

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องเลี้ยงแมลง (insectarium) บริเวณอาคารฝึกปฏิบัติงานสาขาภิบาล คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับเพาะเลี้ยงยุง
2. ห้องปฏิบัติการภาควิทยาศาสตร์สาขาภิบาล คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วัสดุและวิธีการวิจัย

1. ลูกน้ำยุงลายชนิด Aedes aegypti ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 ลูกน้ำยุงลายจากสนาม

สุ่มเก็บลูกน้ำยุงลายจากหมู่บ้านในจังหวัดต่าง ๆ ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 5 จังหวัด โดยวิธีการสุ่มเลือกจากหมู่บ้านที่ขึ้นเป็นสถานที่ฝึกปฏิบัติงานของนักศึกษาคณะสาธารณสุขศาสตร์ ที่มีประวัติการใช้สารเคมีอะเบทอยู่แล้ว จำนวน 5 หมู่บ้าน ดังนี้

- 1) บ้านโคกสูง ต.ดงลาน อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด
- 2) บ้านเสียว ต.ห้วยจั่ว อ.ยางตลาด จ.กาฬสินธุ์
- 3) บ้านนายางใต้ ต.ภูกระดัง อ.ภูกระดัง จ.เลย
- 4) บ้านทุ่งนางรอก อ.สหัสขันธ์ จ.ยโสธร
- 5) บ้านสร้างหิน ต.นาราชควาย อ.เมือง จ.นครพนม

ลูกน้ำยุงลายที่เก็บได้ จะนำมาคัดแยกเอาเฉพาะลูกน้ำยุงลายชนิด Ae. aegypti จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในห้องเลี้ยงแมลง (insectarium) เพื่อใช้ทดลองต่อไป

1.2 ลูกน้ำยุงลายสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ

ลูกน้ำยุงลายที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบหาความต้านทาน ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการของศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ พันธุ์วัฒนา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ ลูกน้ำยุงลายนี้เป็นยุงสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ ซึ่งเพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลานานหลายรุ่น ปราศจากความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงใด ๆ

2. สารเคมีที่ใช้ทดลอง

อะเบท (0,0,0',0'-tetramethyl 0,0'-thiodi-p-phenylene phosphorothioate) ได้รับความสนับสนุนจากบริษัทขายสารเคมีฆ่าแมลง นำมาใช้สำหรับการเตรียมสารละลายมาตรฐาน (standard solution) เพื่อใช้ทดลองต่อไป

3. การฟักไข่ (hatching) และเลี้ยงลูกน้ำยุงที่ใช้ในการทดลอง (rearing of larvae)

น้ำไข่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยุง ทั้งที่เก็บจากสนามและสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ จะนำมาฟักใน Buchner flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ภายใต้ความดันที่ปรับให้ต่ำลง เพื่อให้ลูกน้ำยุงที่ฟักออกมาจากไข่รุ่นที่ 1 (F₁ generation) มีอายุที่เท่ากัน (uniform age) นำลูกน้ำยุงเหล่านี้ไปเลี้ยงต่อในกาละมังพลาสติก และเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงสุนัข (dog chow) ที่บดละเอียด เมื่อลูกน้ำเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะที่ 4 ตอนต้น (early fourth instar larvae) ก็นำไปใช้ในการทดลอง

4. การทดลอง (bioassay)

การทดลองนี้ ใช้วิธีการทดสอบความต้านทานสารพิษฆ่าแมลงขององค์การอนามัยโลก (WHO, 1981) กล่าวโดยย่อคือ เตรียม Beaker ขนาด 300 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น (distilled water) ปริมาณ 250 มิลลิลิตร แล้วเตรียมความเข้มข้นของอะเบทในการทดสอบเป็น 5 ความเข้มข้น คือ 0.00008, 0.0004, 0.002, 0.01 และ 0.05 มิลลิกรัม/ลิตร โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานของอะเบทปริมาณที่ต้องการลงในแต่ละ Beaker จากนั้นคนให้เข้ากันอย่างดีด้วยแท่งแก้วเป็นเวลา 30 วินาที สำหรับ

Beaker ที่ใช้ควบคุม (control) เตรียมโดยวิธีการที่คล้ายกัน ไม่ใส่อะเบทแต่เติมด้วยเอทานอล (ethanol) 1 มิลลิลิตรแทน

สำหรับช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ นั้น ทราบจากการทดสอบเบื้องต้น ซึ่งเตรียมในลักษณะเดียวกันนี้ เมื่อเตรียมความเข้มข้นต่างๆ แล้ว จึงคัดลูกน้ำยุงลายระยะที่ 4 ตอนต้นใส่ลงในแต่ละ Beaker โดยเลือกขนาดที่เท่ากัน จากนั้นใส่ผงอาหารเลี้ยงเชื้อเล็กน้อย เพื่อให้เป็นอาหารลูกน้ำ การทดลองครั้งนี้ในแต่ละความเข้มข้นทำเป็น 4 ซ้ำ (replicates) ทำการบันทึกจำนวนการตายของลูกน้ำยุงในแต่ละความเข้มข้น เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์โดยทำ Probit Analysis ด้วยคอมพิวเตอร์โดยโปรแกรม QUANTX-13 (Zhung-Ming and Finney, 1994)