

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 การวางแผนการทดลอง

เมล็ดพันธุ์งาเขียว จำนวน 2 พันธุ์จากแหล่งปลูก กำหนดให้มีชื่อเรียกตามลักษณะของสีดอก และสีเมล็ดก่อนสุกแก่ทางสรีรวิทยา แบ่งออกเป็น พันธุ์ดอกสีขาวเป็นแหล่งปลูกที่ 1 และพันธุ์ดอกสีม่วงเป็นแหล่งปลูกที่ 2 โดยเก็บตัวอย่างจากแหล่งปลูก บ้านนาหวาย อำเภอ เชียงดาว จังหวัด เชียงใหม่ นำเมล็ดไปทำความสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งเจือปนและคัดขนาดด้วยวิธีการร่อน โดยใช้ตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เมล็ดพันธุ์มีความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 6.9 และ 7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ วางแผนการทดลองแบบ Split plot design in completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ โดยกำหนดให้ main plot คือ ระยะเวลาในการเก็บรักษาจำนวน 7 ช่วงเวลาคือ 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วัน ตามลำดับ และกำหนดให้ sub plot คือ วิธีการเก็บรักษาซึ่งประกอบด้วย 6 วิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 (ชุดควบคุม) เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ในถุงผ้าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 2 เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ในถุงพลาสติก 2 ชั้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 3 เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ในถุงพลาสติก 2 ชั้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 4 เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ในถุงพลาสติก 2 ชั้นที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 5 เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ในถุงฟอยล์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 6 เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ในถุงฟอยล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ทำการเก็บรักษาตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ 90 กรัม แล้วบรรจุในภาชนะตามกรรมวิธีทั้ง 6 วิธี ข้างต้น และเก็บรักษาเป็นเวลานาน 180 วัน โดยทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์ตามช่วงเวลาที่กำหนด แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปทดสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในระหว่างการเก็บรักษาที่ 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วัน ส่วนที่ 2 นำไปทดสอบคุณภาพทางเคมีของเมล็ดพันธุ์ ที่ระยะการเก็บรักษา 0, 90 และ 180 วัน

3.2 การทดสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์

3.2.1 การทดสอบความชื้นของเมล็ดพันธุ์ (Moisture content determination)

ทำการตรวจสอบความชื้นของเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีมาตรฐานคือวิธีอบลมร้อน (hot-air oven-method) ตามกฎการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์สากล (ISTA, 2006) มีวิธีและขั้นตอนดังนี้

- 1) ชั่งน้ำหนักเมล็ดพันธุ์ที่ชื้นจำนวน 5 กรัม จำนวน 3 ซ้ำ
- 2) ชั่งน้ำหนักภาชนะที่ใช้อบพร้อมฝาปิดก่อนและหลังใส่ตัวอย่าง
- 3) นำภาชนะดังกล่าวเข้าตู้อบ โดยเปิดฝาแล้วรองฝาไว้ใต้ภาชนะในขณะที่อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เวลา 17 ± 1 ชั่วโมง
- 4) เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำภาชนะที่ปิดฝาไว้ในโถดูดความชื้น เพื่อให้เย็นลงประมาณ 30 – 45 นาที

5) บันทึกน้ำหนักเมล็ดก่อนและหลังการอบ และคำนวณหาความชื้นของเมล็ดพันธุ์เป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักสด ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักของเมล็ดก่อนอบ} - \text{น้ำหนักของเมล็ดหลังอบ}}{\text{น้ำหนักของเมล็ดก่อนอบ}} \times 100$$

3.2.2. การทดสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์ (The germination test)

ทดสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานตามกฎการทดสอบความงอกของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ (ISTA, 2006)

1) สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ที่ชื้นจำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด จากส่วนที่เป็นพันธุ์สุทธิ เรียงเมล็ดบนวัสดุเพาะที่มีความชื้นโดยให้เมล็ดห่างกันพอประมาณ และวางให้กระจายสม่ำเสมอ โดยใช้วิธีการเพาะระหว่างกระดาษ (between paper; BP) จากนั้นให้ม้วนกระดาษเพาะ และวางในลักษณะตั้งตรง

2) โดยติดป้ายที่มุมบนของกระดาษเพาะ ซึ่งมีข้อมูลดังต่อไปนี้ วันที่เพาะ วันที่นับความงอกครั้งแรกหลังจากเพาะ และวันที่นับความงอกครั้งสุดท้ายหลังจากเพาะ จากนั้นนำม้วนกระดาษดังกล่าวไว้ในตู้เพาะ (germination cabinet) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สำหรับเมล็ดพันธุ์ที่ชื้นดังกล่าวทำการนับความงอกครั้งแรกวันที่ 7 หลังจากเพาะ และนับความงอกครั้งสุดท้ายวันที่ 21 หลังจากเพาะ

3) บันทึกผลความงอกของเมล็ดพันธุ์งาขี้ม้อน โดยประเมินผลเป็นต้นอ่อนปกติ (normal seedling) ต้นอ่อนผิดปกติ (abnormal seedling) จากนั้นรายงานผลการทดสอบความงอกเป็นเปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3.1 ตัวอย่างต้นอ่อนผิดปกติของงาขี้ม้อน

3.2.3 การทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์โดยการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์ (Accelerated aging test) (AOSA, 1983)

- 1) สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์งาขี้ม้อนทั้งหมด 2 พันธุ์ ๆ ละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 2 กรัม ใส่ลงในตะแกรงลวดสแตนเลสรูปทรงกลมที่มีขาตั้ง
- 2) นำตะแกรงดังกล่าวไปวางในขวดโหลแก้วที่มีฝาปิด และเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท โดยให้เมล็ดอยู่ในอุณหภูมิ 41 °C เป็นระยะเวลานาน 64 ชั่วโมง
- 3) จากนั้นนำเมล็ดไปทดสอบความงอกดังข้อที่ 3.2.2

3.3 การทดสอบคุณภาพทางเคมีของเมล็ดพันธุ์งาขี้ม้อน

3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน โดยใช้เครื่องมือสกัดแบบ soxhlet (soxhlet extractor)

(AOAC, 1995)

- 1) ชั่งตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ที่บดอย่างละเอียดจำนวน 5 กรัม นำไปห่อในกระดาษกรอง ใส่ลงใน thimble สำหรับสกัด (extraction thimbles for soxhlet extraction) แล้วใส่ลงในหลอดสำหรับ soxhlet extractor ที่ต่อเข้ากับคอนเดนเซอร์ (condenser allihn)
- 2) ชั่งน้ำหนักขวดก้นกลม (round-bottom flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ใส่เม็ดกันเดือด หรือ glass beads จำนวน 4 - 5 เม็ด ซึ่งได้ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงไว้แล้ว
- 3) จากนั้นเติมสารละลายไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) ปริมาตร 200 มิลลิลิตรลงในขวดก้นกลม แล้วต่อขวดก้นกลมเข้ากับชุดสกัดแบบ soxhlet และเปิด hot plate ให้มีอุณหภูมิสูง

สำหรับกลั่นสารละลายให้ไหลกลับเข้าไปในขวดได้ 15 รอบต่อชั่วโมง โดยกลั่นเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จนกระทั่งไขมันถูกชะล้างออกไปจาก thimble จนไม่มีสี จากนั้นเอา thimble ออก แล้วกลั่นต่อไปให้ dichloromethane กลับขึ้นมายู่บนหลอดจนเกือบหมด เทเก็บไว้ใช้ครั้งต่อไป ส่วนที่เหลือในขวดกลั่น กลม คือ ไขมันที่สกัดได้ จากนั้นให้ตั้งขวดกลั่นกลมทิ้งไว้ 1 คืน และนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักขวดที่เพิ่มขึ้นหลังจากกลั่นแล้ว คือน้ำหนักไขมัน (crude fat) และนำไปคำนวณตามสูตรต่อไปนี้

$$\text{ไขมันเมื่อคิดเปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง} = \frac{\text{น้ำหนักไขมัน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักวัตถุแห้ง}} \times 100$$

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันในน้ำมันงาจี๋ม่อนโดยวิธี gas chromatography (อ้างอิงตามวิธีการ Morrison and Smith, 1964)

เตรียมจากตัวอย่างน้ำมันงาจี๋ม่อนที่ได้จากวิธีที่ 3.2.1 เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันด้วยวิธีการเตรียม fatty acid methyl ester (FAME) ตามวิธีดังต่อไปนี้

- 1) ชั่งตัวอย่างน้ำมันงาจี๋ม่อนที่ได้จากข้อ 3.3.1 ลงในขวดกลั่นกลม (round-bottom flask) จำนวน 0.5 กรัม ต่อ 1 ตัวอย่าง
- 2) เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ละลายด้วยเมทานอลซึ่งมีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (0.5M NaOH ใน methanol) โดยปิเปตสารละลายปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดกลั่นกลมที่มีน้ำมันอยู่แล้วให้ความร้อน (reflux) ที่อุณหภูมิ 110 – 120 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที
- 3) จากนั้นให้เติมสารละลาย 20% boron-trifluoride ใน methanol โดยปิเปตสารละลายปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงไปในขวดกลั่นกลม แล้วให้ความร้อนต่อเป็นเวลา 5 นาที
- 4) เมื่อครบกำหนดเวลาให้วางสารละลายดังกล่าวไว้ให้เย็น และเทสารละลายทั้งหมดลงในหลอดทดลองที่มีขนาด 50 มิลลิลิตร
- 5) เติมสารละลายเฮกเซน (hexane) ลงไปในหลอดทดลอง โดยปิเปตสารละลายปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมเกลืออิ่มตัวลงไป ในหลอดทดลองโดยปิเปตสารละลาย ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าสารละลายในหลอดทดลองให้เข้ากัน จากนั้นวางหลอดทดลองไว้ให้สารละลายแยกชั้น
- 6) เมื่อสารละลายแยกชั้นดีแล้วให้ใช้กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 1 มิลลิลิตร ที่ต่อเข้ากับ ชุดกรอง (filter) ที่มีขนาด 0.45 ไมโครเมตร โดยดูดสารละลายชั้นบนมากรองผ่านชุดกรอง 0.45 ไมโครเมตร โดยเก็บไว้ในหลอดทดลอง ขนาด 1 มิลลิลิตร และสารละลายที่เตรียมนำไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Gas chromatography (GC-FID, Bruker) โดยใช้คอลัมน์ (column) ชนิด RT®-2560 (biscyanopropyl polysiloxane) 100 meter 0.25 mm ID 0.2um df Serial # 47147-04 (Restek®, USA)

3.3.3 การทดสอบการหืนของไขมัน (Thiobarbituric acid number)

วิเคราะห์หาปริมาณ thiobarbituric acid number (TBARs) คัดแปลงจากวิธีของ Health and Packer (1968)

- 1) ชั่งตัวอย่างเมล็ดงาที่มีน้ำหนัก 0.5 กรัม บดเมล็ดให้ละเอียดแล้วนำไปแช่ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าตัวอย่าง (vortex mixture) กับ 0.1 % Thichloroacetic acid จำนวน 5 มิลลิลิตร
- 2) นำตัวอย่างที่ผสมกันแล้วไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 10,000 รอบ เป็นเวลา 20 นาที
- 3) ปิเปตเก็บสารด้านบนปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายไทโอบาบิทูริก แอซิด ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (0.5 % thiobarbituric acid) กับสารละลายไทโอบาบิทูริก แอซิด ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (20 % thichloroacetic acid) อย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองพลาสติกที่มีฝาปิดขนาด 15 มิลลิลิตร
- 4) แช่สารละลายทั้งหมดให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- 5) หยุดปฏิกิริยาดังกล่าวโดยนำหลอดทดลองใส่น้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที
- 6) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 532 และ 600 นาโนเมตร โดยกำหนดให้ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของ Malondialdehyde (MDA) คือ $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ Statistix 8 (analytical software, USA) ด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วย Least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.5 สถานที่ทำการทดลอง

- 1) ห้องปฏิบัติการเมล็ดพันธุ์ ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- 2) ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.6 ระยะเวลาทำการทดลอง

ระยะเวลาทำการทดลองตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2558 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2559