บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมวัสดุทดลอง

นำดอกเยอบีราสีแดงพันธุ์ Florijn โดยเลือกที่อยู่ในระยะที่ดอกย่อยกลาง บาน 2 วง ตัดจากสวนบริษัทฟรอร่า จังหวัดเชียงราย และขนส่งแบบแห้ง นำมายังห้องปฏิบัติการภายหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตภัณฑ์พืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการ นำดอกไม้มาคัดให้ได้ขนาด และคุณภาพสม่ำเสมอใกล้เคียงกันมากที่สุด เลือกดอกที่ปราศจากโรค ตัดก้านดอกใต้น้ำ ให้มีความยาวก้านประมาณ 25 เซนติเมตร โคนก้านให้เฉียง 45 องศา แล้วจึงสุ่มเลือกดอกเยอบีราจัดตามทรีตเมนต์ ดังนี้

3.2 การวางแผนการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสและ 8-hydroxyquinoline sulfate (8-HQS) ต่ออายุการปักแจกันของดอกเยอบีรา

นำดอกเยอบีราที่ได้รับจากขั้นตอนที่ 3.1 มาปักในแจกันที่มีน้ำตาลซูโครส และ 8-HQS โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 3 วิธีการ แต่ละวิธีทำ 3 ซ้ำ โดยแบ่งชุดการทดลองได้ดังนี้

วิธีการที่ 1 แช่ในน้ำกลั่น (ชุดควบคุม)
วิธีการที่ 2 แช่ในสารละลายซูโครส 5 %
วิธีการที่ 3 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของกรดจิบเบอเรลลิก (GA_3) ต่ออายุการปักแจกันของดอกเยอบีรา

วิธีการที่ 1 แช่สารละลาย ซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + GA_3 0 ppm (ชุดควบคุม)
วิธีการที่ 2 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS150 ppm + GA_3 0.5 ppm
วิธีการที่ 3 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + GA_3 1.0 ppm
วิธีการที่ 4 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + GA_3 1.5 ppm
วิธีการที่ 5 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + GA_3 2.0 ppm
วิธีการที่ 6 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + GA_3 2.5 ppm
วิธีการที่ 7 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + GA_3 3.0 ppm

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของเบนซิลอะดีนีน (BA) ต่ออายุการปักแจกันของดอกเยอบีรา

วิธีการที่ 1 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + BA 0 ppm (ชุดควบคุม)

วิธีการที่ 2 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + BA 0.05 ppm

วิธีการที่ 3 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + BA 0.10 ppm

วิธีการที่ 4 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + BA 0.15 ppm

วิธีการที่ 5 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + BA 0.20 ppm

วิธีการที่ 6 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + BA 0.25 ppm

วิธีการที่ 7 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + BA 0.30 ppm

การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของไคเนทิน (Kn) ต่ออายุการปักแจกันของดอกเยอบีรา

วิธีการที่ 1 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + Kn 0 ppm (ชุดควบคุม)

วิธีการที่ 2 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + Kn 0.05 ppm

วิธีการที่ 3 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + Kn 0.10 ppm

วิธีการที่ 4 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + Kn 0.15 ppm

วิธีการที่ 5 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + Kn 0.20 ppm

วิธีการที่ 6 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + Kn 0.25 ppm

วิธีการที่ 7 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + Kn 0.30 ppm

การทดลองที่ 5 ศึกษาผลของกรดจิบเบอเรลลิก ร่วมกับไคเนทิน หรือ Benzyladenine ต่ออายุการปักแจกันของดอกเยอบีรา

วิธีการที่ 1 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm (ชุดควบคุม)

วิธีการที่ 2 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + GA_3 + Kn

วิธีการที่ 3 แช่ในสารละลายซูโครส 5 % + 8-HQS 150 ppm + GA_3 + BA

ทำการปรับค่าพีเอช (pH) ของสารละลายทุกทรีตเมนต์ ด้วยกรดอะซีติก ให้มีค่าเท่ากับ 3.5 แล้วจึงสุ่มดอกเยอบีราปักลงตามวิธีการ นำไปตั้งไว้ที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 60-70 ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทุกวัน จนสิ้นสุดการทดลอง และบันทึกการทดลองทุกวันจนดอกเยอบีราไม่เป็นที่ยอมรับหรือหมดอายุการใช้งาน

3.3 **การบันทึกผล** ในทุกทรีตเมนต์ ศึกษาและบันทึกผลการทดลองดังนี้

3.3.1 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักสดของดอกเยอบีราระหว่างการปักแจกัน

แยกดอกเยอบีรา ออกมา 1 ชุด เพื่อใช้ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสด ชั่งน้ำหนักเริ่มต้นก่อนปักแจกัน หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักดอกเยอบีราทุกวัน คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์โดยให้น้ำหนักเริ่มต้นเท่ากับ 100

น้ำหนักสด (เปอร์เซ็นต์) = (น้ำหนักหลังการเก็บรักษา / น้ำหนักก่อนการเก็บรักษา) x 100

3.3.2 อัตราการดูดน้ำ (มิลลิลิตร/วัน)

นำดอกเยอบีรา (ชุดที่แยกสำหรับตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสด) มาวัดปริมาณน้ำที่ลดลงในแต่ละวัน โดยใช้หลอดปักแจกันที่มีขีดบอกปริมาตรพร้อมฝาปิด ดึงก้านดอกให้ลอยเหนือระดับสารละลายในหลอด แล้วจึงอ่านค่าปริมาตรของสารละลายที่ดอกเยอบีราดูดไปใช้ในแต่ละวัน

3.3.3 อัตราการหายใจและการผลิตเอทิลีน

3.3.3.1 การวัดอัตราการหายใจ

วัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใส่เยอบีรา 1 ดอก ในกระบอกแก้ว แล้วปิดปากกระบอกให้สนิท (close system) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างก๊าซภายในกระบอกแก้วด้วยเข็มฉีดยาปริมาตร 1 มิลลิลิตร หาปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (รุ่น GC-17A) ชนิด thermal conductivity detector (TCD) ที่อุณหภูมิ สภาพของการวัดความเข้มข้นของก๊าซดังตารางที่ 3.1 โดยเปรียบเทียบกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มาตรฐาน จากนั้นจึงนำค่าที่วัดได้จากเครื่อง (หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์) ไปคำนวณหาอัตราการหายใจซึ่งมีหน่วยเป็น มก. CO_2/กก./ชม. ($mgCO_2/kg/h$)

ตารางที่ 3.1 สภาพของการวัดความเข้มข้นของก๊าซ CO_2 และ C_2H_4

	CO_2	C_2H_4
Column temperature	50	90
Injector temperature	100	120
Detector	TCD	FID
Carrier gas	Helium (H_2)	Nitrogen (N_2)

3.3.3.2 การวัดการผลิตเอทิลีน

วัดปริมาณก๊าซเอทิลีน โดยใส่เยอบีรา1 ดอก ในกระบอกแก้ว แล้วปิดปากกระบอกให้สนิท (close system) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างก๊าซภายในกระบอกแก้วด้วยเข็มฉีดยาปริมาตร 1 มิลลิลิตร หาปริมาณเอทิลีน โดยฉีดเข้าเครื่องแก๊ส

โครมาโทกราฟ (รุ่น GC-17A) ชนิด flame ionization detector (FID) โดยเปรียบเทียบกับก๊าซเอทิลีน จากนั้นจึงนำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาค่าอัตราการผลิตเอทิลีน ซึ่งมีหน่วยเป็นไมโครลิตร/กก./ชม. (µl/kg/h)

** หมายเหตุ เนื่องจากการศึกษาหาปริมาณเอทิลีนในครั้งนี้ เครื่องมือไม่สามารถวัดค่าออกมาได้ จึงไม่มีการรายงานผล

3.3.4 การวัดการเปลี่ยนแปลงของสีกลีบดอก

นำดอกเยอบีรา (ชุดที่แยกสำหรับตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสด) มาวัดสีด้วยเครื่องวัดสี Minolta Chroma Meter รุ่น CR-310 ซึ่งรายงานผลเป็นค่า Hunter scale อ่านค่าเป็น L, a* และ b* โดยวัดในระบบ three-dimensional color space ค่า Hue ประกอบด้วยค่าต่าง ๆ ดังนี้

- ค่า L เป็นค่าที่รายงานความสว่างของสี
- ค่า a* เป็นค่าที่รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของสีในช่วงสีเขียวในกรณีที่ค่า a เป็นลบ และช่วงสีแดงในกรณีที่มีค่า a เป็นบวก
- ค่า b* เป็นค่าที่รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของสีในช่วงสีน้ำเงินในกรณีที่ค่า b เป็นลบ และช่วงสีเหลืองในกรณีที่มีค่า b เป็นบวก

ในการวัดสีใช้หัววัดกดแนบให้สัมผัสกับผิวของกลีบดอกให้มากที่สุด โดยวัดสีที่บริเวณกลางกลีบดอก

3.3.5 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ACC oxidase (ดัดแปลงจาก Kato et al., 2002)

นำดอกเยอบีรามาหั่นให้ละเอียดจำนวน 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก (vial) ขนาด 10 มิลลิลิตร บดให้ละเอียด จากนั้นแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ก. และ ข. โดยชุดการทดลอง ก. ให้เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และชุดการทดลอง ข. ให้เติมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และปิดด้วยจุกยาง (สารละลายบัฟเฟอร์ ประกอบไปด้วย Tris – HCL pH 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, ACC ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (v/v), glycerol ความเข้มข้นร้อยละ 10 (v/v), DTT ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์, แอสคอร์เบต ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์, $FeSO_4$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และ $NaHCO_3$ ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วจึงเก็บตัวอย่างก๊าซเอทิลีนไปทำการหาปริมาณการผลิตเอทิลีน แล้วจึงนำไปคำนวณกลับเป็นค่ากิจกรรมของ ACC oxidase ตามสมการข้างล่าง

กิจกรรมของ ACC oxidase = nl ethylene / g . h of tissue incubated in reaction buffer

3.3.6 อายุการปักแจกัน (วัน)

โดยนับจำนวนวันตั้งแต่เริ่มปักแจกัน จนกระทั่งดอกเยอบีราหมดอายุการใช้งาน โดยพิจารณาจากสภาพกลีบดอกที่แสดงอาการเหี่ยว และก้านดอกหักพับลง และต้องมีการหมดอายุการใช้งานร้อยละ 50 ของจำนวนดอกทั้งหมดจึงถือว่าหมดอายุการปักแจกัน

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)