Technology Srivijaya.
- Magouz, F.I., Amer, A.A., Faisal, A., Sewilam, H., Aboelenin, S.M., & Dawood, M.A. (2022). The effects of dietary oregano essential oil on the growth performance, intestinal health, immune, and antioxidative responses of Nile tilapia under acute heat stress. *Aquaculture*, 548, 1-8.
- Malomo, S.A., & Aluko, R. (2015). A comparative study of the structural and functional properties of isolated hemp seed (*Cannabis sativa* L.) albumin and globulin fractions. *Food Hydrocolloid*, 43(2015), 743-752.
- Mirea, C., Cristea, V., Grecu, I., & Dediu, L. (2013). Influence of different water temperature on intensive growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis*

- niloticus*, Linnaeus, 1758) in a recirculating aquaculture system. *Lucrări Științifice-Seria Zootehnie*, 60, 1-5.
- Mobisson, S.K., Onyebuagu, P.C., Wopara, I., Izunwanne, D., Madu, E.C., Emeruem, A.C., Monye, J.B. & Obembe, A.O. (2023). Impact of Cannabidiol oil and prednisolone on liver enzymes, oxidative stress markers and liver histology in cadmium induced toxicity in male Wistar rats. *Journal of African Association of Physiological Sciences*, 11(1), 36-44.
- Mortuza, A., Mason, L., & Mustafa, A. (2021). Effects of CBD (Cannabidiol) on the haematological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus) under acute stress in vivo. *Aquaculture Research*, 11(52), 5375-5382.
- Nagy, D.U., Cianfaglione, K., Maggi, F., Sut, S., & Dall'Acqua, S. (2019). Chemical characterization of leaves, male and female flowers from spontaneous Cannabis (*Cannabis sativa* L.) growing in Hungary. *Chemistry & Biodiversity*, 16(3), 1-11.
- Ni, B., Liu, Y., Dai, M., Zhao, J., Liang, Y., Yang, X., ... & Jiang, M. (2023). The role of cannabidiol in aging. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 165, 1-11.
- Nichols, J.M. & Kaplan, B.L.F. (2019). Immune Responses Regulated by Cannabidiol. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 5(1), 12-31.
- Panase, P., Saenphet, S., & Saenphet, K. (2018). Biochemical and physiological responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Lin subjected to cold shock of water temperature. *Aquaculture Reports*, 11, 17-23.
- Pandelides, Z., Thornton, C., Faruque, A.S., Whitehead, A.P., Willett, K.L., & Ashpole, N. M. (2020). Developmental exposure to cannabidiol (CBD) alters longevity and health span of zebrafish (*Danio rerio*). *Geroscience*, 42, 785-800.
- Patterson, B. (2019). *Red Blood Cell (RBC) Count*. Retrieved February 10, 2023, from <https://slideplayer.com/slide/15234454>.
- Pinto, J.S., & Martel, F. (2022). Effects of cannabidiol on appetite and body weight: A systematic review. *Clinical drug investigation*, 42(11), 909-919.
- Radwan, M.M., Chandra, S., Gul, S., & Elsohly, M.A. (2021). Cannabinoids, phenolics, terpenes and alkaloids of cannabis. *Molecules*, 26(9), 1-29.

- Rahman, M. M., Lee, Y.D., & Baek, H.J. (2021). Acclimation temperature influences the critical thermal maxima (CT_{max}) of red-spotted grouper. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 24(7), 235-242.
- Roberts, R.J., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P., & Sung, Y.Y. (2010). Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *Journal of fish diseases*, 33(10), 789-801.
- Rodiles, A., Herrera, M., Hachero-Cruzado, I., Ruiz-Jarabo, I., Mancera, J.M., Cordero, M.L., Lall, S.P. & Alarcón, F.J. (2015). Tissue composition, blood biochemistry and histology of digestive organs in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles fed diets containing different plant protein ingredients. *Aquaculture nutrition*, 21(6), 767-779.
- Rodriguez-Leyva, D. & Pierce, G.N. (2010). The cardiac and haemostatic effects of dietary hempseed. *Nutrition & Metabolism*, 7(32), 1-9.
- Ruby, G. (2021). Thai researchers' feeding regime results in low production cost, high flesh yield in Nile tilapia. Fish Nutrition Research.
- Rudd, J. (2022). *CBD vs THC – What are the Main Differences?*. Retrieved August 25, 2022, from <https://www.analyticalcannabis.com>
- Santos, V.B.D., Mareco, E.A., & Dal Pai Silva, M. (2013). Growth curves of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) strains cultivated at different temperatures. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 35, 235-242.
- Saoud, I.P., Babikian, J., Nasser, N., & Monzer, S. (2018). Effect of cannabis oil on growth performance, haematology and metabolism of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture research*, 49(2), 809-815.
- Semwal, A., Kumar, A., & Kumar, N. (2023). A review on pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and their mitigation through medicinal herbs in aquaculture. *Heliyon*, 9(3), 1-23.
- Serwecińska, L. (2020). Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: a risk to the environment and to public health. *Water*, 12(12), 1-17.
- Sun, J.L., Zhao, L.L., Cui, C., Du, Z.J., He, Z., Wang, Y., ... & Yang, S. (2019). Influence of long-term temperature stress on respiration frequency, Na⁺/K⁺-ATPase

- activity, and lipid metabolism in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of thermal biology*, 83, 165-171.
- Turner, C.E., Elsohly, H.N., Lewis, G.S., Lopez-Santibanez, I., & Carranza, J. (1982). Constituents of *Cannabis sativa* L., XX: the cannabinoid content of Mexican variants grown in Mexico and in Mississippi, United States of America. *Bull Narc*, 34(1), 45-59.
- Tveteras, R. (2016). Global fish production data & analysis. In *Global Outlook for Aquaculture Leadership Conference in Guangzhou*.
- Wang, Z., Wang, X., Li, J., Gong, Y., Li, Q., Bu, X., ... & Ai, Q. (2023). Effects of cannabidiol on growth performance, appetite, antioxidant capacity and liver inflammatory gene expression of juvenile large yellow croaker (*Larmichthys crocea*) fed diets with high soybean oil level. *Aquaculture*, 574, 1-11.
- Waris, Z., Iqbal, Y., Arshad Hussain, S., Khan, A.A., Ali, A., & Khan, M.W. (2018). 19. Proximate composition, phytochemical analysis and antioxidant capacity of *Aloe vera*, *Cannabis sativa* and *Mentha longifolia*. *Pure and Applied Biology*, 7(3), 1122-1130.
- Witeska, M., Kondera, E., Ługowska, K., & Bojarski, B. (2022). Hematological methods in fish–Not only for beginners. *Aquaculture*, 547, 1-17.
- Yue, G.H., Tay, Y.X., Wong, J., Shen, Y., & Xia, J. (2024). Aquaculture species diversification in China. *Aquaculture and Fisheries*, 9(2), 206-217.
- Zhu, J., Yi, J., Kang, Q., Huang, J., Cui, Y., Zhang, G., Wang, Z., Zhang, L., Zheng, Z., Lu, J., & Hao, L. (2021). Anti-fatigue activity of hemp leaves water extract and the related biochemical changes in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 150, 1-7.

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบอาหาร

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Crude protein analysis)

(วิธีวิเคราะห์ Kjeldahl Method)

หลักการ

โปรตีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโมเลกุลใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนเชื่อมต่อกัน การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในอาหารใช้วิธีวิเคราะห์ของ Kjeldahl Method เพื่อหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหาร โดยย่อยตัวอย่างในกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ซึ่งจะได้สารกลุ่ม อะมิโน (NH_2) และกรดอะมิโนอิสระ (ยกเว้นสารพวก Nitrate และ Nitrite) โดยการเปลี่ยนไนโตรเจนที่มีในอาหารให้กลายเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 40% แอมโมเนียมซัลเฟตจะถูกกลั่นออกมาในรูปของก๊าซแอมโมเนียแล้วจับไว้ด้วยกรดมาตรฐาน (Standard acid) เมื่อนำ Standard acid + NH_4^+ มาไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นให้ทำปฏิกิริยากัน ค่าที่นำมาคำนวณปริมาณไนโตรเจน (N) แล้วคูณด้วยค่า Factor คือ $\text{N} \times 6.25$ ทำให้ทราบปริมาณโปรตีนในอาหารนั้นๆ การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการ Kjeldahl nitrogen analysis เป็นวิธีทั่วไปที่ใช้วิเคราะห์หาไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหารมี 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. การย่อย (Digestion) เป็นการเปลี่ยนแปลงสารไนโตรเจนให้อยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น ตัวอย่างถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริกที่อุณหภูมิสูง กรดซัลฟูริกจะทำหน้าที่เป็นตัวออกซิไดซ์ (Oxidizing agent) ปฏิกิริยาจะถูกเร่งโดยการเติม Catalyst เช่น Copper sulfate และเติม Potassium sulfate เพื่อเพิ่มอุณหภูมิของปฏิกิริยา หลังการย่อยเสร็จแล้วไนโตรเจนจะถูกจับอยู่ในรูปของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ส่วนคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และ Sulfur dioxide จะเกิดจากการระเหยออกไป
2. การกลั่น (Distillation) เป็นการกลั่นเพื่อไล่แอมโมเนียออกไปโดยใช้ Sodium hydroxide (NaOH) ที่เข้มข้นมากพอลงในแอมโมเนียมซัลเฟต และให้ความร้อน ก๊าซแอมโมเนีย (NH_3) ถูกปล่อยออกมาในระหว่างการกลั่น ซึ่ง NH_3 จะถูกจับด้วยสารละลาย Boric acid
3. การไตเตรท (Titration) เป็นการหาปริมาณของก๊าซแอมโมเนียที่เกิดจากการกลั่นเพื่อนำไปคำนวณหาค่าของไนโตรเจนทั้งหมดในอาหาร ค่าที่ได้นำไปคำนวณ

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance 4 digits)
2. เครื่องย่อยไนโตรเจน (Digestion unit)
3. เครื่องกลั่นไนโตรเจน (Distillation unit)
4. ชุดไตเตรต (Burette, clamp holder, Stand)
5. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
6. กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 20 มิลลิลิตร
7. ปีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร (Beaker)
8. หลอดกลั่นไนโตรเจน 8 หลอด (Digestion tube)
9. ช้อนตักสาร (Spatula stainless)
10. กระดาษชั่งสาร (Weighing paper)
11. ถุงมือกันความร้อน (Oven mitt)

สารเคมี

1. Catalyst mixture (ประกอบด้วย Potassium sulfate 100 กรัม + Copper sulfate 7 กรัม)
2. Sulfuric acid (H_2SO_4) เข้มข้น 93-98%
3. สารละลาย Sodium hydroxide (NaOH) 40%
4. สารละลาย Sodium hydroxide (NaOH) 15%
5. สารละลาย Boric acid (H_3BO_3) 4%
6. สารละลายกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (0.1 นอร์มอล)
7. Mix indicator
8. น้ำกลั่น

การเตรียมสารละลาย

1) การเตรียม Mix indicator ชั่งเมทิลเรด (Methyl red) 0.2 กรัม และโบรโมครีซอลกรีน (Bromocresol green) 0.1 กรัม ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 96% (96% Ethyl alcohol) 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา และเก็บในที่เย็นไม่ถูกแสง

2) สารละลาย Boric acid 4% ชั่ง Boric acid 40 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นร้อน รอจนสารละลายเย็น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

3) สารละลาย Sodium hydroxide (NaOH) 40% ซึ่ง Sodium hydroxide 400 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

4) สารละลาย Sodium hydroxide (NaOH) 20% ซึ่ง Sodium hydroxide 200 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

วิธีการ

ก. ขั้นตอนการย่อย (Digestion)

- 1) ชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.1500 กรัม โดยชั่งด้วยกระตาศกรงที่ปราศจากสารไนโตรเจน จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W) แล้วใส่ห่อกระตาศในหลอดแก้ววิเคราะห์โปรตีน
- 2) เติมสารเร่งรวม (Catalyst) 3 กรัม เพื่อเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อย
- 3) เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร การเติมกรดทำในตู้ดูดควัน ให้เอียงหลอดค่อย ๆ รินกรดลงด้านข้างโดยรอบเพื่อให้กรดชะล้างตัวอย่างที่อาจติดอยู่ด้านข้างออกให้หมด
- 4) นำตัวอย่างไปย่อยด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีน ที่อุณหภูมิ 380 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จนกระทั่งสารละลายในหลอดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเป็นสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็น 30 นาที

ข. ขั้นตอนการกลั่น (Distillation)

การเตรียมเครื่องกลั่น

- 1) เปิดเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Colling unit 10-15 องศาเซลเซียส ก่อนเปิดเครื่องกลั่น 20 นาที
- 2) ตรวจสอบปริมาณน้ำกลั่น และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40% ในถัง ตรวจสอบท่อที่ต่อกับตัวเครื่อง ไล่ฟองอากาศในท่อหลัง เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศในท่อดูด และได้ปริมาตรสารที่ถูกต้อง จากนั้นเปิดสวิตช์เครื่องด้านหลัง
- 3) กดปุ่ม Preheating เพื่อให้เครื่องทำงานประมาณ 5 นาที ระหว่างเครื่องทำงานจะเกิดเสียงดัง เนื่องจากความแตกต่างของอุณหภูมิ น้ำกับไอน้ำในระบบกลั่น เมื่ออุณหภูมิใกล้เคียงกันเสียงดังจะหายไป เมื่อเครื่องทำงานเสร็จแล้วจะดูดสารในหลอดทิ้งโดยอัตโนมัติ ไฟ Start จะติด เครื่องจึงจะใช้งานได้

*การทำ Preheating ต้องทำทั้งก่อนการกลั่น และหลังการกลั่นตัวอย่างเสร็จสิ้นในแต่ละครั้งเสมอ เพื่อทำความสะอาด และลดการปนเปื้อนของตัวอย่างแต่ละชุด

การกลั่น (Distillation)

- 1) เติมกรดบอริก 40 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นหยดอินดิเคเตอร์รวมในกรดบอริก 2-3 หยด ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีชมพู

2) ตั้งโปรแกรมเครื่องกลั่น โดยใช้ H_2O 50 ml และ NaOH 50 ml

3) ใส่หลอดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับเครื่องกลั่นซ้ายมือให้หลอดสวมกับลูกยางพอดี กดลิ้นค หลอดย่อยลง ปิดฝาครอบให้สนิท และใส่ขวดรูปชมพู่ที่มีกรดบอริกเข้ากับแท่นวางให้หลอดจุ่มใน สารละลายตลอด

4) กดปุ่ม Start เพื่อทำการกลั่นตัวอย่าง เครื่องกลั่นจะทำการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงใน หลอดแก้ววิเคราะห์อย่างช้า ๆ จนกระทั่งสารละลายในหลอดแก้วมีสีดำ ถ้าไม่เปลี่ยนสีสามารถเติม NaOH โดยกดปุ่มเติม NaOH จนสารละลายในหลอดย่อยเปลี่ยนเป็นสีดำ (End point) ขณะกลั่น ตัวอย่าง ก๊าซแอมโมเนียจะถูกปล่อยออกมาหลังทำปฏิกิริยากับ NaOH 40% ระเหยจับกับความเย็นที่ Condenser ทำให้ก๊าซจับตัวเป็นน้ำหยดลงในกรดบอริก 4% ทำให้สารละลายในขวดรูปชมพู่เปลี่ยน จากสีชมพูเป็นสีเขียว

4) เมื่อเครื่องทำงานจนเสร็จ นำหลอดแก้ว และขวดรูปชมพู่ออกจากเครื่องกลั่น

ค. ขั้นตอนการไทเทรต (Titration)

1) นำสารละลายที่กลั่นได้มาไทเทรตด้วยกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (0.1 นอร์มอล) จนถึงจุดยุติ (End point) สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีใส

2) บันทึกปริมาตรของกรดเกลือ (V_2) เพื่อใช้คำนวณต่อไป

การคำนวณ

$$\text{โปรตีน (\%)} = [1.4 \times (V_2 - V_1) \times N \times 6.25] / W$$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไทเทรต blank

V_2 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไทเทรตตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบ

N = ความเข้มข้นของกรดเกลือเป็นนอร์มอล

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ (กรัม)

การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Fat analysis)

หลักการ

ไขมันเป็นสารอินทรีย์ (Organic matter) ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชหรือสัตว์ มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (Water insoluble) แต่ละลายในสารอินทรีย์ (Organic solvent) ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณไขมันจึงสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ที่ระเหยง่าย เช่น Petroleum ether, Diethyl ether, Acetone เป็นต้น ไขมันในอาหารสัตว์ที่ได้จากการสกัดสารละลายอินทรีย์ประกอบไปด้วยไขมันแท้ (True fat) และสารคล้ายไขมัน (Fat like substances) เช่น Wax, Carotenoid, Volatile acid, Pigments ต่างๆ เป็นต้น สารที่สกัดได้เรียกว่า Etherextract หรือ Crude fat ประกอบด้วยไขมันแท้ (True fat) และสารคล้ายไขมัน (Fat like substance) เช่น Glycerol, Fatty acid, Waxes, Volatile acid, Sterol, Carotene, Chlorophyll และ Pigments ต่างๆ ดังนั้นในการหาปริมาณสารกลุ่มนี้จึงใช้การสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ อีเธอร์ ให้ได้ไขมันที่ต้องการออกมาพร้อมตัวทำละลาย จากนั้นจึงระเหย อีเธอร์ออกไปให้หมด ส่วนที่เหลืออยู่ ได้แก่ สารอินทรีย์ที่ต้องการทราบปริมาณไขมัน หรือ สารอินทรีย์ที่ได้จาก Ether extraction

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance 4 digits)
2. ตู้อบความร้อนไฟฟ้า (Hot air oven)
3. โถดูดความชื้น (Desicator)
4. คีมคีบสำหรับจับถ้วยอบตัวอย่าง (Crucible tong)
5. กระดาษกรองน้ำตาล (Filter paper)
6. ปีกเกอร์แก้วสำหรับวิเคราะห์ไขมัน (Beaker)
7. ไส้กรองสำหรับใส่ตัวอย่าง (Thimble)
8. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Soxtec fat extraction)

วิธีการ

1) อบปีกเกอร์แก้วที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน (W_1)

2) ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่กระดาษกรอง 2.0000 กรัม จดบันทึกน้ำหนัก (W_2) จากนั้นห่อกระดาษกรองที่มีตัวอย่างให้มิดชิด และใส่ลงในไส้กรอง (Thimble) จากนั้นนำไปใส่ลงในปีกเกอร์แก้วที่เตรียมไว้

- 3) เติมน้ำมันอีเทอร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์แก้ว นำเข้าเครื่องวิเคราะห์ไขมัน
- 4) เปิดเครื่องทำความเย็น จนทำความเย็นให้ได้อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส และเปิดเครื่องวิเคราะห์ไขมัน และนำตัวอย่างเข้าเครื่องวิเคราะห์ไขมัน ตั้งค่าให้เครื่องเริ่มทำงาน
- 5) เมื่อเครื่องสิ้นสุดการทำงาน นำบีกเกอร์ออกจากเครื่อง และนำกระดาษกรองออกจากบีกเกอร์ นำบีกเกอร์ที่มีไขมันอยู่ที่ก้นไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกว่าตัวอย่างจะแห้ง
- 6) นำบีกเกอร์ออกมาใส่โถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (W_3)

การคำนวณ

$$\% \text{ ไขมัน} = [(W_3 - W_1) / W_2] \times 100$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักบีกเกอร์

W_2 = น้ำหนักตัวอย่าง

W_3 = น้ำหนักบีกเกอร์ และไขมันหลังอบ



การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (Moisture analysis)

การวิเคราะห์หาความชื้นแบบ Drying method โดยใช้ตู้อบความร้อน

หลักการ

ความชื้น หรือน้ำเป็นองค์ประกอบอย่างหนึ่งในวัตถุดิบอาหารสัตว์ ซึ่งจะมีปริมาณผกผันกับปริมาณวัตถุแห้ง (Dry matter) โดยเกิดจากการระเหยของน้ำกลายเป็นไอออกจากอาหารสัตว์ซึ่งวัตถุดิบอาหารสัตว์แต่ละชนิดมีปริมาณความชื้นแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด และปัจจัยต่างๆ ความชื้นเป็นน้ำหรือสารระเหยได้ทั้งหมดที่สูญเสียไปจากตัวอย่างเพื่อเพิ่มความร้อนให้แก่อาหาร อุณหภูมิที่ให้แก่อาหารต้องไม่สูงกว่าจุดเดือดของน้ำ จากหลักการนี้จึงนำอาหารไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ แล้วนำค่าของน้ำหนักที่หายไปมาคำนวณหาค่าความชื้น การหาความชื้นด้วยวิธีนี้ไม่เหมาะสมกับตัวอย่างที่มีสารระเหยง่ายเป็นส่วนประกอบ เพราะจะระเหยออกมาได้ขณะอบ ทำให้ค่าความชื้นสูงกว่าความเป็นจริง ค่าที่ได้จากการหาความชื้น และวัตถุแห้งยังสามารถนำมาใช้ในการคำนวณปริมาณอาหารสัตว์ในการประกอบสูตรอาหารสัตว์

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่ง (Analytical balance 4 digits)
2. ตู้อบความร้อนไฟฟ้า (Hot air oven)
3. ถ้วยกระเบื้อง (Crucible)
4. โถดูดความชื้น (Desicator)
5. คีมคีบสำหรับจับถ้วยอบตัวอย่าง (Crucible tong)

วิธีการ

- 1) บดตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์ให้มีขนาดเล็กที่สุด
- 2) เตรียมถ้วยกระเบื้องเคลือบที่สะอาด นำมาอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำออกจากเตาอบ และใส่ไว้ในโถอบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักที่คงที่ (A)
- 3) ชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่ทราบน้ำหนักแน่นอน และจดบันทึกน้ำหนักตัวอย่าง (W)
- 4) นำถ้วยกระเบื้องเคลือบไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 5) นำถ้วยกระเบื้องเคลือบออกจากเตาอบ และทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น 30 นาที
- 6) เมื่อเย็นแล้วนำถ้วยตัวอย่างอาหารมาชั่งน้ำหนัก และจดบันทึก

7) นำถ้วยกระเบื้องเคลือบกลับเข้าตู้อบต่อ ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อที่ 4-6 จนกระทั่งได้น้ำหนักที่คงที่ แสดงว่าน้ำได้ระเหยออกจากตัวอย่างหมดแล้ว และจดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (B)

การคำนวณ

$$\% \text{ ความชื้น} = [(W+A) - B] \times 100 / W$$

เมื่อ A = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบ

B = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบ + ตัวอย่างหลังเข้าตู้อบ

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์



การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (Crude ash analysis)

หลักการ

ปริมาณเถ้าทั้งหมด (Total ash) ในอาหารสัตว์น้ำถือเป็นส่วนที่เป็นสารอนินทรีย์ที่เหลืออยู่หลังจากสารอินทรีย์ถูกเผาไหม้ไปทั้งหมดแล้ว เถ้าที่เหลืออยู่อาจจะไม่ได้อยู่ในลักษณะเดิมหรือในปริมาณเดิมที่พบในอาหารทั้งหมด เพราะบางส่วนอาจจะระเหยไป และบางส่วนอาจแปรสภาพ สารอนินทรีย์ที่เหลือ คือ แร่ธาตุที่มีปริมาณมาก (Macroelements) เช่น Ca P K Mg เป็นต้น แร่ธาตุที่มีปริมาณมาก (Microelements) เช่น Cl I Mn Se Z เป็นต้น โดยการหาปริมาณเถ้าเป็นการเผาตัวอย่างด้วยอุณหภูมิที่สูงประมาณ 550 – 600 องศาเซลเซียส ส่วนที่เป็นสารอินทรีย์จะสลายตัวกลายเป็นน้ำ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนที่เหลือคือเถ้า ระยะเวลาที่ใช้ในการเผาเถ้าขึ้นอยู่กับชนิด และปริมาณของตัวอย่างโดยทั่วไปปริมาณเถ้าที่พบในอาหารมีปริมาณคงที่ไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงมากนัก จึงสามารถใช้ปริมาณเถ้าเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของอาหารบางชนิดได้ หากพบว่าปริมาณเถ้าสูงกว่าปกติ แสดงว่ามีการปลอมแปลงหรือเจือปนด้วยวัสดุอาหาร หรือสิ่งปลอมปนชนิดอื่น ๆ เช่น แป้ง ขนไก่ กระดูกป่น เป็นต้น

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance 4 digits)
2. เตาเผาเถ้า (Muffle furnace)
3. ถ้วยสำหรับเผาเถ้า (Crucible)
4. โถดูดความชื้น (Desicator)
5. คีมคีบสำหรับจับถ้วยอบตัวอย่าง (Crucible tong)

วิธีการ

- 1) อบถ้วยกระเบื้องเคลือบในตู้อบความร้อนไฟฟ้าที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด (A)
- 2) ชั่งตัวอย่างใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบปริมาณ 2 กรัมอย่างละเอียด (อาจใช้ตัวอย่างที่ทำปริมาณความชื้นแล้วมาวิเคราะห์ปริมาณเถ้าต่อได้) (W)
- 3) วางถ้วยกระเบื้องเคลือบที่มีตัวอย่างอาหารบนเตาเผา ตั้งเวลาเผาเป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่ 550 องศาเซลเซียส
- 4) เมื่ออุณหภูมิของเตาเผาเย็นลงให้นำใส่โถอบความชื้น 30 นาทีและชั่งน้ำหนักสุดท้าย (B)

การคำนวณ

$$\% \text{ เถ้า} = [(B - A) \times 100] / W$$

เมื่อ A = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบ

B = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบ + ตัวอย่างหลังเผา

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์



การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย (Crude fiber analysis)

หลักการ

การวิเคราะห์หาปริมาณเยื่อใย คือ การหาปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่ร่างกายของสัตว์ไม่สามารถทำการย่อยได้ด้วยเอนไซม์ รวมทั้งสารพอลิกลินิน หลักการวิเคราะห์เยื่อใยทั้งหมดในอาหาร คือ ทำให้สารที่ไม่ใช่ผนังเซลล์ของพืช อยู่ในรูปของสารละลายโดยย่อยอาหารด้วยสารละลายกรดเจือจาง (Sulfuric acid) โปรตีน แป้ง และน้ำตาลจะถูกย่อยสลาย และย่อยด้วยด่างเจือจาง (Potassium hydroxide หรือ Sodium hydroxide) จะทำการย่อยแป้งที่เหลือจากการย่อยด้วยกรด ดังนั้น เมื่อย่อยสารอินทรีย์ต่าง ๆ ที่ถูกย่อยได้ออกไป ส่วนของสารอินทรีย์ที่เหลืออยู่ และไม่ถูกย่อย คือ เยื่อใย (Crude Fiber) หากค่าปริมาณเยื่อใยหยาบมีค่าสูงมาก แสดงว่าคุณค่าทางโภชนาการของอาหารต่ำ

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance 4 digits)
2. เครื่องวิเคราะห์เยื่อใย
3. ขวดสำหรับใส่กรด และด่าง
4. เครื่องกรอง (Filtering device)
5. ตู้อบ (Hot air oven)
6. เตาเผา (Muffle furnace)
7. โถดูดความชื้น (Desiccator)
8. ถ้วยกระเบื้องเคลือบชนิดมีรูที่ก้น (Gooch crucible) หรือ (Glass filter crucible)

วิธีการ

- 1) นำตัวอย่างอาหารภายหลังที่ได้วิเคราะห์หาไขมันเสร็จเรียบร้อยแล้วมาชั่งประมาณ 2-3 กรัม แล้วถ่ายลงในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร
- 2) ถ้าอาหารที่วิเคราะห์มีเปอร์เซ็นต์แป้งสูงหรือละเอียดมาก ๆ ให้ใส่แอสตอสที่เตรียมไว้แล้ว 1 กรัม แล้วเติมกรดกำมะถันเข้มข้น 1.25 เปอร์เซ็นต์ 200 มิลลิลิตร ที่ต้มจนเดือด ถ้าอาหารมีฟองมาก ให้หยดแอนติโฟม (Antifoam) 1 หยด และสารกันกระแทก (Bumping chip) 2-3 ชิ้นลงไปด้วย นำเข้าเครื่องย่อยหาเยื่อใยที่มีเครื่องควบแน่น (Condenser) เพื่อควบคุมความเข้มข้นให้คงที่เป็นเวลา 30 นาที

3) นำสารละลายออกจากเครื่องย่อยแล้วกรองด้วยเครื่องกรองหรือผ้าลินินบนกรวยกรอง (Buchner funnel) ที่ต่อกับฟลาสกรอง (Filtering flask) โดยอาศัยเครื่องปั๊ม (Suction pump) ช่วยล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนจนหมดกรด

4) ถ่ายตะกอนคั้นลงไปในปีกเกอร์ เติมน้ำโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25 เปอร์เซ็นต์ 200 มิลลิลิตร ที่ได้ต้มจนเดือดแล้ว รีบนำกลับคืนไปเข้าเครื่องย่อยแล้วต้มต่อให้เดือดเป็นเวลานาน 30 นาที

5) นำสารละลายออกจากเครื่องย่อยแล้วกรองเช่นเดียวกับข้อที่ 3 ล้างตะกอนจนหมดต่างเสร็จแล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ประมาณ 20 - 25 มิลลิลิตร

6) ใช้ผ้าลินินตัวอย่างตะกอนออกจากผ้าใส่ถุงลงกระเบื้องเคลือบ พยายามขูดตะกอนด้วยช้อนและเหล็กชูด (Spatula) ออกจากผ้าให้มากที่สุด ต้องทำอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้ตะกอนหก หรือหล่นได้

7) นำตะกอนที่ได้มาอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

8) นำออกมาทิ้งให้เย็นด้วยโถอบแห้ง แล้วชั่งให้น้ำหนักคงที่

9) นำไปเผาในเตาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีแล้วทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง และชั่งให้น้ำหนักคงที่

การคำนวณ

$$P = [(A - B) \times 100] / W$$

เมื่อ P = เปอร์เซ็นต์ของเยื่อใยทั้งหมด

A = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบ + น้ำหนักกากที่ย่อยหลังจากอบแห้งแล้ว

B = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบ + น้ำหนักเถ้าหลังจากเผาแล้ว

W = น้ำหนักของอาหารที่ใช้หาเยื่อใย

ภาคผนวก ข

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในกัญชง



SHIMADZU

LabSolutions

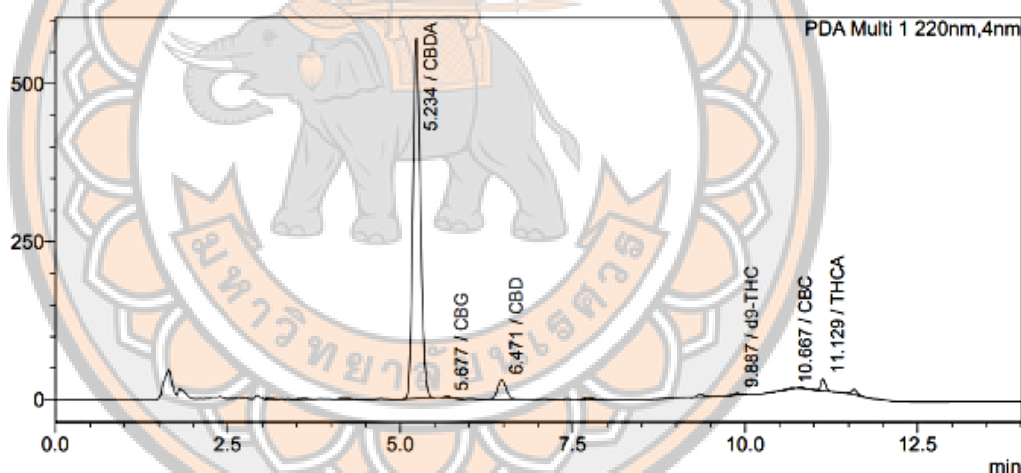
Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : S1-1
 Sample ID :
 Data Filename : S1-1_003.lcd
 Method Filename : cannabis method 2023.lcm
 Batch Filename : batch samples Aj. TUM 03032566.lcb
 Vial # : 1-3
 Injection Volume : 5 µL
 Date Acquired : 7/4/2566 16:16:48
 Date Processed : 7/4/2566 16:30:50
 Sample Type : Unknown
 Level : 1
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

PDA Ch1 220nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Resolution(USP)
4	CBDA	5.234	4323880	570132	88.185	ppm	4.409
5	CBG	5.677	19350	3017	0.968	ppm	2.146
6	CBD	6.471	265907	31203	6.726	ppm	3.630
9	d9-THC	9.887	17922	3153	1.132	ppm	3.068
10	CBC	10.667	17112	1996	1.008	ppm	4.454
12	THCA	11.129	86529	19129	3.304	ppm	2.155

ภาคผนวก ค
ภาพการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสัต์ทดลอง



ภาคผนวก ค1 การอนุบาลลูกปลานิลในถังไฟเบอร์ขนาด 500 ลิตร



ภาคผนวก ค2 การเลี้ยงปลานิลในถังไฟเบอร์ขนาด 200 ลิตร เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

2. การเตรียมอาหารทดลอง

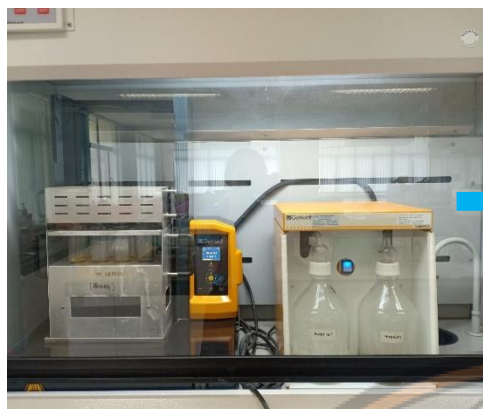


ภาคผนวก ค3 การเตรียมใบกล้วยบดละเอียด



ภาคผนวก ค4 ขั้นตอนการเตรียมอาหารทดลอง

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง และตัวปลา



ขั้นตอนการย่อย

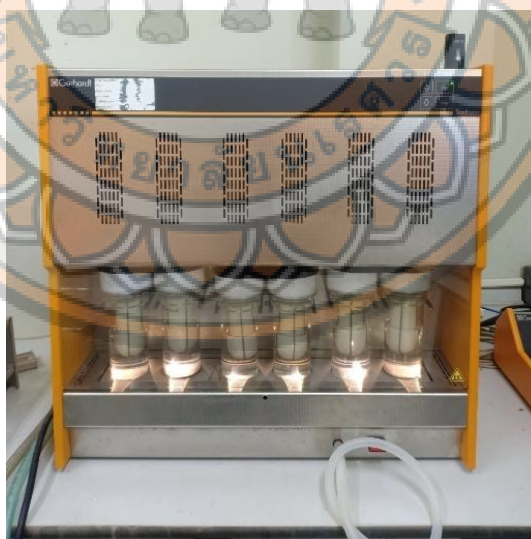


ขั้นตอนการกลั่น



ขั้นตอนการไตเตรท

ภาคผนวก ค5 การวิเคราะห์โปรตีน



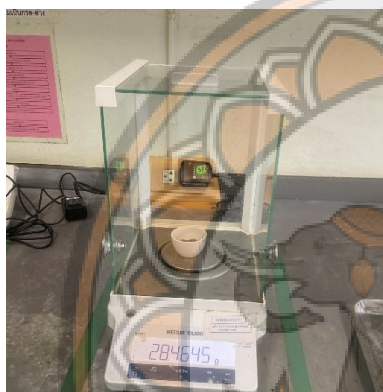
ภาคผนวก ค6 การวิเคราะห์ไขมัน



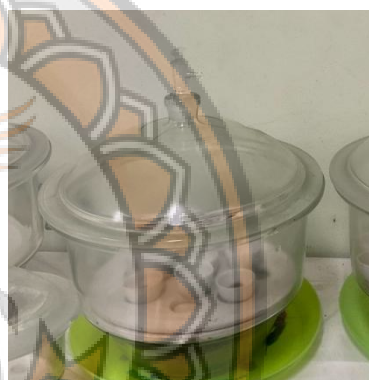
ซังตัวอย่าง
ประมาณ 2 กรัม



อบในตู้อบความร้อนไฟฟ้า
ที่ 105°C นาน 48 ชม.



ซังน้ำหนักจนได้น้ำหนักที่
แน่นอน และจดบันทึก



พักไว้ในโถดูดความชื้น

ภาคผนวก ค7 การวิเคราะห์ความชื้น



นำตัวอย่างที่หาความชื้นแล้วมาเผา
ในเตาเผาที่ 550 °C นาน 3 ชม.



พักไว้ในโถดูดความชื้น



ซังน้ำหนักจนได้น้ำหนักที่
แน่นอน และจดบันทึก

ภาคผนวก ค8 การวิเคราะห์เถ้า



อบปลาในตู้อบลมร้อนที่ 60 °C นาน 48 ชม.



นำตัวปลาบดในเครื่องปั่นให้ละเอียด
เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าโปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้า

ภาคผนวก ค9 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา



4. การวัดการเจริญเติบโตของปลานิล



ภาคผนวก ค10 การวัดความยาวปลาทดลอง

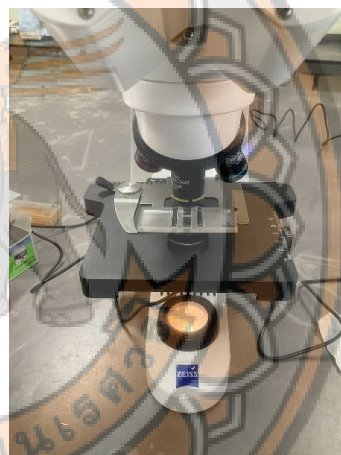


ภาคผนวก ค11 การชั่งน้ำหนักปลาทดลอง

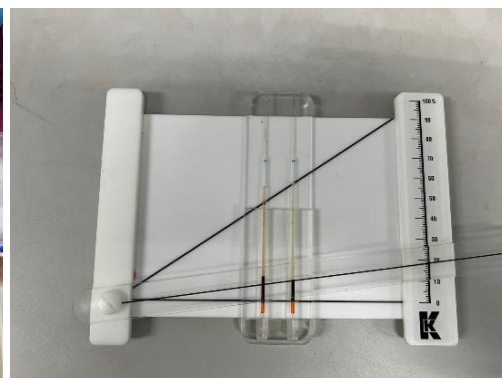
5. การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา



ภาคผนวก ค12 การเก็บตัวอย่างเลือดปลาเน็ต



ภาคผนวก ค13 การนับปริมาณเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาว



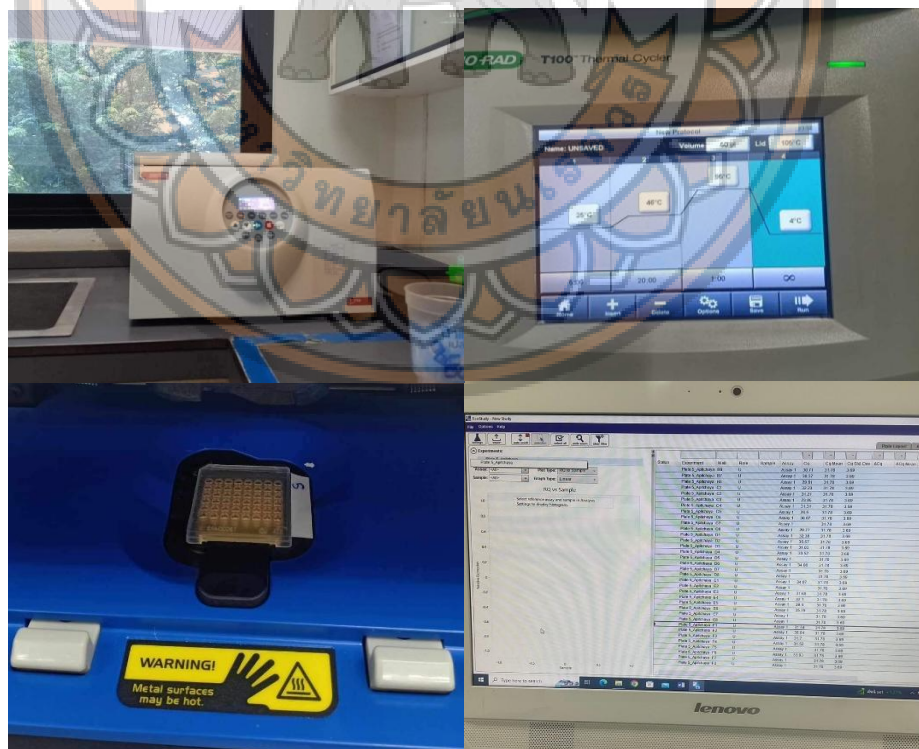
ภาคผนวก ค14 การวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น

6. การทดสอบความเครียดในปลานิลที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ



ภาคผนวก ค15 การทดสอบความเครียดในปลานิลที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

7. การวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน



ภาคผนวก ค16 การวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน