

## บทที่ 3

### วิธีการวิจัย

#### 3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

##### วัสดุ

##### พืชทดลอง

ฝักกล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อน อายุประมาณ 7 เดือน หลังการผสมเกสร

##### วัตถุดิบ

วัตถุดิบการเตรียมโคโคซาน ได้แก่ แแกนหมักสด จากบริษัทเทพพิทักษ์ จำกัด จังหวัดปทุมธานี

##### อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร
  - 1.1 เครื่องแก้วต่าง ๆ ได้แก่ บีกเกอร์ (beaker) ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ไปเปต (pipette) แท่งแก้วคน (stirring rod)
  - 1.2 เครื่องชั่ง (balance) ทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
  - 1.3 กระดาษชำระ
  - 1.4 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
  - 1.5 เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven)
  - 1.6 หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)
  - 1.7 ขวดสำหรับบรรจุสารละลายอาหารที่เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น (stock solution)
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการย้ายเลี้ยง
  - 2.1 ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (Laminar air-flow cabinet)
  - 2.2 อุปกรณ์สำหรับถ่ายเนื้อเยื่อ ได้แก่ จานเพาะเชื้อ (Petri dish) มีดผ่าตัด ปากคีบ (forceps)
  - 2.3 ขวดสเปรย์แอลกอฮอล์
3. อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องวางเลี้ยงเนื้อเยื่อ
  - 3.1 ชั้นวางเลี้ยงที่ติดหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent)
  - 3.2 เครื่องควบคุมเวลา
  - 3.3 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (air conditioner)
4. สารเคมี
  - 4.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Vacin และ Went (1949)

- 4.2 สารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส (sucrose)
- 4.3 สารที่ไม่ออกฤทธิ์ ได้แก่ ผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal)
- 4.4 สารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อ ได้แก่ เอทานอล ความเข้มข้น 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ และคลอโรกซ์ (Clorox)
- 4.5 สารเคมีที่ใช้ปรับความเป็นกรด-ด่าง ของอาหาร คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มอล
- 4.6 ผงวุ้น
- 4.7 น้ำกลั่น
5. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการนำต้นกล้ากล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อนออกปลูก
  - 5.1 ต้นกล้ากล้วยไม้เขากวางอ่อน
  - 5.2 โรงเรือน
  - 5.3 ภาชนะปลูก ได้แก่ ตะแกรงพลาสติก
  - 5.4 วัสดุปลูก ได้แก่ ถ่าน

### 3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมแกนหมึก เพื่อผลิตไคโตซาน ดัดแปลงจากวิธีของ Alimunair และ Zainuddin (1992)

3.2.1.1 แกนหมึกสดได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเทพพิทักษ์ จำกัด จังหวัดปัตตานี

3.2.1.2 นำแกนหมึกสด 100 กรัม มาล้างทำความสะอาด หลังจากนั้นนำมาผ่านกระบวนการแยกโปรตีนออก โดยแช่ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ แล้วล้างน้ำให้หมดค้าง โดยวัดด้วยกระดาษวัด pH ให้อยู่ในสภาพเป็นกลาง จากนั้นนำมาแยกเกลือแร่ออก โดยต้มกับกรดไฮโดรคลอริก 4 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นล้างน้ำ แล้วทำให้แห้ง จะได้เป็นไคติน และนำมาทำปฏิกิริยาลดหมู่อะซีทิล โดยใช้ค่าความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างน้ำแล้วทำให้แห้ง จะได้ไคโตซาน 20 กรัม คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ (w/w)

3.2.1.3 การตรวจวัดระดับการกำจัดหมู่อะซีทิลโดยวิธี IR spectrometer เมื่อได้ไคโตซานแล้วนำมาหาความบริสุทธิ์ นำไคโตซานบดเป็นผง และละลายในกรดอะซีติก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 1 คืน จะได้แผ่นฟิล์มของไคโตซาน นำไปละลายด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดความเป็นด่าง โดยทดสอบด้วยกระดาษวัด pH และล้างครั้งสุดท้ายด้วยเอทานอล จากนั้นนำแผ่นฟิล์มไคโตซานไปใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 1 คืน แล้วจึงนำไปวัดด้วยเครื่อง FT-IR spectrometer และคำนวณหา % N-deacetylation

3.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อน

3.2.2.1 นำฝักกล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อน ล้างด้วยน้ำสะอาด 1-3 ครั้ง จากนั้นนำฝักกล้วยไม้จุ่มในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วผ่านเปลวไฟฆ่าเชื้อ ทำซ้ำ 3 ครั้ง วางฝักกล้วยไม้บนจานเพาะเชื้อ หลังจากนั้นตัดฝักกล้วยไม้เป็น 2 ท่อนตามขวางและผ่าตรงกลางฝัก ใช้ปลายมีดเขี่ยเมล็ดลงในขวดอาหารสูตร VW วางเลี้ยงในห้องวางเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน จนออกเป็นระยะโพรโทคอร์ม

3.2.2.2 นำกล้วยไม้ที่อยู่ในระยะโพรโทคอร์มที่ได้จากการเพาะเมล็ดในอาหารสูตร VW อายุ 12 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารสูตร VW ในสภาพอาหารเหลว โดยเติมไคโตซานที่เตรียมได้ในข้อ 3.2.1 (การเตรียมสารละลายเข้มข้นไคโตซานเพื่อเติมลงในอาหาร คูในภาคผนวก) เติมนลงในอาหารความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ได้แก่ 5, 10, 15, 20, 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่ไม่เติมไคโตซาน นำไปวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที ในสภาวะความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ชั่งน้ำหนักสดที่เปลี่ยนแปลงไป และลักษณะทางกายภาพ โดยน้ำหนักสดเริ่มต้นใช้ 0.6 กรัม สำหรับในสภาพอาหารแข็งนำโพรโทคอร์ม อายุ 12 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารสูตร VW ในสภาพอาหารแข็ง โดยเติมไคโตซานที่เตรียมได้ในข้อ 3.2.1 เติมนลงในอาหารความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ได้แก่ 5, 10, 15, 20, 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่ไม่เติมไคโตซาน นำไปวางเลี้ยงในสภาวะความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนใบ จำนวนราก จำนวนหน่อ ชั่งน้ำหนักสด และสังเกตลักษณะทางกายภาพ เช่น สี และถ่ายภาพ

3.2.2.3 เมื่อได้ต้นกล้ากล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อนแล้ว ย้ายเลี้ยงลงในวัสดุปลูกที่เป็นถ่าน โดยการรดด้วยสารละลายไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 5 10 15 20 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่ไม่รดด้วยไคโตซาน บันทึกผลการทดลองโดยการบันทึกผลความมีชีวิตรอดของต้นกล้วยไม้หลังจากการปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำมาหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอด} = \frac{\text{จำนวนต้นที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมดที่ย้ายปลูก}} \times 100$$

และสังเกตลักษณะทางกายภาพ เช่น สี และถ่ายภาพ

### 3.2.3 การวางแผนการทดลอง และวิเคราะห์ผลการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยใช้จำนวนตัวอย่าง 30 ตัวอย่างต่อการทดลอง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)