

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์ภาคสนาม ใช้ในการเก็บตัวอย่างไลเคน

3.1.1.1. Hand lenses ใช้สำหรับส่องขยายเพื่อดูเพื่อคัดเลือกรูปร่างของไลเคนที่จะเก็บในสภาพพื้นที่ธรรมชาติ

3.1.1.2. มีด หรือ คัตเตอร์ ใช้สำหรับลอกแทลัสไลเคนออกจากพื้นผิว ที่เกาะอาศัย

3.1.1.3. กระบอกฉีดน้ำ ใช้สำหรับฉีดไลเคนกลุ่มโฟลิโอส หรือคัสโตสที่เปราะง่าย เพื่อให้ไลเคนนุ่ม ง่ายต่อการลอกและเก็บตัวอย่าง

3.1.1.4. ส่ว หรือ ค้อน ใช้สำหรับสกดเก็บไลเคนที่ขึ้นบนหิน (ถ้าจำเป็น)

3.1.1.5. กระดาษนุ่ม สำหรับห่อตัวอย่างไลเคนเพื่อป้องกันการกระแทกและเปราะแตก พร้อมทั้งซับความชื้นและยางไม้

3.1.1.6. ซองกระดาษ สำหรับเก็บตัวอย่างที่ห่อด้วยกระดาษนุ่มแล้วบนซองกระดาษให้ทำการบันทึกข้อมูลให้ตรงกับที่กรอกในแบบฟอร์มบันทึกการสำรวจภาคสนาม เช่น สถานที่เก็บ ลักษณะพื้นที่ใกล้เคียง พิกัดความสูงจากระดับน้ำทะเล วันที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ พื้นผิวที่เกาะอาศัย ลักษณะและชื่อของไลเคนที่เก็บ เป็นต้น

3.1.1.7. สมุดบันทึก

3.1.2 อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

3.1.2.1. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

3.1.2.2. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง

3.1.2.3. แผ่นสไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์

3.1.2.4. ใบมีดโกน

3.1.2.5. น้ำสะอาด

3.1.2.6. กล้องถ่ายรูปติดกล้องจุลทรรศน์

3.1.2.7. กล้องถ่ายรูปทั่วไป

3.1.2.8. สารเคมีทดสอบ (K, C, KC)

- 3.1.2.9. Eppendofe tube
- 3.1.2.10. ตะแกรงวาง Eppendofe tube
- 3.1.2.11. Merck silica gel 60 F₂₅₄ pre-coated glass TLC plate 20x20 ซม.
- 3.1.2.12. TLC tanks
- 3.1.2.13. Capillary tubes
- 3.1.2.14. Glass phials
- 3.1.2.15. กรดซัลฟิวริกเจือจาง 10% + แปร่งสำหรับป้ายกรด
- 3.1.2.16. หลอดไฟอัลตราไวโอเลต (UV lamp) สำหรับ TLC
- 3.1.2.17. ดินสอ ไม้บรรทัด
- 3.1.2.18. กระดาษขนาด 30×20 เซนติเมตร
- 3.1.2.19. Solvent (ปริมาตรมิลลิลิตร)

Solvent A: Toluene : Dioxan : Acetic acid

180 : 60 : 8

Solvent G: Toluene: Ethyl acetate: Formic acid

139 : 83 : 8

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การดำเนินงานภาคสนาม (Field survey) ประกอบด้วย การสำรวจและเก็บตัวอย่างและบันทึกข้อมูลไลเคนจากพื้นที่ศึกษาคือจังหวัดชุมพร ดังนี้

3.2.1.1 สำรวจลักษณะของพื้นที่และสภาพป่าที่ต้องการเก็บข้อมูล

3.2.1.2 การเก็บตัวอย่างไลเคนจากต้นไม้ โดยการ चुดเกาะไลเคนจากเปลือกต้นไม้ กิ่งก้าน โดยใช้มีดเกาะไลเคนออกมาจากที่ยึดเกาะ บรรจุลงห่อกระดาษเนื้อหยาบ

3.2.1.3 บันทึกข้อมูลภาคสนาม จำแนกลักษณะอย่างหยาบๆของไลเคน เป็นกลุ่มใหญ่ๆ

3.2.1.4 นำตัวอย่างที่เก็บได้แต่ละวัน มาผึ่งลมให้แห้งในที่พัก เพื่อป้องกันการเกิดเชื้อราทำลายไลเคน

3.2.1.5 ทำบัญชีรายชื่อ เพื่อลงหมายเลขตัวอย่าง และรายละเอียดของแต่ละพื้นที่ศึกษา เช่น สถานที่ สภาพป่า แหล่งอาศัย ระดับความสูงของพื้นที่ วันที่เก็บและผู้เก็บ ลงในสมุดดัชนีตัวอย่าง

3.2.2 การดำเนินการในห้องปฏิบัติการ (Laboratory study) มีขั้นตอนดังนี้

3.2.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

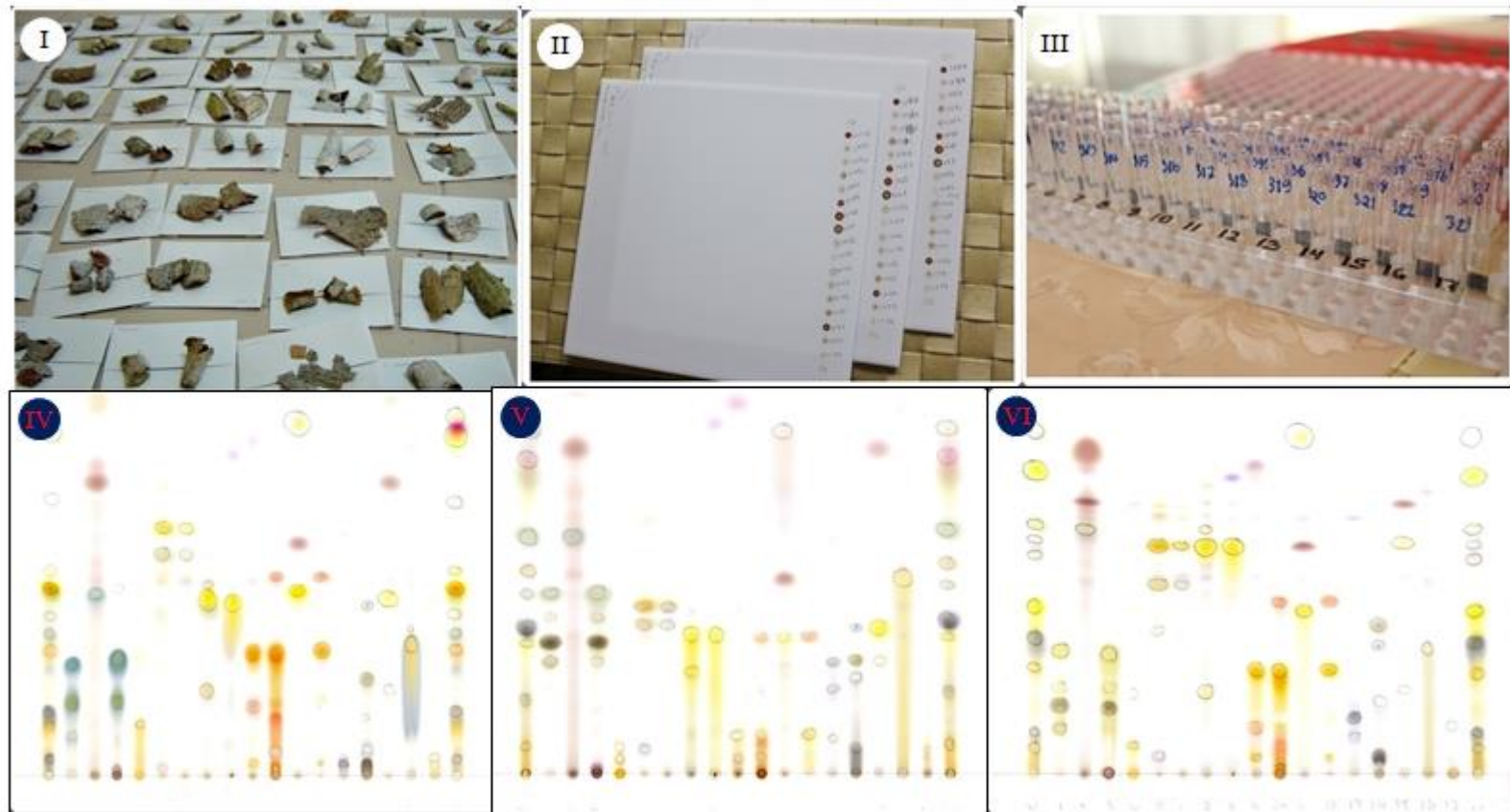
- นำตัวอย่างไลเคนมาผึ่งลมอีกครั้งจนแห้งสนิท ในที่ที่มีการระบายอากาศได้ดี
- บรรจุตัวอย่างแห้งลงในห่อกระดาษหยาบ พร้อมบันทึกข้อมูลภาคสนาม
- ลงบัญชีหมายเลขตัวอย่าง และรายละเอียดในสมุดดัชนีเลขทะเบียนตัวอย่างสนาม
- จำแนกไลเคนแบบหยาบๆ เพื่อแยกประเภทของไลเคนจากลักษณะภายนอก

3.2.2.2 การจัดจำแนกสายพันธุ์ไลเคน

- วิเคราะห์ลักษณะภายนอก และลักษณะภายใน ด้วยกล้องขยายกำลังต่ำ
- ตัดเนื้อเยื่อของโครงสร้างทลัสส์และอวัยวะสืบพันธุ์ เพื่อศึกษาองค์ประกอบภายใน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง เพื่อนำมาสืบหาสกุลและชนิดให้แก่ไลเคน
- บันทึกผลรายละเอียดของลักษณะต่างๆ เช่น วัชขนาดและวาดภาพลายเส้นแสดงรายละเอียดของแทลลัส ออะโพทีเซียม แอสคัสและสปอร์
- ตรวจสอบสารไลเคนด้วยวิธีหยดทดสอบ (spot test) ด้วยสารทดสอบโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (C) โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 % (K) และพาราเฟนิวไลน์ไดอะมีน (PD) และบันทึกผล
- ตรวจสอบชนิดของสารไลเคนด้วยวิธีการทำทางรังคเลขฝิวบาง (Thin layer chromatography)
- สืบหาสกุลและชนิดของไลเคนด้วยคีย์ ของสถานที่ต่างๆจากต่างประเทศ พร้อมเทียบรูปและข้อมูลจากวารสารต่างๆ เพื่อกำหนดชนิด สกุลที่ถูกต้อง
- นำตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับตัวอย่างแม่แบบ (type specimen) กับพิพิธภัณฑ์ในต่างประเทศ เพื่อยืนยันความถูกต้องของการกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์

3.2.3 วิธีการและลำดับการวิเคราะห์สารทุติยภูมิในไลเคนโดยการทางรังคอเลขผิวบาง

- 3.2.3.1 เตรียม Solvent A และ G ตามปริมาตรที่กำหนด
- 3.2.3.2 ใช้ดินสอขีดเส้นสีดำบนแผ่นซิลิกาเจล
- 3.2.3.3 ขูดไลเคนใส่ eppendorf tube หยดอะซิโตน 2-3 หยด แช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
- 3.2.3.4 นำสารสกัดไลเคนใส่ใน Glass phial
- 3.2.3.5 นำสารสกัดไลเคนแต่ละชนิดมาหยดตามตำแหน่งที่กำหนดจุดละ 1 ชนิด
- 3.2.3.6 นำแผ่น TLC ที่หยดสารเรียบร้อยแล้ว จุ่มลงใน TLC Tank ที่มี Solvent A และ G
- 3.2.3.7 นำแผ่น TLC มาเป่าให้แห้ง จะเห็นเป็นแถบสี ใช้ดินสอทำเครื่องหมายและบันทึกสีที่เห็น
- 3.2.3.8 นำแผ่น TLC ไปส่องด้วยหลอดไฟอัลตราไวโอเลต (UV lamp) ในห้องมืดแล้วบันทึกสีตามที่ได้เห็น
- 3.2.3.1 นำแผ่น TLC plate ไปพ่นด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง 10% แล้วเป่าจนแห้ง สังเกตแถบสีและบันทึกผล
- 3.2.3.2 วิเคราะห์ผลการทดลองและบันทึกผล



ภาพที่ 3.1 แสดงวิธีการวิเคราะห์สารทุติยภูมิในไลเคน I. ตัวอย่างไลเคนแห้ง II. สารไลเคนแต่ละชนิดที่หยดลงบนแผ่นซิลิกาเจล III. สารไลเคนสกัดโดยอะซิโตน IV V และ VI. แสดงสารไลเคนบนแผ่นซิลิกาเจลหลังจากการพัฒนาแล้ว แผ่น A B' และ C ตามลำดับ