

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์

1. พีชสมุนไพร 10 ชนิด ได้แก่ ขอบชะนางแดง ชะพลู ชะอม ดองดึง เต่าเกียด ถอบแถบน้ำ เถาวัลย์เปรียง เท้ายายม่อม หนอนตายหยากและเหลียง
2. ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ เอทานอล(Ethanol) และเฮกเซน(Hexane)
3. เครื่องบดสาร (Blender)
4. เครื่องระเหยสาร (Rotary evaporator)
5. เครื่องอบแห้ง (Hot air oven)
6. เครื่องชั่ง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance)
7. ขวดเก็บสารสีชา
8. บีกเกอร์ (Beaker)
9. ขวดปริมาตร (Flask)
10. กระบอกตวง (Cylinder)
11. แท่งแก้วคนสาร
12. ฟู่กัน
13. กระดาษกรอง
14. ผ้าขาวบาง
15. หนอนกระทู้ฝัก
16. ก่องเลี้ยงแมลงขนาด 11x16x6 ซม.
17. ก่องเลี้ยงแมลงขนาด 16.5x24x8 ซม.
18. กรงเลี้ยงผีเสื้อ ขนาด 50x50 x 80 ซม.
19. โถแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 19.8 ซม. สูง 32 ซม.
20. ผักคะน้าปลอดสารพิษ
21. น้ำกลั่น
22. สารลดแรงตึงผิว
23. กระดาษฟิชชู
24. ตู้เย็น

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมพืชสมุนไพรและสารสกัดพืชสมุนไพร

1.1 ศึกษาและสำรวจหาพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีประสิทธิภาพในการใช้ป้องกันกำจัดแมลง

ศึกษาและสำรวจหาพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีมากในเขตภาคใต้ตอนบนและมีการใช้ป้องกันกำจัดแมลง โดยศึกษาจากข้อมูลทางวิชาการและสอบถามจากปราชญ์ชาวบ้าน ซึ่งได้รับคำแนะนำจากปราชญ์ชาวบ้าน 3 ท่าน คือ นางเอิบ โตตั้ง อยู่บ้านเลขที่ 115 ม. 8 ต.ทุ่งตะไคร อ.ทุ่งตะโก จ.ชุมพร แนะนำถอบแถบน้ำ แต่ท่านไม่สามารถบอกอัตราการใช้ได้ชัดเจน นายสุรพล ตูรยานนท์ อยู่บ้านเลขที่ 70/14 ม. 2 ต.วิสัยใต้ อ.เมือง จ.ชุมพร แนะนำการใช้ขอบชะนางแดง ท่านไม่สามารถบอกอัตราการใช้ได้ชัดเจนเช่นกัน นางเก็จขวัญ เพชรแอน อยู่บ้านเลขที่ 114/2 ม.3 ต.วังไผ่ อ.เมือง จ.ชุมพร ซึ่งเป็นนักวิชาการส่งเสริมการเกษตร ของสำนักงานเกษตรอำเภอบางสะพาน จ.ชุมพร ได้แนะนำการใช้ทำยายม่อม (ท่านเรียกว่า บุกรอ) ในการป้องกันกำจัดแมลงอย่างชัดเจน ท่านบอกเล่าด้วยความมั่นใจเนื่องจากได้ใช้สารสกัดจากทำยายม่อมสกัดด้วยน้ำในการป้องกันกำจัดแมลงและได้แนะนำเกษตรกรในพื้นที่ที่ท่านดูแลส่งเสริมอยู่มาหลายปี

1.2 คัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีแนวโน้มมีศักยภาพสูงในการป้องกันกำจัดแมลงเพื่อใช้ในการทดลอง

ทำการคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีแนวโน้มมีศักยภาพสูงในการป้องกันกำจัดแมลงจากข้อมูลพื้นฐานทางวิชาการและจากภูมิปัญญาชาวบ้าน และมีมากในท้องถิ่น ได้พืชสมุนไพร 10 ชนิด ได้แก่ ขอบชะนางแดง (*Pouzolzia pentandra* Benn. วงศ์ Urticaceae.) ชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb. วงศ์ Piperaceae) ชะอม (*Acacia insuavis* Lace. วงศ์ Mimosae) ดองดึง (*Gloriosa superba* Linn. วงศ์ Liliaceae) เต่าเกียด (*Homalomena aromatica* Schott วงศ์ Araceae) ถอบแถบน้ำ (*Derris trifoliata* Lour. วงศ์ Leguminosae-Papilionoideae) เถาว์ลัยเบรียง (*Derris scandens* Benth วงศ์ Leguminosae) ทำยายม่อม (*Tacca leontopetaloides* Ktze วงศ์ Taccaceae) หนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa* Lour. วงศ์ Stemonaceae) และเหลียง (*Gnetum gnemon* Linn. var. *Tenerum* Markger วงศ์ Gnetaceae)

1.3 เก็บส่วนต่าง ๆ ของพืชสมุนไพร

ทำการเก็บส่วนต่าง ๆ ของพืชสมุนไพรที่ได้คัดเลือกไว้ ได้แก่ สารสกัดจากลำต้น และใบของขอบชะนางแดง ใบชะพลู ใบชะอม เหง้าดองดึง เหง้าเต่าเกียด เถาและรากถอบแถบน้ำ เถาและรากเถาวัลย์เปรียง เหง้าทำยายม่อม รากหนอนตายหยาก และใบเหลียง โดยเก็บพืชสมุนไพรจากพื้นที่ต่าง ๆ ดังนี้

ลำต้นและใบของขอบชะนางแดง เก็บจาก ต.วิสัยเหนือ อ.เมือง จ.ชุมพร

ใบแก่ของชะพลู เก็บจาก ต.ตะโก อ.ทุ่งตะโก จ.ชุมพร

ใบแก่ของชะอม เก็บจาก ต.ตะโก อ.ทุ่งตะโก จ.ชุมพร

เหง้าของดองดึง เก็บจาก เทศบาลปากน้ำหลังสวน อ.หลังสวน จ.ชุมพร และ

อ.สวี จ.ชุมพร

เหง้าของเต่าเกียด เก็บจาก ต.ตะโก อ.ทุ่งตะโก จ.ชุมพร

เถาและรากของถอบแถบน้ำ เก็บจาก ต.ทุ่งตะไคร้ อ.ทุ่งตะโก จ.ชุมพร

เถาและรากของเถาวัลย์เปรียงเก็บจาก ต.ทุ่งตะไคร้ อ.ทุ่งตะโก จ.ชุมพร

หัวทำยายม่อม เก็บจาก ต.บางสน อ.ปะทิว จ.ชุมพร เทศบาลปากน้ำหลังสวน

อ.หลังสวน จ.ชุมพร และ อ.ละแม จ.ชุมพร

รากของหนอนตายหยาก เก็บจาก เทศบาลปากน้ำหลังสวน อ.หลังสวน จ.ชุมพร

อ. ละแม จ.ชุมพร และ อ.สวี จ.ชุมพร

ใบแก่ของเหลียง เก็บจาก ต.ตะโก อ.ทุ่งตะโก จ.ชุมพร

1.4 เตรียมพืชสมุนไพรสำหรับการทดลอง

ทำความสะอาดแล้วหั่นให้มีขนาดเล็กลง อบแห้งที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำมาบดด้วยเครื่องบดสาร (Blender) ให้เป็นผงละเอียด

1.5 สกัดสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร

นำผงของพืชสมุนไพรแห้งใส่ลงในโถแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 19.8 เซนติเมตร สูง 32 เซนติเมตร แล้วเติมตัวทำละลายได้แก่ น้ำ เอทานอล และเฮกเซน ลงไปให้ท่วม ใช้แท่งแก้วกวนให้ทั่ว ปิดปากโถแก้วด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ เก็บสารสกัดพืชสมุนไพรด้วยน้ำไว้ในตู้เย็นสำหรับสารสกัดพืชสมุนไพรด้วยเอทานอล และเฮกเซน เก็บไว้ในอุณหภูมิห้องปกติ แช่ไว้นาน 7 วัน โดยคนพืชสมุนไพรที่แช่สารสกัดทุกวัน จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วกรองด้วยกระดาษกรองอีกครั้ง หลังจากนั้นนำสารสกัดไประเหยเอาตัวทำละลายออก สำหรับสารสกัดด้วย

เอทานอลและเฮกเซน ใช้เครื่องระเหยสาร (Rotary Evaporator) ระเหยเอาตัวทำละลายออก ส่วนสารสกัดด้วยน้ำ ใช้เครื่องอบแห้ง (Hot air oven) เก็บสารสกัดเข้มข้นทุกชนิดไว้ในขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การเตรียมหนอนกระทู้ฝักวัย 3 เพื่อใช้ในการทดลอง

2.1 เก็บรวบรวมกลุ่มไข่หนอนกระทู้ฝักจากแปลงฝัก

เก็บรวบรวมกลุ่มไข่หนอนกระทู้ฝักจากแปลงฝักของเกษตรกร

การทดลองที่ 1 ใช้กลุ่มไข่หนอนกระทู้ฝักจากแปลงฝักคะน้ำ ใน อ.กระทู้แบน

จ.สมุทรสาคร

การทดลองที่ 2 ใช้กลุ่มไข่หนอนกระทู้ฝักจากแปลงฝักคะน้ำ ใน อ.ทุ่งตะโก

จ.ชุมพร

การทดลองที่ 3 ใช้กลุ่มไข่หนอนกระทู้ฝักจากแปลงฝักคะน้ำ ใน อ.ทุ่งตะโก

จ.ชุมพร

2.2 การเลี้ยงหนอนเพื่อให้เกิดหนอนกระทู้ฝักรุ่นใหม่สำหรับการทดลอง

นำไข่หนอนกระทู้ฝักที่เก็บได้จากแปลงฝักมาเลี้ยงในกล่องเลี้ยงแมลงขนาด

16.5x24x8 ซม. ที่มีรูระบายอากาศ และมีกระดาษทิชชูรองพื้นกล่อง ให้ฝักคะน้ำปลอดสารพิษเป็นอาหาร เปลี่ยนกล่องอาหาร และกระดาษทิชชูทุกวัน จนกระทั่งหนอนพัฒนาเป็นดักแด้ ย้ายดักแด้ไว้ในกล่องพลาสติกที่มีรูระบายอากาศ จนกระทั่งพัฒนาเป็นผีเสื้อ หลังจากนั้นย้ายผีเสื้อไปเลี้ยงในกรงเลี้ยงผีเสื้อ ขนาด 50x50x80 ซม. ให้อาหารผีเสื้อด้วยน้ำผึ้ง 10 เปอร์เซ็นต์ และเตรียมต้นหญ้ามาเลี้ยงใส่ในภาชนะปากแคบ วางไว้ในตู้เลี้ยงผีเสื้อเพื่อให้ผีเสื้อเกาะวางไข่ ย้ายกลุ่มไข่นำมาเลี้ยงในกล่องพลาสติกที่มีรูระบายอากาศ เมื่อหนอนอายุ 7-10 วัน (หนอนวัยที่ 3) จึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ภาพที่ 3.1
กลุ่มไข่หนอนกระทู้ผัก



ภาพที่ 3.2
หนอนกระทู้ผักอายุ 1 วัน (หนอนวัย 1)



ภาพที่ 3.3
หนอนกระทู้ผักอายุ 4 วัน



ภาพที่ 3.4
หนอนกระทู้ผักอายุ 8 วัน (เข้าสู่วัยที่ 3)



ภาพที่ 3.5
หนอนกระทู้ผักอายุ 10 วัน หนอนลอกคราบ เริ่มเข้าสู่วัยที่ 4



ภาพที่ 3.6

หนอนกระทู้ฝักอายุ 13 วัน
(ตัวหดสั้น แข็งตัว ไม่เคลื่อนไหว)



ภาพที่ 3.7

หนอนอายุ 14 วัน
(เริ่มเข้าดักแด้)



ภาพที่ 3.8

ดักแด้หนอนกระทู้ฝัก



ภาพที่ 3.9

หนอนกระทู้ฝักเริ่มเป็นผีเสื้อหลังเข้าดักแด้ 8 วัน



ภาพที่ 3.10
กรงเลี้ยงผีเสื้อ



ภาพที่ 3.11
ผีเสื้อวางไข่บนใบหญ้ามาเลเซีย



ภาพที่ 3.12
กลุ่มไข่หนอนกระทู้ผักบนใบหญ้ามาเลเซีย
และเจริญเติบโตเป็นหนอน



3. การทดลอง

การดำเนินงานทดลองเพื่อคัดเลือกพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันกำจัดแมลง ตัวทำลายที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพรนั้น ๆ ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่เหมาะสมและวิธีการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรที่เหมาะสม ประกอบด้วย 3 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 10 ชนิด ต่อการตายของหนอน การพัฒนาของหนอนเป็นดักแด้และการพัฒนาของดักแด้เป็นตัวเต็มวัย

1. แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD

ปัจจัยที่ 1 ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ของสมุนไพร 10 ชนิด คือ ลำต้นและใบ ขอบชะนางแดง ใบชะพลู ใบชะอม เหง้าตองดึง เหง้าเต่าเกียด เถาและรากถอบแถบน้ำ เถาและราก เถาวัลย์เปรียง เหง้าท้ายายม่อม รากหนอนตายหยากและใบเหลียง

ปัจจัยที่ 2 ประกอบด้วยตัวทำลาย 3 ชนิด คือ น้ำ เอทานอล และเฮกเซน รวม 30 สิ่งทดลอง ดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 คือ สารสกัดจากลำต้นและใบขอบชะนางแดงด้วยน้ำ
ความเข้มข้น 10%

สิ่งทดลองที่ 2 คือ สารสกัดจากลำต้นและใบขอบชะนางแดงด้วยเอทานอล
ความเข้มข้น 10%

สิ่งทดลองที่ 3 คือ สารสกัดจากลำต้นและใบขอบชะนางแดงด้วยเฮกเซน
ความเข้มข้น 10%

สิ่งทดลองที่ 4 คือ สารสกัดจากใบชะพลูด้วยน้ำความเข้มข้น 10%

สิ่งทดลองที่ 5 คือ สารสกัดจากใบชะพลูด้วยเอทานอลความเข้มข้น 10%

สิ่งทดลองที่ 6 คือ สารสกัดจากใบชะพลูด้วยเฮกเซนความเข้มข้น 10%

สิ่งทดลองที่ 7 คือ สารสกัดจากใบชะอมด้วยน้ำความเข้มข้น 10%

สิ่งทดลองที่ 8 คือ สารสกัดจากใบชะอมด้วยเอทานอลความเข้มข้น 10%

สิ่งทดลองที่ 9 คือ สารสกัดจากใบชะอมด้วยเฮกเซนความเข้มข้น 10%

สิ่งทดลองที่ 10 คือ สารสกัดจากเหง้าตองดึงด้วยน้ำความเข้มข้น 10%

สิ่งทดลองที่ 11 คือ สารสกัดจากเหง้าตองดึงด้วยเอทานอลความเข้มข้น 10%

- สิ่งทดลองที่ 12 คือ สารสกัดจากเหง้าตองดึงด้วยเฮกเซนความเข้มข้น 10%
 สิ่งทดลองที่ 13 คือ สารสกัดจากเหง้าเต่าเกียดด้วยน้ำความเข้มข้น 10%
 สิ่งทดลองที่ 14 คือ สารสกัดจากเหง้าเต่าเกียดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 10%
 สิ่งทดลองที่ 15 คือ สารสกัดจากเหง้าเต่าเกียดด้วยเฮกเซนความเข้มข้น 10%
 สิ่งทดลองที่ 16 คือ สารสกัดจากเถาและรากถอบแถบน้ำด้วยน้ำ
 ความเข้มข้น 10%
 สิ่งทดลองที่ 17 คือ สารสกัดจากเถาและรากถอบแถบน้ำด้วยเอทานอล
 ความเข้มข้น 10%
 สิ่งทดลองที่ 18 คือ สารสกัดจากเถาและรากถอบแถบน้ำด้วยเฮกเซน
 ความเข้มข้น 10%
 สิ่งทดลองที่ 19 คือ สารสกัดจากเถาและรากเถาวัลย์เปรียงด้วยน้ำ
 ความเข้มข้น 10%
 สิ่งทดลองที่ 20 คือ สารสกัดจากเถาและรากเถาวัลย์เปรียงด้วยเอทานอล
 ความเข้มข้น 10%
 สิ่งทดลองที่ 21 คือ สารสกัดจากเถาและรากเถาวัลย์เปรียงด้วยเฮกเซน
 ความเข้มข้น 10%
 สิ่งทดลองที่ 22 คือ สารสกัดจากเหง้าเท้ายายม่อมด้วยน้ำความเข้มข้น 10%
 สิ่งทดลองที่ 23 คือ สารสกัดจากเหง้าเท้ายายม่อมด้วยเอทานอลความเข้มข้น 10%
 สิ่งทดลองที่ 24 คือ สารสกัดจากเหง้าเท้ายายม่อมด้วยเฮกเซนความเข้มข้น 10%
 สิ่งทดลองที่ 25 คือ สารสกัดจากรากหนอนตายหยากด้วยน้ำความเข้มข้น 10%
 สิ่งทดลองที่ 26 คือ สารสกัดจากรากหนอนตายหยากด้วยเอทานอลความเข้มข้น 10%
 สิ่งทดลองที่ 27 คือ สารสกัดจากรากหนอนตายหยากด้วยเฮกเซนความเข้มข้น 10%
 สิ่งทดลองที่ 28 คือ สารสกัดจากใบเหลียงด้วยน้ำความเข้มข้น 10%
 สิ่งทดลองที่ 29 คือ สารสกัดจากใบเหลียงด้วยเอทานอลความเข้มข้น 10%
 สิ่งทดลองที่ 30 คือ สารสกัดจากใบเหลียงด้วยเฮกเซนความเข้มข้น 10%
 แต่ละสิ่งทดลองมี 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้หนอนกระทุ้ฝักวัย 3 จำนวน 8 ตัว

2. วิธีการทดลอง มีขั้นตอนดังนี้

2.1 นำสารสกัดพืชสมุนไพรเข้มข้นชนิดต่าง ๆ ที่เตรียมไว้มาปรับความเข้มข้น
 ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 10%

2.2 คัดเลือกหนอนกระทุ้งวัช 3 ขนาดใกล้เคียงกันจำนวน 1,200 ตัว ใช้พู่กันเขียนหนอนลงในกล่องขนาด 11x11x6 ซม. กล่องละ 8 ตัว ชั่งน้ำหนักรวมของหนอนแต่ละกล่องให้ใกล้เคียงกัน

2.3 นำหนอนมาผ่านวิธีการจุ่มตัวแมลง (Body dipping method) โดยนำหนอนแต่ละกล่องมาจุ่มลงในสารสกัดจากพืชสมุนไพร นาน 10 วินาที ผึ่งหนอนให้แห้งบนกระดาษทิชชู แล้วนำไปใส่ไว้ในกล่องเช่นเดิม

2.4 นำใบผักคะน้าสดปลอดสารพิษมาผ่านวิธีการจุ่มใบ (Leaf dipping method) โดยตัดใบผัก คะน้าขนาด 5 x 5 ซม. จุ่มลงในสารสกัดจากพืชสมุนไพร จากนั้นนำไปวางให้แห้งบนกระดาษทิชชู แล้วนำไปวางในกล่องที่มีหนอนตามข้อ 2.3 กล่องละ 4 ชิ้น

เปลี่ยนพืชอาหารชุบสารสกัดจากพืชสมุนไพรหลังการทดลอง 1 วัน และ 2 วัน หลังจากนั้นให้พืชอาหารที่ไม่ชุบสารสกัดพืชสมุนไพรโดยเปลี่ยนพืชอาหารและเปลี่ยนกล่องทุกวัน

2.3 ตรวจนับจำนวนหนอนที่ตายทุกวัน สำหรับหนอนที่ไม่ตายในแต่ละการทดลองจะทำการเลี้ยงต่อไป เพื่อตรวจสอบการพัฒนาการของหนอนจนเข้าดักแด้ นับจำนวนหนอนที่ไม่สามารถเข้าดักแด้ จนไม่มีหนอนที่จะพัฒนาเป็นดักแด้ได้อีก (วันที่ 13 ของการทดลอง) ทำการเลี้ยงดักแด้ต่อไป พร้อมกับนับจำนวนดักแด้ที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยได้ จนไม่มีดักแด้ที่จะพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยได้อีก(วันที่ 25 ของการทดลอง)

2.4 นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) โดยวิเคราะห์ตามวิธีของการทดลองแบบ Factorial in CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) และวิเคราะห์หาระยะเวลาที่ทำให้หนอนทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (Lethal Time, LT_{50})

2.5 คัดเลือกพืชสมุนไพรและตัวทำลายสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูง โดยพิจารณาจากการตายของหนอน การยับยั้งการพัฒนาการของหนอนเป็นดักแด้ และการยับยั้งพัฒนาการของดักแด้เป็นตัวเต็มวัย เพื่อทำการทดลองที่ 2 ต่อไป จากผลการทดลองได้คัดเลือกสารสกัดจากพืชสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากเหง้าทองดีด้วยน้ำ สารสกัดจากเหง้าทองดีด้วยเอทานอล สารสกัดจากเหง้าท้ายายม่อมด้วยเอทานอล สารสกัดจากเหง้าท้ายายม่อมด้วยเฮกเซน และสารสกัดจากรากหนอนตายหยากด้วยเอทานอล

ภาพที่ 3.13
ลักษณะการตายของหนอนกระทู้ผัก



ภาพที่ 3.14
ลักษณะดักแด้ผิดปกติ ไม่สามารถพัฒนาเป็นผีเสื้อได้



การทดลองที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพของชนิดและความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 ต่อการตายของหนอน การพัฒนาของหนอนเป็นดักแด้และการพัฒนาของดักแด้เป็นตัวเต็มวัย

1. แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD

ปัจจัยที่ 1 สารสกัดสมุนไพร 5 ชนิดที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 ได้แก่ สารสกัดจากเหง้าดองดึงด้วยน้ำ สารสกัดจากเหง้าดองดึงด้วยแอลกอฮอล์ สารสกัดจากเหง้าทำยายม่อมด้วยเอทานอล สารสกัดจากเหง้าทำยายม่อมด้วยเฮกเซน และสารสกัดจากรากหนอนตายหยากด้วยเอทานอล

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของสารสกัด 1, 3, 5 และ 10 %

รวม 20 สิ่งทดลอง ดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 คือ สารสกัดจากเหง้าดองดึงด้วยน้ำความเข้มข้น 1%

สิ่งทดลองที่ 2 คือ สารสกัดจากเหง้าดองดึงด้วยน้ำความเข้มข้น 3%

สิ่งทดลองที่ 3 คือ สารสกัดจากเหง้าดองดึงด้วยน้ำความเข้มข้น 5%

สิ่งทดลองที่ 4 คือ สารสกัดจากเหง้าดองดึงด้วยน้ำความเข้มข้น 10%

สิ่งทดลองที่ 5 คือ สารสกัดจากเหง้าดองดึงด้วยเอทานอลความเข้มข้น 1%

สิ่งทดลองที่ 6 คือ สารสกัดจากเหง้าดองดึงด้วยเอทานอลความเข้มข้น 3%

สิ่งทดลองที่ 7 คือ สารสกัดจากเหง้าดองดึงด้วยเอทานอลความเข้มข้น 5%

สิ่งทดลองที่ 8 คือ สารสกัดจากเหง้าดองดึงด้วยเอทานอลความเข้มข้น 10%

สิ่งทดลองที่ 9 คือ สารสกัดจากเหง้าทำยายม่อมด้วยเอทานอลความเข้มข้น 1%

สิ่งทดลองที่ 10 คือ สารสกัดจากเหง้าทำยายม่อมด้วยเอทานอลความเข้มข้น 3%

สิ่งทดลองที่ 11 คือ สารสกัดจากเหง้าทำยายม่อมด้วยเอทานอลความเข้มข้น 5%

สิ่งทดลองที่ 12 คือ สารสกัดจากเหง้าทำยายม่อมด้วยเอทานอลความเข้มข้น 10%

สิ่งทดลองที่ 13 คือ สารสกัดจากเหง้าทำยายม่อมด้วยเฮกเซนความเข้มข้น 1%

สิ่งทดลองที่ 14 คือ สารสกัดจากเหง้าทำยายม่อมด้วยเฮกเซนความเข้มข้น 3%

สิ่งทดลองที่ 15 คือ สารสกัดจากเหง้าทำยายม่อมด้วยเฮกเซนความเข้มข้น 5%

สิ่งทดลองที่ 16 คือ สารสกัดจากเหง้าทำยายม่อมด้วยเฮกเซนความเข้มข้น 10%

สิ่งทดลองที่ 17 คือ สารสกัดจากรากหนอนตายหยากด้วยเอทานอล

ความเข้มข้น 1%

สิ่งทดลองที่ 18 คือ สารสกัดจากรากหนอนตายหยากด้วยเอทานอล
ความเข้มข้น 3%

สิ่งทดลองที่ 19 คือ สารสกัดจากรากหนอนตายหยากด้วยเอทานอล
ความเข้มข้น 5%

สิ่งทดลองที่ 20 คือ สารสกัดจากรากหนอนตายหยากด้วยเอทานอล
ความเข้มข้น 10%

แต่ละสิ่งทดลองกระทำ 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้หนอนกระทู้ฝักวัย 3 จำนวน 10 ตัว

2. วิธีการทดลอง มีขั้นตอนดังนี้

2.1 นำสารสกัดพืชสมุนไพรเข้มข้นชนิดต่าง ๆ ที่เตรียมไว้มาปรับความเข้มข้น
ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1, 3, 5 และ 10%

2.2 คัดเลือกหนอนกระทู้ฝักวัย 3 ขนาดใกล้เคียงกันจำนวน 1,000 ตัว ใช้ฟูกัน
เชี่ยหนอนลงในกล่องขนาด 11x11x6 ซม. กล่องละ 10 ตัว ซึ่งน้ำหนักรวมของหนอนแต่ละกล่องให้
ใกล้เคียงกัน

2.3 นำหนอนกระทู้ฝักวัย 3 มาทดสอบด้วยวิธีจุ่มใบพืชรวมกับจุ่มตัวแมลง โดย
ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 เปลี่ยนพืชอาหารซุบสารสกัดจากพืชสมุนไพรหลังการทดลอง 1 วัน
และ 2 วัน หลังจากนั้นให้พืชอาหารที่ไม่ซุบสารสกัดพืชสมุนไพรโดยเปลี่ยนพืชอาหารและเปลี่ยนกล่อง
เลี้ยงแมลงทุกวัน

2.4 ตรวจนับจำนวนหนอนที่ตายหลังการทดลองทุกวัน สำหรับหนอนที่ไม่
ตายได้ทำการเลี้ยงต่อไปเพื่อตรวจสอบการพัฒนาการของหนอนเป็นดักแด้ นับจำนวนหนอนที่ไม่
สามารถเข้าดักแด้ จนไม่มีหนอนที่จะพัฒนาเป็นดักแด้ได้อีก (วันที่ 15 ของการทดลอง)
เลี้ยงดักแด้ต่อไป พร้อมกับนับจำนวนดักแด้ที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยได้ จนไม่มี
ดักแด้ที่จะพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยได้อีก (วันที่ 25 ของการทดลอง)

2.5 นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance)
โดยวิเคราะห์ตามวิธีของการทดลองแบบ Factorial in CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของ
ค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) วิเคราะห์หา
ระยะเวลาที่ทำให้หนอนทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (Lethal Time, LT_{50}) และวิเคราะห์หาความ
เข้มข้นของสารพิษที่ทำให้แมลงทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (Lethal Concentration, LC_{50})

2.6 คัดเลือกสารสกัดจากพืชสมุนไพรและความเข้มข้นของสารสกัดที่มี
ประสิทธิภาพสูง โดยพิจารณาจากการตายของหนอน การยับยั้งการพัฒนาของหนอนเป็นดักแด้
การยับยั้งการพัฒนาของดักแด้เป็นตัวเต็มวัย เพื่อทำการทดลองขั้นที่ 3 ต่อไป จากผลการทดลอง

ได้คัดเลือกสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด คือ สารสกัดจากเหง้าตองดึงด้วยเอทานอลความเข้มข้น 3% สารสกัดจากเหง้าท้ายายม่อมด้วยเอทานอลความเข้มข้น 5% และสารสกัดจากเหง้าท้ายายม่อมด้วยเฮกเซนความเข้มข้น 5%

การทดลองที่ 3 ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการใช้สารสกัดสมุนไพรที่ได้คัดเลือกจากการทดลองที่ 2 ต่อการตายของหนอนกระทู้ผัก

1. แผนการทดลอง วางแผนการทดลองวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD

ปัจจัยที่ 1 คือ สารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด ที่คัดเลือกไว้ใน การทดลองที่ 2

ปัจจัยที่ 2 คือ วิธีการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพร 3 วิธี ได้แก่

วิธีที่ 1 วิธีการจุ่มใบพืช (Leaf dipping method) โดยการนำไปพืชอาหารไปจุ่มในสารสกัดสมุนไพร นำไปวางผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปพืชไปให้หนอนที่ไม่ผ่านการจุ่มตัวกิน

วิธีที่ 2 วิธีการจุ่มตัวแมลง (Body dipping method) โดยการนำหนอนไปจุ่มในสารสกัดสมุนไพร 10 วินาทีแล้วนำไปผึ่งให้แห้ง ให้หนอนกินใบพืชที่ไม่จุ่มสารสกัดพืชสมุนไพร

วิธีที่ 3 วิธีการจุ่มใบพืชร่วมกับวิธีการจุ่มตัวแมลง (Leaf dipping and body dipping method) โดยการจุ่มหนอนในสารสกัดสมุนไพร 10 วินาที ผึ่งให้แห้ง แล้วปล่อยหนอนให้กินใบพืชอาหารที่จุ่มสารสกัดสมุนไพร

รวม 9 สิ่งทดลอง ดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 คือ สารสกัดจากเหง้าตองดึงด้วยเอทานอลความเข้มข้น 3% ใช้วิธีจุ่มใบพืช

สิ่งทดลองที่ 2 คือ สารสกัดจากเหง้าตองดึงด้วยเอทานอลความเข้มข้น 3% ใช้วิธีจุ่มตัวแมลง

สิ่งทดลองที่ 3 คือ สารสกัดจากเหง้าตองดึงด้วยเอทานอลความเข้มข้น 3% ใช้วิธีจุ่มใบพืชร่วมกับวิธีจุ่มตัวแมลง

สิ่งทดลองที่ 4 คือ สารสกัดจากเหง้าท้ายายม่อมด้วยเอทานอลความเข้มข้น 5% ใช้วิธีจุ่มใบพืช

สิ่งทดลองที่ 5 คือ สารสกัดจากเหง้าท้ายายม่อมด้วยเอทานอลความเข้มข้น 5% ใช้วิธีจุ่มตัวแมลง

สิ่งทดลองที่ 6 คือ สารสกัดจากเหง้าท้ายายม่อมด้วยเอทานอลความเข้มข้น 5% ใช้วิธีจุ่มใบพืชร่วมกับวิธีจุ่มตัวแมลง

สิ่งทดลองที่ 7 คือ สารสกัดจากเหง้าทำยายม่อมด้วยเฮกเซนความเข้มข้น 5% ใช้วิธีจุ่มใบพืช

สิ่งทดลองที่ 8 คือ สารสกัดจากเหง้าทำยายม่อมด้วยเฮกเซนความเข้มข้น 5% ใช้วิธีจุ่มตัวแมลง

สิ่งทดลองที่ 9 คือ สารสกัดจากเหง้าทำยายม่อมด้วยเฮกเซนความเข้มข้น 5% ใช้วิธีจุ่มใบพืชร่วมกับวิธีจุ่มตัวแมลง

แต่ละสิ่งทดลองกระทำ 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้หนอนกระทู้ฝักวัย 3 จำนวน 10 ตัว

2. วิธีการทดลอง มีดังนี้

2.1 นำสารสกัดจากเหง้าของตึงด้วยเอทานอล สารสกัดจากเหง้าทำยายม่อมด้วยเอทานอล และเหง้าสารสกัดจากทำยายม่อมด้วยเฮกเซนเข้มข้นที่เตรียมไว้มาปรับความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 3, 5 และ 5% ตามลำดับ

2.2 คัดเลือกหนอนกระทู้ฝักวัย 3 ขนาดใกล้เคียงกันจำนวน 450 ตัว ใช้ฟูกั้นเขี่ยหนอนลงในกล่องขนาด 11x11x6 ซม. กล่องละ 10 ตัว ซึ่งน้ำหนักรวมของหนอนแต่ละกล่องให้ใกล้เคียงกัน

2.3 นำหนอนกระทู้ฝักวัย 3 มาทดสอบด้วยวิธีที่แตกต่างกันตามแผนการทดลอง

2.4 ตรวจสอบจำนวนหนอนที่ตายหลังการทดลอง 1-5 วัน

2.5 นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) โดยวิเคราะห์ตามวิธีของการทดลองแบบ Factorial in CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) และวิเคราะห์หาระยะเวลาที่ทำให้หนอนทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (Lethal Time, LT_{50})

2.6 สรุปผลการทดลองสารสกัดสมุนไพรและวิธีการใช้ที่มีประสิทธิภาพ

สถานที่ดำเนินงานวิจัย

1. สกัดสารเข้มข้นด้วยเครื่องระเหยสาร (Rotary evaporator) ที่ห้องปฏิบัติการ ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี กรมวิชาการเกษตร

2. ดำเนินงานทดลองที่ห้องปฏิบัติการ แผนกวิชาพืชศาสตร์ วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีชุมพร

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

มิถุนายน 2548 – พฤษภาคม 2550