

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 พืชทดลอง

พืชทดลอง ได้แก่ เหง้าพันธุ์ว่านนางคำ (*Curcuma aromatica* Salisb.) รวบรวมจากจังหวัดหนองคาย อำเภอเมืองและ อำเภอกระนวน จังหวัดขอนแก่น เมื่อพันธุ์ระยะพักตัวโดยสังเกตจากตาข้าง เริ่มแตกหน่อ นำมาปลูกที่บริเวณแปลงทดลองและ โรงเรือนของอาคารปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สาขาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.2 เครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาและทดลอง

- 1) วัสดุการเกษตร ได้แก่ อินทรีย์วัตถุ ดิน บรรจุใน ภาชนะพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11 นิ้ว และตาข่ายพลาสติกสีดำพรางแสงได้ในระดับ 50%
- 2) เครื่องมือสำหรับวัดการเจริญเติบโต ได้แก่ ไม้บรรทัด ตลับเมตรและเวอร์เนียแคลลิเปอร์ (Vernier caliper)
- 3) เทอร์โมมิเตอร์กระเปาะเปียกและกระเปาะแห้ง
- 4) เครื่องชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด 2 ตำแหน่ง
- 5) แปรงขนอ่อน ใช้สำหรับทำความสะอาดหัวก่อนชั่งน้ำหนัก
- 6) Tag ป้ายชื่อ
- 7) กล้องถ่ายรูป
- 8) ถุงตาข่ายสีฟ้าใช้เก็บหัวว่านนางคำ
- 9) มีด และเขียง
- 10) parafilm
- 11) หลอด micro tube
- 12) เครื่อง Gas Chromatography รุ่น Hewlett Packard HP 6890 Series
- 13) ชุดเครื่องแก้วกลั่นสำหรับสกัดน้ำมันหอมระเหย
 - Clevenger
 - Heating mantle
 - เครื่องทำความเย็น (coolant)

- Round bottom flask 1000 ml

- สำลี

- น้ำกลั่น

14) สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- CHCl_3 (chloroform)

- แอลกอฮอล์ 95%

- $\text{C}_{12}\text{H}_{28}$

- $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$

3.3 ขั้นตอน และวิธีการทดลอง

เปรียบเทียบการเจริญเติบโต ผลผลิต ปริมาณน้ำมันหอมระเหย ของว่านนางคำที่ได้มาจาก 3 แหล่งปลูก ภายใต้สภาพพรางแสง 50% และไม่พรางแสง วางแผนการทดลองแบบ Spilt Plot in CRD โดยมีแหล่งที่มั่งเป็น main-plot ได้แก่แหล่งที่มาจก จังหวัดหนองคาย อำเภอกระนวน จังหวัดขอนแก่น และ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น มีแสงเป็น sub-plot โดยมีการพรางแสง 50% และไม่พรางแสง

3.3.1 ขั้นตอนและวิธีการทดลองสภาพแปลงปลูก

1) เตรียมหัวว่านนางคำสำหรับลงปลูก โดยการเลือกหัวพันธุ์ว่านนางคำที่พื้นระยะพักตัว โดยสังเกตจากบริเวณตาข้างเริ่มมีหนองออก (ภาพที่ 7 A)

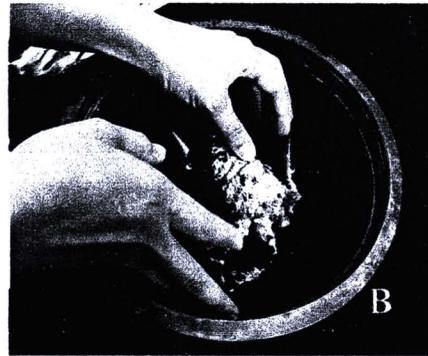
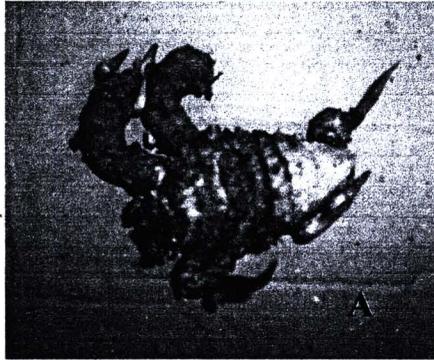
2) นำหัวว่านนางคำลงปลูกในกระถางพลาสติกขนาด 11 นิ้ว โดยใช้วัสดุปลูกที่มีลักษณะร่วนซุยมีส่วนประกอบของ ดินร่วน-อินทรียัดตุที่ได้จากใบไม้บด อัตราส่วน 1:2 โดยนำไปไว้ภายใต้สภาพการพรางแสงและไม่พรางแสง จากแผนการทดลองนำหัวว่านนางคำลงปลูกวันที่ 23 พฤษภาคม ถึง 23 มกราคม 2551 รวมเป็นระยะเวลา 9 เดือน

3) การดูแลรักษา หลังจากลงปลูก 2-3 สัปดาห์ เริ่มทำการกำจัดวัชพืชโดยใช้มือถอนในทุกเดือน การให้น้ำทุกวัน แต่จะไม่มีการให้ปุ๋ยใดๆ อีก

4) เก็บข้อมูลการเจริญเติบโต ในช่วงเดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 6 โดย เก็บทุกวันที่ 23 ของทุกเดือน ส่วนในช่วงเดือนที่ 7 ถึง 9 ต้นจะเหี่ยวแห้ง และพุดลง พร้อมจะทำการเก็บเกี่ยวและทำการเก็บเกี่ยวในเดือนมกราคม

5) การเก็บเกี่ยวผลผลิต เมื่อต้นแห้งสนิทในช่วงเดือนที่ 9 ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตขึ้นจากดิน ทำความสะอาดโดยใช้แปลงทาสีปิดเอาฝุ่นดินออก และใช้มีด โคนตัดส่วนของรากออก

ให้เหลือเฉพาะส่วนเหง้าและแง่ง ทำการเก็บข้อมูลผลผลิตโดยมีการชั่งน้ำหนักรวมของเหง้าและแง่ง วัดขนาดเหง้าและแง่ง และนับจำนวนแง่งต่อเหง้า



ภาพที่ 7 ลักษณะว่านนางคำก่อนลงปลูก

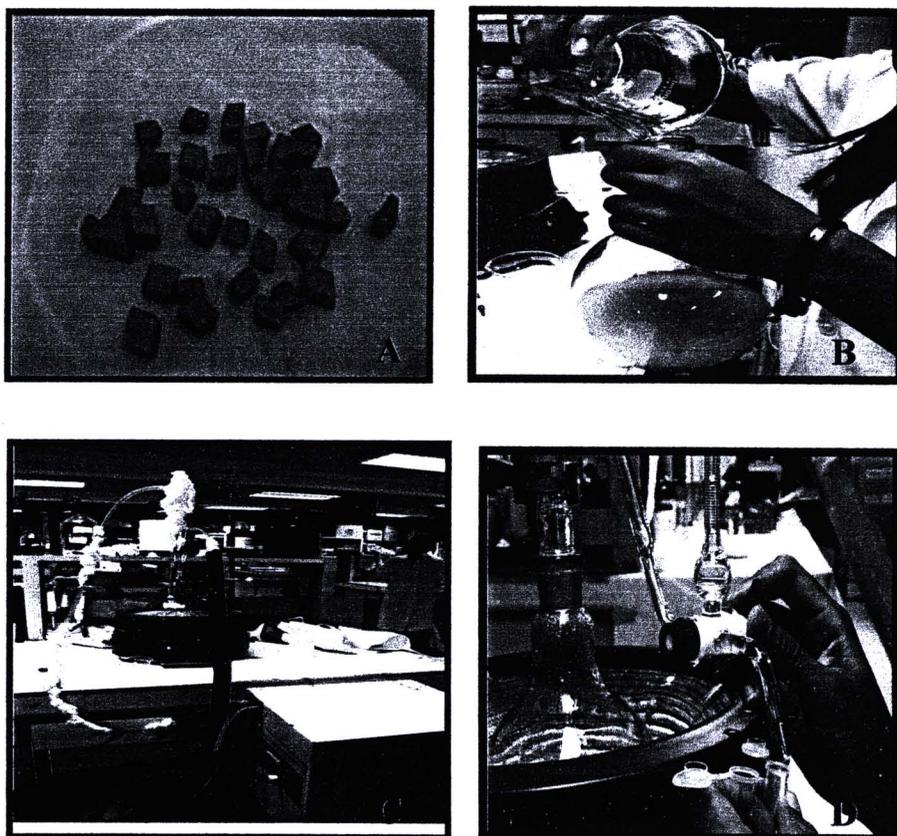
ลักษณะว่านนางคำก่อนลงปลูก (A) และการนำว่านนางคำลงปลูก (B)

3.3.2 ขั้นตอนและวิธีการสกัดหาปริมาณน้ำมันหอมระเหย

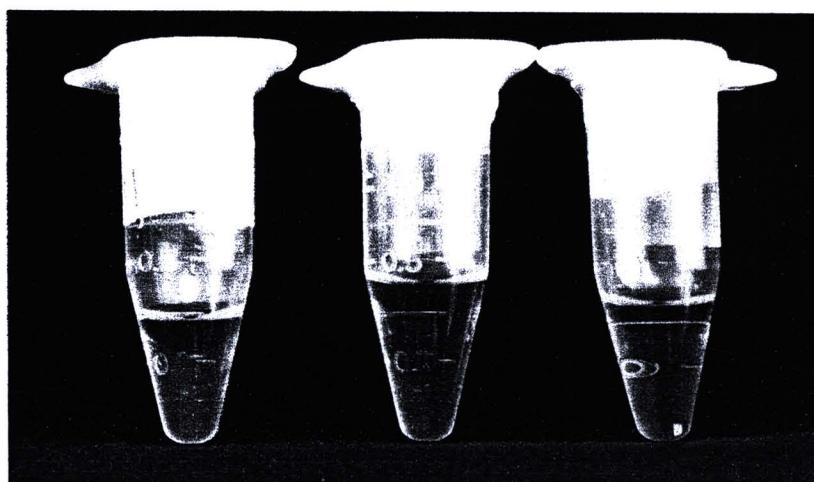
1) นำหัวว่านนางคำมาล้างทำความสะอาดแยกส่วนของเหง้ากับแง่งออกจากกัน ปอกเปลือกออก จากนั้นหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร โดยใช้น้ำหนักเนื้อ 100 กรัมในการสกัด (ภาพที่ 8 A)

2) ใส่ว่านนางคำลงใน flask ขนาด 1000 ml ที่บรรจุน้ำกลั่นอยู่ 300 ml (ภาพที่ 8 B) ประกอบเข้ากับชุดกลั่น (ภาพที่ 8 C) ซึ่งในการกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากหัวสดของว่านนางคำจะใช้การกลั่นโดยวิธี steam distillation เมื่อน้ำเริ่มเดือดใช้เวลาในการกลั่น 4 ชั่วโมง

3) เมื่อครบระยะเวลาจะได้ ปริมาณน้ำมันซึ่งอ่านค่าได้จาก scale ของชุดกลั่น เปิดวาล์วของชุดกลั่นเพื่อเก็บน้ำมันใส่ลงใน micro tube (ภาพที่ 8 D) ปิดด้วย parafilm เก็บไว้ในที่เย็นและไม่ถูกแสง เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหย โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography ซึ่งน้ำมันหอมระเหยที่ได้มีลักษณะสีเหลือง ใส มีกลิ่นหอม (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 8 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากว่านนางคำ ว่านนางคำแห้งเป็นสีเหลืองขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร (A) นำว่านนางคำใส่ลงใน flask และเติมน้ำกลั่น (B) ชุดเครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหย (C) การเก็บน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่น (D)



ภาพที่ 9 ลักษณะของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากว่านนางคำ



3.3.3 ขั้นตอนและวิธีการหาปริมาณสาร camphor ในน้ำมันหอมระเหยของว่านนางคำโดยวิธี GC

1) เตรียมน้ำมันหอมระเหยจากว่านนางคำให้มีความเข้มข้น 4% โดยใช้ CHCl_3 เป็นตัวทำละลาย สำหรับการทดลองนี้จะใช้สาร camphor เป็นตัวชี้วัดเพื่อบอกถึงปริมาณสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้ และใช้ $\text{C}_{12}\text{H}_{10}$ เป็น Internal standard

ทำการเตรียมสารมาตรฐาน camphor 5 ความเข้มข้น คือ 0.5, 1, 2, 3 และ 5% w/v เพื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับ Peak ratio หาปริมาณ camphor ในตัวอย่างว่านนางคำโดยเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน (ตารางที่ 1)

2) ทำการกำหนดสถานะของเครื่อง GC เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ดังนี้

Column	: HP-5
Carrier gas	: Nitrogen
Injection volume	: 1 μ l
Split mode	: 1:100
Flow rate	: 1 ml.min ⁻¹
Injection temp.	: 275°C
Detector temp	: 275°C
Oven temp	: 4°C.min ⁻¹

(60-240°C) and 10°C.min(240-270°C)

ที่มา : Aromdee and Sotharak (2010)

ตารางที่ 1 การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ GC

สารมาตรฐาน camphor ความเข้มข้น (%)	น้ำมันหอมระเหย 4% v/v	internal standard (μ)	CHCl_3 (ml)
0.5	40	30	1
1	40	30	1
2	40	30	1
3	40	30	1
5	40	30	1



3.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.4.1 ข้อมูลด้านสรีรวิทยาการเจริญเติบโตของว่านนางคำ

วัดการเจริญเติบโตของว่านนางคำ โดยวัดขนาดเหง้าก่อนปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวโดยจะวัดการเจริญเติบโตทุกๆ เดือน เริ่มปลูกวันที่ 23 พฤษภาคม 2551 ถึง 23 มกราคม 2552

- ความสูงของต้น วัดจากลำต้นเหนือดิน 1 นิ้ว ขึ้นไปจนถึงส่วนที่สูงที่สุดที่โดยรวบใบเข้าหากันโดยความสูงต้นในช่วง เดือนที่ 2 ถึงเดือนที่ 3 โดยใช้ไม้บรรทัดยาวและความสูงต้นในช่วงเดือนที่ 4 ถึงเดือนที่ 7 โดยใช้ตลับเมตร (เซนติเมตร)

- จำนวนใบ นับจำนวนใบทุกใบที่คลี่ออกแล้ว (ใบต่อต้น)
- ขนาดใบ (เซนติเมตร)
- ขนาดลำต้นโดยใช้เวอร์เนียแคลิเปอร์ วัดเส้นรอบวง (เซนติเมตร)
- จำนวนต้น ต่อกระถาง

3.4.2 ข้อมูลผลผลิตว่านนางคำก่อนนำไปสกัดน้ำมันหอมระเหย

เก็บเกี่ยวผลผลิตในเดือนมกราคม โดยบันทึก

- น้ำหนักสดรวมเหง้าและแง่ง ใช้ เครื่องชั่งแบบละเอียด 2 ตำแหน่ง (กรัม)
- น้ำหนักสดเหง้าเฉลี่ย (กรัม)
- จำนวนแง่งต่อเหง้า
- ขนาดเหง้า กว้างxยาว โดยใช้ เวอร์เนียคาลิเปอร์ (เซนติเมตร)
- ขนาดแง่ง กว้างxยาว โดยใช้ เวอร์เนียคาลิเปอร์ (เซนติเมตร)

3.4.3 ข้อมูลน้ำมันหอมระเหยของว่านนางคำที่สกัดได้และ ข้อมูลองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการใช้เครื่อง Gas Chromatography

ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเนื้อว่านนางคำ 100 กรัม องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยแยกด้วยเครื่อง Gas Chromatography นำผลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับ Peak area ratio หาปริมาณของ camphor ในตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยในว่านนางคำโดยเทียบกับกราฟของสารมาตรฐานคำนวณเพื่อหาปริมาณองค์ประกอบของสาร (camphor) ในน้ำมันหอมระเหย

3.5 ข้อมูลสภาพอุตุนิยมวิทยา

เก็บบันทึกข้อมูล โดย บันทึกข้อมูลในทุกวันๆ ละ 2 ครั้ง ในช่วงเช้าเย็น

- อุณหภูมิอากาศ ใช้ เทอร์โมมิเตอร์กระเปาะแห้ง

- ความชื้นสัมพัทธ์ ข้อมูลได้จากอุณหภูมิที่เก็บบันทึกจากเทอร์โมมิเตอร์กระเปาะเปียกและ เทอร์โมมิเตอร์กระเปาะแห้ง มาเทียบค่าในตารางหาความชื้นสัมพัทธ์

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์หาความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของข้อมูลตามแผนการทดลองแบบ Split plot in CRD โดยใช้โปรแกรม MSTAT และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง โดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test)