บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

3.1.1 เพื่อสำรวจและจำแนกชนิด แมลงกินได้ในพื้นที่เขื่อนห้วยกุ่ม

3.1.2 เพื่อวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของแมลงกินได้เหล่านี้ ซึ่งได้แก่ การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โปรตีนที่ย่อยได้ ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ไฟเบอร์ เถ้า พลังงาน และชนิดของกรดไขมัน

3.1.3 เพื่อเก็บตัวอย่างแมลงกินได้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อใช้เป็นแหล่งศึกษา

3.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

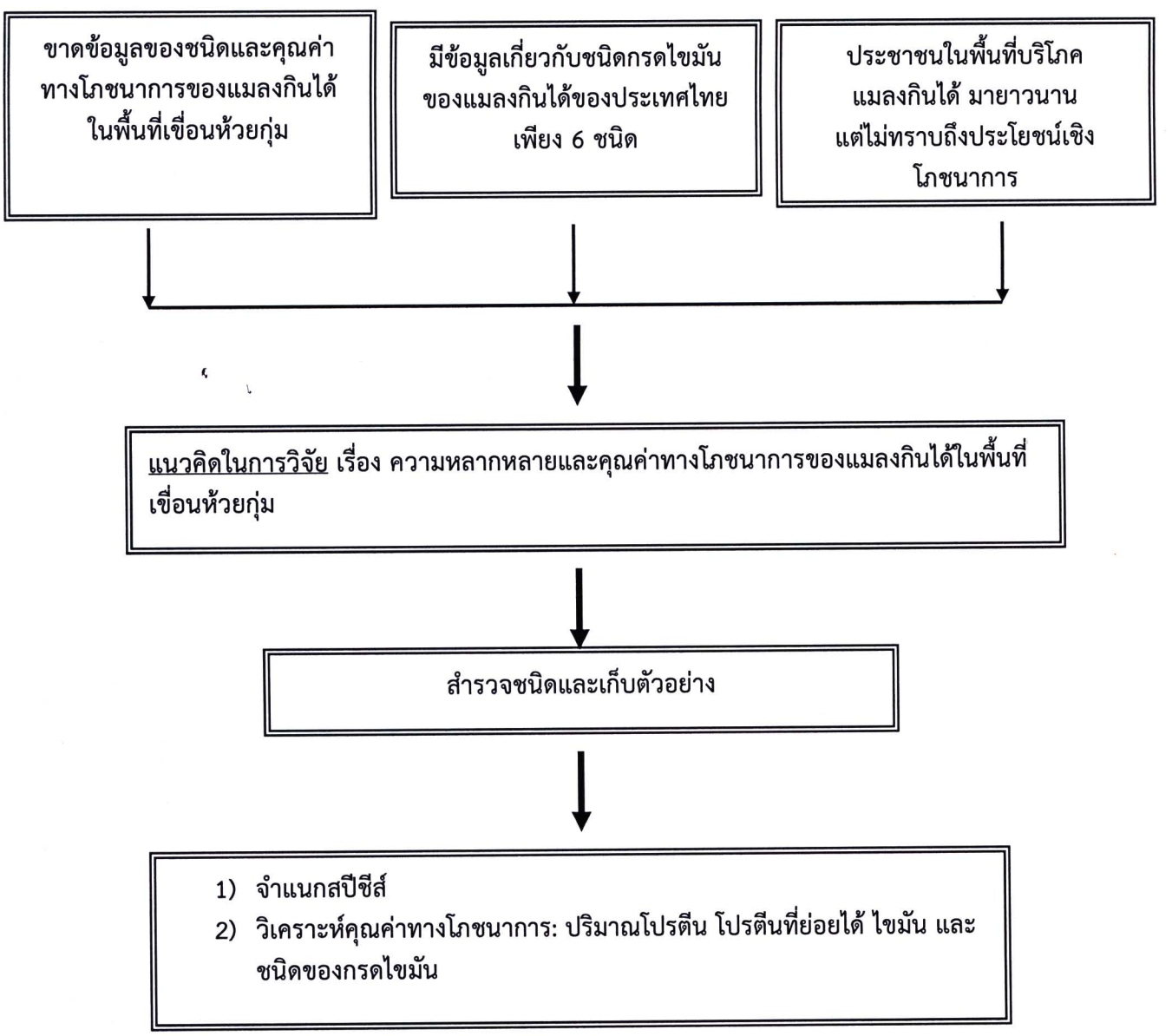
3.2.1 ทราบชนิดแมลงที่บริโภคในพื้นที่เขื่อนห้วยกุ่ม

3.2.2 ทราบคุณค่าทางโภชนาการของแมลงอย่างน้อย 10 ชนิด

3.2.3 ได้ตัวอย่างบางส่วนเพื่อเก็บในพิพิธภัณฑ์ของแมลงที่บริโภคในพื้นที่เขื่อนห้วยกุ่ม

3.2.4 ข้อมูลที่สามารถใช้ในการตีพิมพ์งานวิจัยระดับชาติหรือนานาชาติ หรือข้อมูลที่สามารถใช้ในการนำเสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติ อย่างน้อย 1 เรื่อง

3.3 กรอบแนวคิด



3.4 แผนดำเนินการวิจัย

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปีตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2552 – 30 กันยายน 2553

แผนดำเนินการ	เดือน											
	ตค	พย	ธค	มค	กพ	มีค	เมย	พค	มิย	กค	สค	กย
1) การสำรวจชนิดของแมลงที่บริโภคในพื้นที่เขื่อนห้วยกุ่ม	▨											
2) การเก็บตัวอย่าง	▨						▨					
3) การจำแนกชนิด		▨	▨	▨	▨			▨	▨	▨	▨	
4) การเตรียมตัวอย่างแห้งหรือดอง		▨	▨	▨				▨	▨	▨		
5) การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ		▨	▨	▨	▨	▨		▨	▨	▨	▨	
6) การจัดทำรายงานความก้าวหน้า 6 เดือน						▨						
7) สรุป วิเคราะห์ จัดทำรายงาน												▨

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบชนิดแมลงที่บริโภคในพื้นที่เขื่อนห้วยกุ่ม
2. ทราบคุณค่าทางโภชนาการของแมลงอย่างน้อย 10 ชนิด
3. ได้ตัวอย่างบางส่วนเพื่อเก็บในพิพิธภัณฑ์ของแมลงที่บริโภคในพื้นที่เขื่อนห้วยกุ่ม
4. ข้อมูลที่สามารถใช้ในการตีพิมพ์งานวิจัยระดับชาติหรือนานาชาติหรือการตีพิมพ์ในหนังสือ 1 เรื่อง

งบประมาณ 100,000 บาท (หนึ่งแสนบาทถ้วน)

1) ค่าใช้สอย 41,667.60 บาท
2) ค่าวัสดุสารเคมี 58,332.40 บาท

3.5 วิธีดำเนินการวิจัย

3.5.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างแมลงกินได้

เก็บตัวอย่างแมลงกินได้จากพื้นที่บริเวณเขื่อนห้วยกุ่ม โดยแบ่งการเก็บตัวอย่างเป็น 3 พื้นที่ ดังนี้

พื้นที่ 1: หนองน้ำใกล้อ่างเก็บน้ำ
พื้นที่ 2: บริเวณสันเขื่อน
พื้นที่ 3: ยอดเขาข้างสันเขื่อน

โดยในพื้นที่ 2 และ 3 เป็นการเก็บแมลงกินได้ ด้วยกับดักไฟ ส่วนในพื้นที่ 1 เป็นการเก็บแมลงด้วยการใช้สวิงช้อนในกลุ่มแมลงน้ำ โดยการช้อนจากแหล่งน้ำ จากนั้นนำมาล้างน้ำแล้วผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เก็บแมลงแยกตามชนิดในตู้ -20°ซ ส่วนหนึ่งนำไปทำการจำแนกชนิดโดยภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ส่วนที่เหลือนำไปวิเคราะห์ต่อไปโดยจะใช้เฉพาะส่วนที่กินได้เท่านั้นในการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ซึ่งประกอบด้วย ปริมาณความชื้น ปริมาณไขมัน ปริมาณโปรตีน ปริมาณเถ้า เยื่อใย ปริมาณคาร์โบไฮเดรต และปริมาณชนิดของกรดไขมัน (ส่วนที่กินได้ของแมลง คือเฉพาะแมลงหลังจากหักปีกแข็ง ขา และหัวออก)

3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (A.O.A.C., 2000)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น ทำการทดลองโดยใช้แมลงแต่ละชนิดจำนวน 5 กลุ่มตัวอย่าง เพื่อเปรียบเทียบทางสถิติ อบภาชนะเปล่า (Plate) และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccators) จนได้น้ำหนักคงที่ (ผลต่างน้ำหนักสองครั้งหลังสุดไม่เกิน 0.003 กรัม) บันทึกน้ำหนัก ชั่งตัวอย่างแมลงใส่ในภาชนะประมาณ 2 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 70°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก และบันทึกผล นำไปอบต่ออีก 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก ถ้าของต่างน้ำหนักของตัวอย่างมากกว่า 0.003 กรัม ทำการอบต่อจนกว่าผลต่างน้ำหนักสองครั้งหลังสุดไม่เกิน 0.003 กรัม คำนวณค่าความชื้นได้จากสมการ

$$\text{ความชื้น (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่หายไป (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี Kjeldahl (A.O.A.C., 2000)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทำการทดลองโดยชั่งตัวอย่างแมลงประมาณ 0.5 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ใน digestion tube แล้วใส่ Kjeltabs 2 เม็ด และเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการย่อยตัวอย่างที่อุณหภูมิ 420°ซ ประมาณ 30-45 นาที หรือจนได้สารละลายใส ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากลั่นด้วยเครื่องกลั่น เติม 40% NaOH ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยนำ flask ที่มี 25 มิลลิลิตรของ 4% Boric acid รองรับส่วนที่กลั่นได้ กลั่นจนได้ประมาณ 150 มิลลิลิตร นำ flask มาไตเตรทกับ HCl จนได้สารละลายสีม่วงเทา คำนวณหา %N และ %โปรตีน

$$\text{N (\%)} = \frac{1.401 \times (V1 - V2) \times M}{W} \times 100$$

$$\text{โปรตีน (\%)} = \text{N (\%)} \times 6.25$$

V1 = ปริมาตรของ HCl ที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
V2 = ปริมาตรของ HCl ที่ใช้ไตเตรท blank (มิลลิลิตร)
M = ความเข้มข้นในหน่วยโมลาร์ของ HCl
W = น้ำหนักตัวอย่าง

3.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ย่อยได้ (A.O.A.C., 2000)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ย่อยได้ทำการทดลองโดย ชั่งตัวอย่างแมลงประมาณ 1 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.075N และเอนไซม์เปปซิน จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 45°ซ จากนั้นกรองและนำส่วนที่กรองได้ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีดังข้อ 3.5.3 จะได้เป็นค่าโปรตีนที่ย่อยไม่ได้ และนำไปลบออกจากโปรตีนทั้งหมด จะได้เป็นค่าของโปรตีนที่ย่อยได้ และหาค่าความสามารถในการย่อยได้จากสูตร

$$\text{Digestibility} = \frac{PDP \times 100}{CP}$$

PDP = โปรตีนที่ย่อยได้
CP = โปรตีนทั้งหมด

3.5.5 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันอย่างหยาบ (Crude fat) โดยเครื่อง Soxtec (A.O.A.C., 2000)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณไขมันอย่างหยาบ ทำการทดลองโดยใช้แมลงแต่ละชนิดจำนวน 6 กลุ่มตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบทางสถิติ ชั่งแมลงประมาณ 2 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) บนกระดาษกรองเบอร์ 1 ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษกรองให้มิดชิดแล้วใส่ลงใน thimble นำ thimble ใส่เข้าไปใน soxtec system HT เติม petroleum ether ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงใน extraction cup ที่อบและชั่งน้ำหนักไว้แล้ว นำ extraction cup เข้าสู่ soxtec system HT ทำการสกัดน้ำมันเป็นเวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นทำการชะล้างอีกประมาณ 1 ชั่วโมง ปิด condenser valve เพื่อกักเก็บ petroleum ether แล้วทำการระเหย petroleum ether ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำ extraction cup ออกไปอบที่ 70°ซ เป็นเวลา 30 นาที ปล่อยให้เย็นใน desiccators แล้วชั่งน้ำหนักของ extraction cup ที่มี crude fat อยู่ และนำไปคำนวณหาปริมาณไขมันอย่างหยาบ

$$\text{Fat (\%)} = \frac{\text{W2-W1}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

W1 = น้ำหนัก extraction cup ก่อนสกัดไขมัน (กรัม)
W2 = น้ำหนัก extraction cup หลังสกัดไขมัน (กรัม)

3.5.6 การทำ methylation ของกรดไขมันด้วยวิธี Ruiz-Lopez และคณะ (Ruiz-Lopez et al., 2003) สำหรับวิเคราะห์ด้วย Gas chromatography (GC)

ในการทำ methylation ของกรดไขมัน ทำการทดลองโดยใช้แมลงแต่ละชนิดจำนวน 3 กลุ่มตัวอย่าง เพื่อเปรียบเทียบทางสถิติ ชั่งน้ำมันที่ได้จากการสกัดไขมันอย่างหยาบประมาณ 0.01 กรัมใส่ vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Ruiz-Lopez (ภาคผนวก) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้เทปใสพันเพื่อกันการระเหย ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเติม 0.9% NaCl 200 ไมโครลิตร เขย่า ทิ้งไว้ข้ามคืน เติม heptane 200 ไมโครลิตร เขย่า และนำชั้นบนซึ่งเป็นชั้นของ heptane ไปวิเคราะห์ต่อไป

3.5.7 การวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมัน

จากตัวอย่างที่ได้เตรียมโดยการทำ methylation ของกรดไขมัน ใช้ตัวอย่างปริมาณ 1 ไมโครลิตร วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Shimadzu GC-14B Gas Chromatograph flame ionization detector (FID) และ BPX70 capillary column ขนาด 30.0 เมตร (ยาว) x 0.25 มิลลิเมตร (กว้าง) x 25 ไมโครเมตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง) โดยมีฮีเลี่ยมเป็น carrier gas ที่อัตราการไหล 3 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิของ injector เท่ากับ 250 °ซ อุณหภูมิของ detector เท่ากับ 300°ซ อุณหภูมิของ column เริ่มต้นที่ 170°ซ คงที่เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มขึ้นในอัตรา 3°ซ/นาที จนถึง

อุณหภูมิ 221°ซ. และคงที่เป็นเวลา 2 นาที ใช้เวลาในการ run 1 รอบ เป็นเวลา 20 นาที และวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง computer C-R7A

3.5.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของคุณค่าทางโภชนาการและปริมาณของกรดไขมัน โดยการใช้โปรแกรม SPSS for windows version 11.5 ด้วยวิธี One-Way ANOVA โดยเปรียบเทียบที่ค่า p-value < 0.005 ในทุกการทดลอง