

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

● อุปกรณ์ในการสกัดและแยกสาร

1. Rotary evaporator, Water bath รุ่น B-480, rotavapor รุ่น R-124 ของ Buchi Switzerland
2. ตู้อบ
3. เครื่องบดสมุนไพร
4. ผ้าขาวบาง
5. เครื่องกรองสุญญากาศ
6. กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร
7. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น Mettler toledo
8. เครื่องแก้ว เช่น กระจกดวง ปีกเกอร์ขนาด 100, 250, 500, 1000 มิลลิลิตร แ่งแก้วคนสาร กรวย Flask
9. ขวดแก้วกลมฝาเกลียว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร สูง 10 เซนติเมตร
10. Ultrasonic bath รุ่น BANDELIN SONOREX SUPER RK510H
11. Vacuum hot air oven

● อุปกรณ์ในการเลี้ยงและทดสอบไรทะเล

1. กุ้งนาม UHT 2 กุ้ง
2. กระดาษฟลอยด์
3. โคมไฟตั้งโต๊ะ
4. เกลือทะเล
5. ขวดน้ำกลั่น
6. ขวดน้ำเกลือ
7. หลอดทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร
8. ปากกา label

9. Micropipete ขนาด 1-200 ไมโครลิตร
10. Tip ขนาด 1-200 ไมโครลิตร

● อุปกรณ์ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเมล็ดสารภีและรากหนอนตายหยากในการกำจัดแมลงศัตรูพืชตระกูลกะหล่ำในระดับแปลงปลูก

1. เครื่องพ่นสารกำจัดศัตรูพืชแบบสะพายหลัง
2. อุปกรณ์สำหรับเตรียมแปลงทดลอง
3. ขวดแก้วสำหรับใส่สารสกัด

● อุปกรณ์ในการทดสอบยืนยันประสิทธิภาพของสารสกัดจากเมล็ดสารภีและรากหนอนตายหยากในการกำจัดแมลงศัตรูพืชตระกูลกะหล่ำ โดยวิธี direct contact application

1. Petri dish
2. กระดาษกรอง whatman เบอร์ 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร
3. คีมคีบ
4. Fume hood
5. พู่กันขนาดเล็ก

● อุปกรณ์ในการวัดคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของสารสกัด

1. เครื่องวัดค่าความขุ่น (Turbidity) ของ JENWAY รุ่น 6035 Turbidimeter
2. เครื่องวัดสีสารละลาย ของ Hunter Lab รุ่น Color Quest XE (2428)

3.2 สารเคมี

1. Ethanol 95%
2. Sodium sulfate anhydrous
3. น้ำกลั่น
4. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
5. สารจับใบ (Latron CS-7)
6. Tween 80
7. สารกำจัดแมลงศัตรูพืช (carbosulfan)

3.3 พืชวัชตูดิบ

- เมล็ดสารภี (*Mammea siamensis* Miq. T. And.)
- รากหนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hk.f.)

3.4 พืชทดลอง

- คะน้า (*Brassica oleracea* var. *albograba*)
- กวางตุ้ง (*Brassica chinensis* Jusl var. *parachinensis* Bailey)

3.5 สัตว์ทดลอง

- ไโรทะเล (*Artemia salina* Leach.)
- ค้างหมัดผัก (*Phyllotreta sinuata* Steph)
- เพลี้ยอ่อน (*Brevicoryne brassicae* L.)
- หนอนใยผัก (*Plutella xylostella*)

3.5 วิธีการวิจัย

แบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลองตามวัตถุประสงค์ของการวิจัย โดยการทดลองที่ 1-3 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเมล็ดสารภีและรากหนอนตายหยากในการกำจัดแมลงศัตรูพืชตระกูลกะหล่ำ และการทดลองที่ 4 เพื่อทดสอบความคงฤทธิ์และลักษณะทางกายภาพบางประการของสารสกัดจากเมล็ดสารภีและรากหนอนตายหยาก เมื่อเก็บในสภาวะที่แตกต่างกัน

การทดลองที่ 1 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเมล็ดสารภี รากหนอนตายหยาก และสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช carbosulfan ในไโรทะเล

การทดลองที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเมล็ดสารภีและรากหนอนตายหยากในการกำจัดแมลงศัตรูพืชตระกูลกะหล่ำในระดับแปลงปลูก

การทดลองที่ 3 การทดสอบยืนยันประสิทธิภาพของสารสกัดจากเมล็ดสารภีและรากหนอนตายหยากในการกำจัดแมลงศัตรูพืชตระกูลกะหล่ำ โดยวิธี direct contact application

การทดลองที่ 4 การทดสอบความคงฤทธิ์และลักษณะทางกายภาพบางประการของสารสกัดจากเมล็ดสารภีและรากหนอนตายหยาก เมื่อเก็บรักษาไว้ในสภาวะที่แตกต่างกัน

ก่อนทำการทดลองในทุกขั้นตอนเตรียมสารสกัดจากพืชในรูปที่เหมาะสมกับการใช้ โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เก็บเมล็ดของสารสกัดและรากของหนอนตายหยากมาล้างทำความสะอาด จากนั้นนำมาเข้าสู่อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกว่าพืชจะแห้ง
2. นำตัวอย่างพืชที่แห้งสนิทแล้วมาบดละเอียด นำไปสกัดสารออกด้วย ethanol 95% ใน ultrasonic bath
3. กรองกากด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรอง แล้วนำสารละลายที่ได้มาระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้ส่วนสกัดหยาบที่ไม่มี ethanol นำกากที่กรองไว้มาสกัดซ้ำด้วยกรรมวิธีเดิมอีก 2 ครั้ง
4. นำส่วนสกัดหยาบที่ได้จากข้อ 3 มาละลายด้วยตัวทำละลายจนได้สารละลายใส ไม่ตกตะกอนตามสูตรต่างๆ (ตารางที่ 2)

ตาราง 2 สูตรของสารสกัดจากเมล็ดสารสกัดและรากหนอนตายหยากที่คัดเลือกมาใช้ในการทดลอง ทั้ง 4 การทดลอง

สารสกัดสารที่สูตรที่ 1 (M1)	สารสกัดสารที่สูตรที่ 1 (M2)	สารสกัดหนอนตายหยาก (S)
สารสกัดหยาบสารที่ 10 g ethanol 95% 90 ml	สารสกัดหยาบสารที่ 10 g ethanol 95% 85 ml tween 5 ml	สารสกัดหยาบหนอน 10 g ethanol 95% 90 ml

การทดลองที่ 1 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเมล็ดสารสกัด รากหนอนตายหยากและสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช carbosulfan ในไรทะเล

1. การเตรียมไรทะเล (*Artemia salina* Leach)

- นำนมกล่อง UHT ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 2 กล่อง โดยกล่องแรกตัดตามแนวยาวของกล่องให้มีความยาวเมื่อวางตามแนวยาวของกล่องสูงจากพื้นประมาณ 4 เซนติเมตร กล่องที่ 2 ตัดส่วนบนของกล่อง ตามแนวขวางให้เป็นช่องเปิดแล้วเจาะรูตามแนวขวางของกล่องยาว 4 เซนติเมตร สูงจากพื้นประมาณ 3 เซนติเมตร วางกล่องใบแรกในแนวนอนให้ด้านที่มีช่องเปิดหงายขึ้นแล้วนำกล่องใบที่ 2 วางในแนวตั้งลงในกล่องใบแรกให้ด้านที่มีช่องเปิดหงายขึ้นเช่นกัน (ภาพภาคผนวก 3)
- เตรียมน้ำทะเลเทียม โดยใช้อัตราส่วน น้ำ 1000 มิลลิลิตร ต่อเกลือทะเล 37.5 กรัม คนให้เกลือทะเลเข้ากับน้ำ เติมน้ำทะเลเทียมลงในกล่องนมจนน้ำในกล่องมีระดับสูงกว่ารูที่เจาะ

ไว้เล็กน้อย ตักไข่โรทะเลใส่ลงในกล่องนมใบที่ 2 ประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของผิวหน้าน้ำ ปิดช่องเปิดของกล่องที่ 2 ด้วยกระดาษฟลอยด์ เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 24 ชั่วโมง เปิดโคมไฟเพื่อล่อให้โรทะเลที่ฟักตัวแล้วเคลื่อนตัวออกมาสู่กล่องใบที่ 1 ตามรูเจาะไว้ เมื่อครบ 48 ชั่วโมงจึงนำโรทะเลมาใช้ในการทดลอง

2. การหาความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดโรทะเล

- นำสารละลายที่เตรียมได้มาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างกัน 7 ระดับ
- นำไปทดสอบประสิทธิภาพกับโรทะเล คัดโรทะเล โดยใช้ pasture pipette ใส่หลอดทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร หลอดละ 10 ตัว โดยทำ 3 ซ้ำต่อ 1 ระดับความเข้มข้นของสารละลาย เติมน้ำเกลือในหลอดทดลองจนได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หยดสารละลายตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้
- การเก็บบันทึกข้อมูล

นับจำนวนโรทะเลที่รอดชีวิตและที่ตาย เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ภายหลังจากให้สารละลาย และคำนวณหาค่า % mortality
- ทำการทดลองซ้ำจนกว่าจะได้เปอร์เซ็นต์การตายของโรทะเลประมาณ 0 – 100%
- นำข้อมูลที่ได้มาหาค่า LC_{50} ตามวิธีของ Reed Meunch (Coletate and Molyneus, 1993) โดยนำค่าจำนวนตัวรอดสะสมและจำนวนตัวตายสะสมของทุกความเข้มข้นมาพล็อตบนแกนเดียวกันคือแกน Y จะได้กราฟที่มีลักษณะตัดกัน ส่วนแกน X คือค่า log dose ลากเส้นจากจุดตัดของเส้นจำนวนตัวรอดสะสมและจำนวนตัวตายสะสมลงมาตัดที่แกน X จะได้ค่าๆ หนึ่ง นำค่าที่ได้ถอด log ออก จะได้ค่า LC_{50}

การทดลองที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเมล็ดสารภีและรากหนอนตายหยากในการกำจัดแมลงศัตรูพืชตระกูลกะหล่ำในระดับแปลงปลูก

1. การเตรียมพื้นที่สำหรับทดลอง

เตรียมดินสำหรับปลูกพืชตระกูลกะหล่ำ 2 ชนิด ได้แก่ ผักคะน้าและผักกวางตุ้ง โดยแปลงมีขนาดกว้าง 1.5 เมตร ยาว 5 เมตร ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อก (RCB) โดยในการทดลองกับผักทั้ง 2 ชนิด ผักแต่ละชนิดประกอบไปด้วย 6 กรรมวิธี ได้แก่ แปลงที่ถูกฉีดพ่นด้วยสารสกัดสารภีสูตรที่ 1 (M1) แปลงที่ถูกฉีดพ่นด้วยสารสกัดสารภีสูตรที่ 2 (M2) แปลงที่ถูกฉีดพ่นด้วยสารสกัดหนอนตายหยาก (S) แปลงที่ถูกฉีดพ่นด้วยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช แปลงที่ถูกฉีดพ่นด้วยน้ำ

(กลุ่มควบคุม) และแปลงที่ไม่มีการฉีดพ่น (กลุ่มควบคุม) แต่ละกรรมวิธีใช้พืชทดลองอย่างน้อย 300 ต้น

2. นำสารสกัดจากสารสีและหนอนตายหยากที่เตรียมได้มาฉีดพ่นเมื่อพืชทดลองมีอายุได้ 10 วัน จากนั้นพ่นสารสกัดสัปดาห์ละ 2 ครั้งจนกว่าจะทำการเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยใช้ความเข้มข้น 0.05% จากสารสกัดสารสี (M1 และ M2) ที่ได้เตรียมไว้และสารเคมีกำจัดศัตรูพืช carbosulfan สำหรับสารสกัดหนอนตายหยากใช้ความเข้มข้น 0.3% จากสารสกัด S ที่ได้เตรียมไว้

3. การเก็บผลการทดลอง

เก็บผลการทดลองสัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยสุ่มเลือกพืชทดลองกรรมวิธีละ 60 ต้น ตรวจสอบชนิดและจำนวนแมลงศัตรูพืช และชั่งน้ำหนักผลผลิตรวมทั้งให้คะแนนคุณภาพของต้น โดยกำหนดเป็นช่วงคะแนนตั้งแต่ 1 – 9 โดยพิจารณาจากความสมบูรณ์ของต้น ปริมาณการถูกศัตรูพืชทำลาย และลักษณะการเจริญเติบโต เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยการวิเคราะห์ ANOVA (Analysis of Variance) วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCB) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยสถิติ LSD (Least Significance Difference)

การทดลองที่ 3 การทดสอบยืนยันประสิทธิภาพของสารสกัดจากเมล็ดสารสีและรากหนอนตายหยากในการกำจัดแมลงศัตรูพืชตระกูลกะหล่ำ โดยวิธี direct contact application

1. เก็บแมลงศัตรูพืชอย่างน้อย 2 ชนิด ในแปลงปลูกพืชตระกูลกะหล่ำที่ไม่มีฉีดพ่นสารสกัดหรือสารเคมีกำจัดศัตรูพืช
2. นำกระดาษกรอง whatman เบอร์ 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร ชุบสารเคมีกำจัดศัตรูพืช carbosulfan สารสกัดจากเมล็ดสารสีและรากหนอนตายหยากที่ความเข้มข้นเดียวกันกับที่ใช้ในแปลงเกษตรกรคือ 500 ppm สำหรับสารเคมีกำจัดศัตรูพืช สารสกัดจากเมล็ดสารสีสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 ความเข้มข้น 3000 ppm สำหรับสารสกัดจากรากหนอนตายหยาก และจากนั้นนำไปทำให้แห้งโดยวางไว้ใน fume hood เป็นเวลา 10 นาที นำกระดาษกรองที่ทำให้แห้งแล้ววางลงใน petri dish (Kim *et al.*, 2003)
3. นำแมลงศัตรูพืชตระกูลกะหล่ำวางลงใน petri dish ที่มีกระดาษกรองชุบสารสกัด petri dish ละ 10 ตัว แต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมน้ำและสารเคมี
4. ทำการบันทึกจำนวนตัวตายของแมลงศัตรูพืชทุกๆ 1 ชั่วโมง จนกระทั่งแมลงตายหมด

**การทดลองที่ 4 การทดสอบความคงฤทธิ์และลักษณะทางกายภาพบางประการของสารสกัดจาก
เมล็ดสารภีและรากหนอนตายหยาก เมื่อเก็บรักษาไว้ในสภาวะที่แตกต่างกัน**

การทดลองที่ 4.1 การทดสอบความคงฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดสารภีและรากหนอนตายหยาก

1. เตรียมสารสกัดสารภีและหนอนตายหยาก แบ่งใส่ขวดแก้วใส ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปเก็บรักษาไว้ในสภาวะที่แตกต่างกัน ได้แก่ อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิตู้เย็น และกลางแดด โดยทำกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ
2. ตรวจสอบความคงฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดสารภีและรากหนอนตายหยากที่เก็บรักษาไว้ในสภาวะที่แตกต่างกัน โดยใช้ไรทะเลเป็นสัตว์ทดลองตามวิธีดังนี้
 - เตรียมไรทะเลตามการทดลองที่ 2
 - ใช้ความเข้มข้นที่ทำให้ไรทะเลมีเปอร์เซ็นต์การตาย 100% ในการทดลองที่ 2 เพื่อทดสอบความคงฤทธิ์
 - การวัดผลดูจากจำนวนตัวตายของไรทะเล ถ้าไรทะเลมี % mortality 100% แสดงว่าสารสกัดยังมีความคงฤทธิ์อยู่เท่าเดิม โดยทำการตรวจสอบทุกๆ 1 เดือน เป็นเวลา 6 เดือน

การทดลองที่ 4.2 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพบางประการของสารสกัดจากเมล็ดสารภีและรากหนอนตายหยาก เมื่อเก็บรักษาไว้ในสภาวะที่แตกต่างกัน

1. วัดความขุ่น(turbidity)ของสารสกัดจากเมล็ดสารภีและรากหนอนตายหยาก โดยใช้เครื่องวัดค่าความขุ่นของ JENWAY รุ่น 6035 turbidimeter วัดความขุ่นของสารละลายทุกสภาวะการเก็บรักษา บันทึกผลการทดลอง ทำการทดลองทุกๆ 1 เดือน เป็นเวลา 6 เดือน
2. วัดสีของสารสกัดจากเมล็ดสารภีและรากหนอนตายหยากทุกสภาวะการเก็บรักษา โดยใช้เครื่องวัดสีสารละลาย ของ Hunter Lab รุ่น Color Quest XE บันทึกผล ทำการทดลองทุกๆ 1 เดือน เป็นเวลา 6 เดือน