บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

พืชทดลอง

พืชทดลอง รากหนอนตายหยาก *Stemona curtisii* Hk. F และ *Stemona aphylla* Craib ได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์และหลักฐานตัวอย่างพืชของหนอนตายหยากพันธุ์ดังกล่าวโดย Mr.Jame F. Maxwell และถูกแสดงไว้ที่หอพรรณไม้ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สัตว์ทดลอง

ไรทะเล (*Artemia salina* Leach.) ระยะ 24 ชั่วโมงหลังจากฟักออกจากไข่

หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* F.) วัย 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบและการแยกสารจากรากหนอนตายหยาก

- เก็บรากหนอนตายหยากแล้วนำมาล้างให้สะอาด จากนั้นจึงหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หรือจนกว่าพืชจะแห้งสนิท
- นำพืชมาสกัดด้วย ethanol 95% เป็นเวลา 3 วัน แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง และกรองอีกครั้งด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ โดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1
- นำกากพืชที่เหลือมาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง ด้วยวิธีเดิม
- นำสารสกัดที่ได้มาทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จนได้สารสกัดหยาบ(crude extract)
- นำสารสกัดหยาบที่ได้มาสกัดต่อโดยใช้วิธี partition ด้วย dichloromethane เพื่อให้ได้ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน
- จากนั้นส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจะถูกนำมาแยกสาร เพื่อหาสารองค์ประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นๆ โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี เช่น column chromatography และ preparative chromatography เป็นต้น
- สารองค์ประกอบที่แยกได้จะถูกนำมาศึกษาหาโครงสร้างหลักทางเคมี โดยใช้วิธีทางสเปกโตรสโกปี ได้แก่ Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) และ Mass spectroscopy

2. ขั้นตอนการเตรียมสัตว์ทดลอง

ไรทะเล (*Artemia salina* Leach.)

- นำกล่องพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ขนาดกว้าง 10 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร สูง 5.5 เซนติเมตร มีแผ่นกั้นกลางทำให้เกิดช่องว่าง 2 ด้าน ด้านหนึ่งพ่นด้วยสีเพื่อทำให้เกิดลักษณะที่ทึบแสง เจาะรูบริเวณแผ่นกั้นกลางตลอดแนวยาวของแผ่นกั้นให้สูงจากก้นกล่องประมาณ 3 เซนติเมตร

- เตรียมน้ำทะเลเทียมสำหรับเลี้ยงไรทะเล โดยใช้เกลือทะเลในอัตราส่วน 39 กรัมต่อน้ำ 1000 มิลลิลิตร คนให้เกลือทะเลละลายหมด เทน้ำทะเลเทียมลงในกล่องพลาสติกให้มีความสูงกว่ารูที่เจาะเอาไว้เล็กน้อย ตักไข่ไรทะเลใส่ในกล่องพลาสติกทึบแสงประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของผิวหน้าน้ำ ให้ไข่กระจายทั่วผิวน้ำ จากนั้นปิดฝากล่อง เนื่องจากไรทะเลจะมีการฟักตัวในที่มืด เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เปิดโคมไฟเพื่อล่อให้ไรทะเลที่ฟักตัวเคลื่อนตัวออกมาตามรูที่เจาะไว้ เมื่อครบ 48 ชั่วโมง จึงนำไรทะเลมาใช้ในการทดลอง

ภาพ 1 อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงไรทะเล

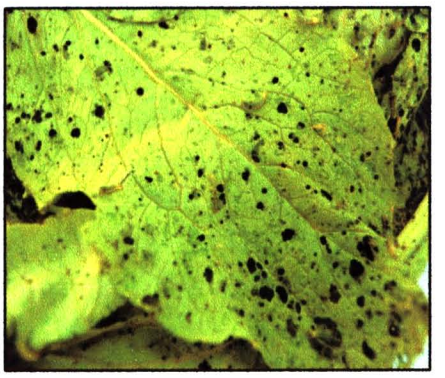
ภาพ 2 ไรทะเล

ภาพ 3 การตรวจสอบการตายของไรทะเลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* F.)

- เก็บใบคะน้าที่มีไข่และตัวหนอน จากแปลงปลูกผักของเกษตรกรใส่กล่องพลาสติกขนาด 17 x 24.5 x 9 เซนติเมตร เลี้ยงหนอนกระทู้ผักที่เก็บมาได้ในกล่องขนาด 17 x 24.5 x 9 เซนติเมตร โดยเริ่มรองกระดาษชำระเมื่อตัวหนอนเข้าสู่วัย 3 จากนั้นเมื่อเริ่มเข้าสู่ระยะดักแด้ จึงแยกตัวหนอนที่เริ่มหดตัวมาเลี้ยงในกล่องพลาสติกที่รองกระดาษฟลอยด์ เมื่อกลายเป็นดักแด้แล้ว จึงนำไปใส่กล่องพลาสติกที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร ปิดฝาแล้วนำเข้ากรงเลี้ยงแมลงให้ผักสำหรับการวางไข่และน้ำผึ้งสำหรับเป็นอาหารตัวเต็มวัย คอยเปิดฝาเพื่อให้ตัวเต็มวัยบินออก

จากกล่องพลาสติก รอจนตัวเต็มวัยวางไข่จึงนำผักคะน้านั้นมาเลี้ยงต่อจนได้หนอนกระทู้ผักที่โตถึงระยะที่ต้องการนำไปทดลอง



ภาพ 4 หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* F.) วัย 3

การทดลองที่ 1 การสกัดและแยกสารองค์ประกอบจากรากหนอนตายหยากให้บริสุทธิ์

นำส่วนสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทนจากรากหนอนตายหยาก มาแยกหาองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟฟี ได้แก่ เทคนิคโครมาโตกราฟฟีแบบคอลัมน์(column chromatography, CC) โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน (hexane), เอทิลอะซีเตต (ethy acetate), ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane), เมทานอล (methanol) และ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ammonium hydroxide) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นหลัก จากนั้นตรวจสอบสารที่แยกได้จากคอลัมน์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟฟีแบบผิวบาง (thin layer chromatography, TLC)

การทดลองที่ 2 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นโดยใช้ไรทะเล

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทำการทดสอบประสิทธิภาพกับไรทะเล โดยเตรียมสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ใส่ในหลอดทดลองที่มีไรทะเลหลอดละ 10 ตัวอยู่ จากนั้นนับจำนวนไรทะเลที่ตายและที่รอดชีวิตโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ภายหลังจากการให้สารทดสอบ คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การตายของไรทะเล (% mortality) และคำนวณค่า LC_{50} ด้วยวิธี probit analysis (Finney, 1978)

การทดลองที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อแมลงศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดด้วยวิธี leaf disk choice (Brem *et al.*, 2002) ตัดผักคะน้าเป็นรูปวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร วางลงใน petri dish ใช้ micropipette ดูดสารสกัดชนิดต่างๆ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดสารทดสอบลงบนใบคะน้า 2 ใบที่วางในลักษณะตรงกันข้าม ส่วนด้านที่เหลือหยดตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสารสกัดเพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนหมด จากนั้นนำหนอนกระทู้ผักปล่อยลงตรงกลาง

petri dish เริ่มบันทึกผลการทดลองเมื่อใบคะน้าในกลุ่มควบคุมถูกหนอนกินไป 50 เปอร์เซ็นต์ โดยบันทึกลักษณะการออกฤทธิ์ของสารดังนี้

Repellent activity	=	ไม่มีการกินใบคะน้าเกิดขึ้นเลย
Strong antifeedant activity	=	พื้นที่โดยรวมของใบคะน้าถูกกินน้อยกว่า 5 %
Antifeedant activity	=	พื้นที่โดยรวมของใบคะน้าถูกกิน 5 – 20 %
Inactive	=	พื้นที่โดยรวมของใบคะน้าถูกกินมากกว่า 20 %

ก. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีผสมพันธุ์

1. การผสมพันธุ์พืชสกุลเปราะ

ทำการสำรวจพันธุ์เปราะในพื้นที่ ณ ศูนย์การศึกษามหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หริภุญไชย เนื่องจากเล็งเห็นศักยภาพในการพัฒนาพืชสกุลนี้ ไปใช้ประโยชน์ในการทำเป็นไม้ใบประดับ โดยการสำรวจและรวบรวมต้นมาลองทำการผสมพันธุ์โดยทำการผสมตัวเอง และผสมข้ามชนิดเพื่อดูความเป็นไปได้ในการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์

2. การผสมพันธุ์โสมชบา

ใช้โสมชบาที่พบจากพื้นที่ศูนย์การศึกษามหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หริภุญไชย นำมาปลูกและทำการผสมตัวเองและผสมข้ามชนิดกับชบาพันธุ์การค้า และชบาคำ ซึ่งเป็นพืชในกลุ่มชบาที่พบ ณ ศูนย์การศึกษามหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หริภุญไชย เช่นเดียวกัน โดยทำการผสมพันธุ์ในช่วงระยะเวลาต่างๆ โดยมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 3 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ดอก กรรมวิธีประกอบด้วย

1. การผสมตัวเอง
2. การผสมข้ามกับชบาพันธุ์การค้า
3. การผสมข้ามกับชบาคำ (พันธุ์ป่า)