

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัตถุดิบและแมลงที่ใช้ในการทดลอง

1. ถั่วเขียวพันธุ์ชัชนาท 72 จากศูนย์วิจัยพืชไร่ชัชนาท จังหวัดชัชนาท
2. ค้างถั่วเขียว (*Callosobruchus maculatus* (F.)) จากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีแห่งชาติ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วิธีการทดลอง

การเตรียมเมล็ดถั่วเขียวสำหรับการทดลอง

1. งานทดลองนี้ใช้ถั่วเขียวพันธุ์ชัชนาท 72 จากศูนย์วิจัยพืชไร่ชัชนาท จังหวัดชัชนาท
2. ทำความสะอาดเมล็ดถั่วเขียวด้วยเครื่องทำความสะอาดเมล็ดพันธุ์ชนิดลมเป่า เพื่อคัดเมล็ดลีบและเมล็ดแตกหัก รวมทั้งสิ่งเจือปนต่าง ๆ ออกจากเมล็ด
3. นำเมล็ดถั่วเขียวที่ผ่านการทำความสะอาดแล้ว ใส่ในถุงพลาสติกพร้อมทั้งปิดผนึกปากถุงให้สนิท นำไปแช่แข็ง 2-3 วันเพื่อกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ ที่ปะปนมากับเมล็ดถั่วเขียว จากนั้นจึงเก็บรักษาเมล็ดไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสเพื่อเป็นการป้องกันการเข้าทำลายซ้ำของแมลงศัตรูในโรงเก็บอีกครั้งหนึ่ง
4. นำเมล็ดถั่วเขียวมาตรวจสอบความชื้นด้วยวิธีอบลมร้อน (ISTA, 2006) โดยนำเมล็ดมาชั่งน้ำหนักสด แล้วนำไปอบลดความชื้นในตู้อบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำออกมาชั่งน้ำหนักแห้ง เพื่อกำหนดหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของเมล็ดโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักเมล็ดก่อนอบ} - \text{น้ำหนักเมล็ดหลังอบ}}{\text{น้ำหนักเมล็ดก่อนอบ}} \times 100$$

5. ปรับความชื้นของเมล็ดถั่วเขียวให้ได้ประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์ สำหรับใช้เลี้ยงแมลง
6. ปรับความชื้นของเมล็ดถั่วเขียวให้ได้ประมาณ 11 เปอร์เซ็นต์ สำหรับใช้ศึกษาคุณสมบัติไดอิเล็กทริกและการให้ความร้อนด้วยคลื่นความถี่วิทยุ

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วงถั่วเขียวในระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ เพื่อใช้สำหรับการทดลอง

ระยะไข่

นำตัวเต็มวัยด้วงถั่วเขียวคละเพศ ประมาณ 2,000 ตัว ใส่ลงในขวดโหลพลาสติกมีฝาปิดเป็นตาข่ายถี่ ขนาดบรรจุ 2.8 ลิตรที่บรรจุถั่วเขียว ประมาณ 1,000 กรัม ที่ผ่านการแช่แข็งมาแล้ว เพื่อกำจัดแมลงชนิดอื่นที่ติดมาด้วย จากนั้นทิ้งไว้ 2 วันเพื่อให้มีการผสมพันธุ์และวางไข่ ทำการร่อนตัวเต็มวัยออกโดยใช้ตะแกรง laboratory test sieve ที่มีช่องเปิดขนาด 2.80 มิลลิเมตร จับตัวเต็มวัยออกโดยใช้เครื่องดูดแมลง และคัดเลือกเมล็ดถั่วเขียวที่มีไข่ของด้วงถั่วเขียวจำนวน 1 ฟองต่อ 1 เมล็ดภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

ระยะหนอน

ทำการเลี้ยงแมลงโดยใช้วิธีเดียวกับระยะไข่ นำเมล็ดถั่วเขียวที่มีไข่ของด้วงถั่วเขียวจำนวน 1 ฟองต่อ 1 เมล็ดที่คัดแยกเอาไว้ วางลงในช่องของ 96 well plate ช่องละ 1 เมล็ด หนอนจะฟักออกจากไข่และเจาะเข้าไปในเมล็ดตรงส่วนที่ไข่ติดกับเมล็ด

ระยะดักแด้

ใช้วิธีการเดียวกับระยะหนอน เพียงแต่ทิ้งไว้เพื่อให้หนอนภายในเมล็ดถั่วเขียวเข้าดักแด้ การเลี้ยงด้วงถั่วเขียวและทุกการทดลองแมลงจะอยู่ในห้องปฏิบัติการอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งควบคุมความชื้นสัมพัทธ์โดยแมลงที่ทดสอบอยู่ในกล่องพลาสติกปิด ขนาด กว้าง 12 นิ้ว ยาว 25 นิ้ว สูง 12 นิ้ว ซึ่งบรรจุสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นบริเวณก้นกล่อง ประมาณ 1.5 ลิตร

การทดลองที่ 1 ศึกษาหาคุณสมบัติไดอิเล็กทริกของถั่วเขียวและระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ ของด้วงถั่วเขียว

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาคุณสมบัติไดอิเล็กทริกของระยะการเจริญเติบโตของด้วงถั่วเขียวและเมล็ดถั่วเขียวที่ความชื้น 11 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลองกับด้วงถั่วเขียวทั้ง 3 ระยะ (ระยะไข่อายุ 2 วัน ระยะตัวหนอนอายุ 17 วัน และระยะดักแด้อายุ 21 วัน) และเมล็ดถั่วเขียวที่ความชื้น 11 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์หีмпิแดนซ์ความแม่นยำสูง (impedance analyzer) หัววัดแบบ open-ended coaxial วัดที่ช่วงความถี่ 0-30 MHz ที่ระยะเพลท 3 ระยะ คือ 0.50, 1.00

และ 1.50 เซนติเมตร บรรจุเมล็ดจนเต็มระหว่างแผ่นเพลท เนื่องจากความจุไฟฟ้าของแผ่นตัวนำ ขนาน (ในที่นี้คือแผ่นเพลทอะลูมิเนียมขนาด 10×10 เซนติเมตร) แปรผกผันกับระยะห่างระหว่าง แผ่นเพลท นอกจากนั้นแล้วในคุณสมบัติไดอิเล็กทริกของผลิตภัณฑ์ขึ้นอยู่กับความถี่ ความชื้น อุณหภูมิและความหนาแน่น (Nelson, 1992) ซึ่งวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล โดยศึกษา 2 ปัจจัยได้แก่ ปัจจัยแรกคือ ค้างตัวเขียวทั้ง 3 ระยะ (ระยะไข่อายุ 2 วัน ระยะหนอนอายุ 17 วัน และ ระยะดักแด้อายุ 21 วัน) และเมล็ดตัวเขียวที่ความชื้น 11 เปอร์เซ็นต์ และปัจจัยที่สอง คือ ระยะ เพลททั้ง 3 ระยะ (0.50, 1.00 และ 1.50 เซนติเมตร) ในแต่ละทุกกรรมวิธีทำ 9 ซ้ำ นำค่าคงที่ได อิเล็กทริก (dielectric constant; ϵ') ค่าแฟกเตอร์การสูญเสีย (loss factor; ϵ'') และค่าลอสมแทนเจน (loss tangent; $\tan \delta$) ที่ความถี่ 26.89 MHz ซึ่งเป็นความถี่ที่ใกล้เคียงกับความถี่ 27.12 MHz ที่ใช้ ในการทดลองในครั้งนี้ มาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้ด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

การทดลองที่ 2 ศึกษาหาระยะการเจริญเติบโตของค้างตัวเขียวที่มีความทนทานที่สุดเมื่อผ่านคลื่น ความถี่วิทยุที่ระดับพลังงานที่เหมาะสม

การทดลองเบื้องต้นเพื่อหาระดับพลังงาน (power) ที่เหมาะสมที่ตอบสนองต่อค้างตัวเขียว ความชื้นเริ่มต้น 11 เปอร์เซ็นต์ โดยนำค้างตัวเขียวบรรจุถุงพลาสติกให้เต็มถุง laminate ขนาด 25.5×17.7 เซนติเมตร ปริมาณ 1,000 กรัม ปิดผนึกปากถุง (sealed) ด้วยเครื่องปิดผนึกถุงพลาสติก (heat sealer) หลังจากนั้นนำไปผ่านคลื่นความถี่วิทยุ 27.12 MHz ที่ระดับพลังงาน (Power) 530, 560, 590, 620, 640, 670 และ 730 วัตต์ บันทึกอุณหภูมิทุก ๆ เวลา 20 วินาที จนครบ 180 วินาที แต่ละระดับพลังงานทำการทดลอง 3 ซ้ำ เมื่อได้ระดับพลังงานที่เหมาะสม นำไปใช้ในการหาระยะ เจริญเติบโตของค้างตัวเขียวที่มีความทนทาน

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาระยะการเจริญเติบโตของค้างตัวเขียวที่มีความทนทาน ต่อคลื่นความถี่วิทยุมากที่สุด ทำการทดลองกับค้างตัวเขียว 3 ระยะคือ ระยะไข่อายุ 2 วัน ระยะตัว หนอนอายุ 17 วัน และระยะดักแด้อายุ 21 วัน โดยนำค้างตัวเขียว แยกทำการทดลองค้างตัวเขียว แต่ละระยะการเจริญเติบโต โดยใช้ค้างตัวเขียวแต่ละระยะจำนวน 30 ตัว ใส่ลงในถุงพลาสติก laminate ขนาด 25.5×17.7 เซนติเมตร บรรจุค้างตัวเขียวให้เต็มถุง ปริมาณ 1,000 กรัม ปิดผนึกปากถุง (sealed) หลังจากนั้นนำไปผ่านคลื่นความถี่วิทยุ 27.12 MHz ที่ระดับพลังงาน (Power) 640 วัตต์ ระยะเวลาในการให้พลังงาน 120 วินาที เพื่อหาระยะการเจริญที่สามารถอยู่รอดได้มากที่สุด ในแต่ละทุกกรรมวิธีทำ 6 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้รับคลื่นความถี่วิทยุ (ชุดควบคุม) เปอร์เซ็นต์การ ตายถูกนำมาคำนวณปรับค่าเปอร์เซ็นต์การตายโดยใช้ Abbott's formula (Abbott, 1925) ข้อมูลที่ได้ นำไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) เปรียบเทียบค่าที่ได้ด้วย Least Significant

Difference (LSD) เปรียบเทียบจำนวนแมลงรุ่นลูก ซึ่งวางแผนการทดลองแบบ แฟคทอเรียล โดยศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ ระยะเจริญเติบโตของแมลง และกรรมวิธีที่ใช้คลื่นความถี่วิทยุ

การทดลองที่ 3 ศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้ด้วงถั่วเขียวตายอย่างสมบูรณ์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาระยะเวลาที่ต่ำที่สุดที่สามารถกำจัดด้วงถั่วเขียวอย่างสมบูรณ์ได้ ใช้ด้วงเขียวพันธุ์ชยันต 72 ความชื้นเริ่มต้น 11 เปอร์เซ็นต์ โดยนำด้วงถั่วเขียว (ระยะหนอนที่สุดจากการทดลองที่ 2) 30 ตัว ใส่ลงในถุงพลาสติก laminate ขนาด 25.5 x 17.7 เซนติเมตร บรรจุด้วงเขียวให้เต็มถุง ปริมาณ 1,000 กรัม ปิดผนึกปากถุง มาผ่านการใช้คลื่นความถี่วิทยุ 27.12 MHz ที่ระดับพลังงาน (Power) 640 วัตต์ ระยะเวลาในการให้พลังงาน 120, 140, 160, 180, 200 และ 220 วินาที ซึ่งจะทำให้ความร้อนอยู่ในช่วง 50-75 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) แต่ละกรรมวิธีทำการทดลอง 6 ซ้ำ จำนวนเปอร์เซ็นต์การตาย ตรวจสอบคุณภาพของด้วงเขียว และคุณสมบัติทางไดอิเล็กทริกที่เปลี่ยนไปหลังการผ่านการใช้คลื่นความถี่วิทยุดังกล่าว หลังจากนั้นนำด้วงเขียวที่ผ่านคลื่นความถี่วิทยุในอัตราที่เหมาะสมสามารถกำจัดแมลงตายอย่างสมบูรณ์มาศึกษาเปรียบเทียบกับคุณภาพที่ไม่ได้รับคลื่นความถี่วิทยุ

คำนวณเปอร์เซ็นต์การตาย (Corrected Mortality) (Abbott, 1925) ซึ่งแสดงในสมการนี้

$$\text{Corrected Mortality} = \frac{\% \text{ tested mortality} - \% \text{ control mortality}}{100 - \% \text{ control mortality}} \times 100$$

การวัดผลของการใช้คลื่นความถี่วิทยุต่อคุณภาพด้วงเขียว

วัดคุณภาพด้วงเขียวที่ได้รับการผ่านคลื่นความถี่วิทยุ 27.12 MHz ที่ระดับพลังงาน 640 วัตต์ ระยะเวลา 220 วินาที ซึ่งเป็นระยะเวลาที่สามารถกำจัดด้วงเขียวได้สมบูรณ์ที่สุด โดยเปรียบเทียบกับด้วงเขียวจากถุงที่ไม่ได้ผ่านคลื่นความถี่วิทยุ โดยด้วงเขียวที่ใช้ทดสอบมีความชื้นเริ่มต้นเฉลี่ย 11.0 เปอร์เซ็นต์ โดยวัดคุณสมบัติของด้วงเขียวดังต่อไปนี้

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและสมบัติทางกายของด้วงเขียว (ภาคผนวก ก)

1. การวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพ

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ตามวิธี (ISTA, 2006)

1.2 การวัดค่าสีโดยใช้เครื่องวัดสี (Color Quest XE; HunterLab, USA)

- 1.3 การวัดความแข็งของเมล็ดโดยใช้เครื่อง Texture analyzer รุ่น TA-XT plus Texture Analyzer
- 1.4 การวัดค่าความหนืดโดยใช้เครื่อง Rapid Visco Analyzer รุ่น RVA-4
- 1.5 การวัดคุณสมบัติไดอิเล็กทริกโดยใช้เครื่องอิมพีแดนซ์ความแม่นยำสูง
2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเขียว ดังต่อไปนี้
 - 2.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธี A.O.A.C (1990)
 - 2.2 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ตามวิธี A.O.A.C (1990)
 - 2.3 การวิเคราะห์เยื่อใย ตามวิธี A.O.A.C (1990)
 - 2.4 การวิเคราะห์เถ้า ตามวิธี A.O.A.C (1990)
 - 2.5 คำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรต ตามสมการต่อไปนี้
 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ) = $100 - \%(\text{ความชื้น} + \text{โปรตีน} + \text{เถ้า} + \text{เส้นใย} + \text{ไขมัน})$
 - 2.6 การวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส (Juliano *et al.*, 1981)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) โดยใช้โปรแกรม SPSS 17 วิเคราะห์ทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

สถานที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยา ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ และสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่