บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตน้ำสกัดชีวภาพจากเศษผักโดยออกแบบการทดลองการออกแบบสุ่มสมบูรณ์(Completely Random Design) จากการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ กากน้ำตาล น้ำตาลทรายแดง และน้ำตาลทรายขาว โดยศึกษาปริมาณธาตุอาหาร ได้แก่ ไนโตรเจน(N) ฟอสฟอรัส(P) และโพแทสเซียม(K) ศึกษากรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลคติก(Lactic acid) กรดแอซีติก(Acetic acid) กรดบิวทีริก (Butyric acid) และกรดโพรพิออนิก (Propionic acid) ศึกษาปริมาณฮอร์โมนพืช ได้แก่ จิบเบอเรลลิน (Gibberellins : GA3) และกรดอินโดล-3-แอซีติก (Indole-3-acetic acid : IAA) ศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ ได้แก่ Mesophillic microorganisms และThermophillic microorganisms รวมทั้งศึกษาผลของน้ำสกัดชีวภาพต่อการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความสูงและความยาวราก โดยมีลำดับขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัยดังนี้

3.1 การทำน้ำสกัดชีวภาพ

3.1.1 วัตถุดิบและอุปกรณ์

1) เศษผัก ทำการเก็บตัวอย่างเศษผักจากพื้นที่ ต.บึงพระ อ.เมือง จ.พิษณุโลก ซึ่งเป็นผักที่เกษตรกรปลูกในพื้นที่ เช่น ผักคะน้า และ ผักกวางตุ้ง โดยนำเศษผักมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดความยาว 1-2 นิ้ว เพื่อให้เกิดกระบวนการย่อยสลายเร็วขึ้น

2) แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ กากน้ำตาล น้ำตาลทรายแดง และน้ำตาลทรายขาว ซึ่งเป็นตัวเร่งจุลินทรีย์ในธรรมชาติให้ทำการย่อยสลายสารอินทรีย์เร็วยิ่งขึ้น โดยกากน้ำตาลที่ใช้ในการทดลองซื้อมาจากร้านค้าและโรงงานน้ำตาลในเขต จ.พิษณุโลก

3) ถังหมัก เป็นถังพลาสติกความจุ 20 ลิตร มีฝาปิด โดยทำการเจาะรูด้านข้างถังช่วงล่างแล้วใส่ก๊อกปิดเปิดน้ำ ซึ่งจะสวมตาข่ายเพื่อป้องกันเศษผักอุดตัน

3.1.2 การดำเนินการทดลอง

1) นำเศษผักที่หั่นแล้วมาหมักกับแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ ได่แก่ กากน้ำตาล น้ำตาลทรายแดง และน้ำตาลทรายขาว อย่างละ 3 ถัง ในอัตราเศษผักต่อแหล่งอาหารของจุลินทรีย์เท่ากับ 3:1 โดยชั่งเศษผัก 6 กิโลกรัม และชั่งแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ 2 กิโลกรัม แล้วเท

ผสมลงในถังหมักคลุกเคล้าให้เข้ากันจนทั่ว แล้วปิดฝา ทำการทดลองในอัตราส่วนเดียวกัน จำนวน 4 ถัง โดยทำการหมักเป็นระยะเวลา 1 เดือน

2) เก็บตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพจากถังหมักทั้ง 4 ถัง ทุก ๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 30 วัน โดยเก็บถังละ 200 มิลลิลิตร โดยทำการเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ เพื่อมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีต่อไป

3.2 การวิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าการนำไฟฟ้า

โดยเครื่องมือ pH – meter รุ่น MP 220 Mettler Toledo, Germany และเครื่อง electrical conductivity meter (EC meter)

วิธีการทดลอง

1) ใช้น้ำกลั่นล้างแท่งแก้วอิเล็คโทรด ซับน้ำให้แห้ง
2) ปรับเครื่องมือให้ได้ค่ามาตรฐานตามคำแนะนำในคู่มือ
3) ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างอิเล็คโทรดอีกครั้ง ซับน้ำให้แห้ง
4) นำแท่งแก้วอิเล็คโทรดจุ่มลงในตัวอย่างน้ำหมัก โดยทำการแกว่งแล้วทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที หรือรอจนค่าคงที่ แล้วทำการอ่านค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิและค่าการนำไฟฟ้า

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์

โดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC , Shimadzu, Japan) ประกอบด้วย

1) ปั๊ม (Pump) รุ่น LC-10 ADVP Low pressure gradient system
2) หน่วยตรวจวัดสัญญาณ การดูดกลืนแสงUV-VIS Detector) รุ่น SPD-10 AVP
3) เครื่องบันทึกสัญญาณและหน่วยประมวลผล(Recorder/Integrator)รุ่นSCL-10
4) คอลัมน์ (Column) HPLC pack column รุ่น Inertial C18 (4.6x150 mm)

สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการทดลอง

Column	:	Reversed phase ; C_{18} 4.6 x 150 mm
Detector	:	UV detector ความยาวคลื่น 210 nm
Flow rate	:	0.8 ml/min
Mobile phase	:	H_2SO_4 0.01 N 70% : CH_3OH 30%

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1) เมทานอล (Methanol ; CH_3OH) HPLC grade, 99.9%, Lab-scan, Ireland

2) กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid; H_2SO_4)AR grade, 97 % MERCK, Germany

3) กรดแลคติก(Lactic acid;$CH_3CHOHCOOH$)AR grade, Ajax Finechem ,Australia

4) กรดแอซีติก (Acetic acid; CH_3COOH) AR grade, MERCK, Germany

5) กรดโพรพิออนิก (Propionic acid ; $C_3H_6O_2$) AR grade, $\geq$ 99.0 %Fluka, Germany

6) กรดบิวทีริก (Butyric acid ; $C_4H_8O_2$) AR grade, $\geq$ 98.0 % Fluka, Germany

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (กรมวิชาการเกษตร, 2546)

เครื่องมือ

1) ชุดเครื่องย่อย (Digestion Unit รุ่น 426 , Buchi, Switzerland)

2) ชุดกลั่นแอมโมเนีย (Distillation Unit รุ่น B-316 , Buchi, Switzerland)

3) ชุดไทเทรต

สารเคมี

1) น้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนีย

2) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ : ละลาย 240.00 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

3) สารละลายกรดบอริค : ละลาย 20.00 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

4) สารละลายอินดิเคเตอร์ผสมสำเร็จรูป

5) สารละลายกรดซัลฟิวริก 0.01 N

6) กรดซัลฟูริคเข้มข้น

7) สารเร่งปฏิกิริยาสำเร็จรูป (Catalyst)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

วิธีวิเคราะห์

1) การย่อย (Digestion) มีหลักการคือ การเปลี่ยนสารอินทรีย์ไนโตรเจนในสารตัวอย่างให้เป็นแอมโมเนีย โดยปิเปตน้ำหมักมา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในชุดย่อย เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 10 มิลลิลิตร เติมสารเร่งปฏิกิริยา ลงไปประมาณ 1.0 กรัม ย่อยนานประมาณ 2-3 ชั่วโมง หรือจนสารละลายเป็นสีเหลืองใส ทิ้งไว้จนหมดเย็น

2) การกลั่น (Distillation) คือการเปลี่ยนสภาพแอมโมเนียไนโตรเจนของสารตัวอย่างให้เป็นเกลือไนโตรเจน จากนั้นทำสารละลายให้เป็นด่างโดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 70 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร สารละลายจะถูกเปลี่ยนสภาพเป็นก๊าซแอมโมเนียที่สามารถระเหยได้ เมื่อทำการกลั่น แอมโมเนียที่ถูกกลั่นออกมาเป็นไอจะผ่านเข้าไปควบแน่น แล้วถูกจับด้วยกรดบอริกที่ผสมด้วยอินดิเคเตอร์ 3-5 หยด โดยสารละลายที่ได้จะเป็นสีเขียวแกมน้ำเงิน

3) การไทเทรต (Titration) ด้วยกรดซัลฟูริค 0.01 N จนกระทั่งสีเขียวของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง

4) ทำแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างน้ำหมัก และทำทุกขั้นตอนตั้งแต่ข้อ 1 ถึงข้อ 3

5) การคำนวณ

6) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด %(TKN) = $\frac{14\times N\times(T-B)}{V \text{ of sample}}$

T = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของกรดที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่างน้ำหมัก

B = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของกรดที่ใช้ในการไทเทรตแบลงค์

N = normality of H_2SO_4

14 = equivalent weight of nitrogen

3.5 การวิเคราะห์ฟอสฟอรัส

โดยเครื่องมือยูวี- วิสิเบิล สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS Spectrophotometer : รุ่น UV-1601 Shimadzu, Japan)

สารเคมี

1) สารละลายแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (NH_4F) 1 N

2) สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.5 N

3) น้ำยาสกัด เตรียมโดยผสม 1 N NH_4F 30.00 มิลลิลิตร กับ 0.5 N HCl 200.00 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

4) น้ำยา Develop สี

1. ชั่ง Ammonium heptamolybdate $[(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O]$ 12.00 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร

2. ชั่ง Potassium antimony tartrate ($KSbOC_4H_4O_5$) 0.2908 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายกรดซัลฟิวริก 5.0 N : ปิเปต 139.00 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

4. เทน้ำยาในข้อ 1. และ 2. ลงในสารละลายข้อ 3. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ

กลั่นให้เป็น 2,500 มิลลิลิตร

5. สารละลายกรดแอสคอร์บิก เตรียมโดย ละลาย 1.0560 กรัม ลงในสารละลายข้อ 4. แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร เก็บไว้ได้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง

6. Carrez I solution เตรียมโดยละลาย Potassium hexacyanoferrate (III) 10.6000 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

7. Carrez II solution ละลาย Zinc acetate 22.00 กรัม ในน้ำกลั่น เติมกรดแอซิติก 3.20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

8. สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 1,000 ppm (สำเร็จรูป)

วิธีการทดลอง

1) ปิเปตน้ำสกัดชีวภาพมา 5.00 มิลลิลิตร เติม Carrez I และ Carrez II อย่างละ 1.00 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร เขย่านาน 4-5 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 41

2) ปิเปตสารละลายที่ผ่านการกรองมา 5.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายกรดแอสคอร์บิก 5.00 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที จะได้สารละลายสีน้ำเงิน

3) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสความเข้มข้น 0.4, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2 และ 4.0 ppm โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 100 ppm มา 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, และ 1.00 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายกรดแอสคอร์บิก 5.00 มิลลิลิตร ลงไปทุกขวด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 25 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที จะได้สารละลายสีน้ำเงิน

4) นำสารละลายตัวอย่างน้ำหมักไปวัดเทียบสีกับสารละลายมาตรฐาน ด้วยเครื่องยูวี- วิสิเบิล สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 825 นาโนเมตร

3.6 การวิเคราะห์โพแทสเซียม

โดยเครื่องมือ Inductively Coupled Plasma Spectroscopy (ICPS)

สารเคมี

1) กรดไนทริก 1 %

2) สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียม

วิธีวิเคราะห์

1) เตรียมตัวอย่างน้ำหมัก

ปิเปตน้ำตัวอย่าง 10.00 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม

กรดไนทริกเข้มข้นลงไป 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปย่อยด้วยเตาไฟฟ้า จนเหลือปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดไนทริก 1 % จนครบ 50 มิลลิลิตร นำไปแช่เย็นไว้เพื่อรอการวิเคราะห์

2) เตรียมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียม

ปิเปตสารมาตรฐานโพแทสเซียมความเข้มข้น 1,000 ppm มา 100, 200, 300, 400 และ 500 µl ตามลำดับ ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยกรดไนทริก 1 % จนครบปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 ppm ตามลำดับ

3.7 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Mesophillic Microorganism โดยวิธีนับโคโลนีในจานเพาะเชื้อมาตรฐาน (Standard Plate Count) ซึ่งบ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30°C) และการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Thermophillic Microorganism โดยวิธีนับโคโลนีในจานเพาะเชื้อมาตรฐาน (Standard Plate Count) ซึ่งบ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 55-60°C ตาม Standard Method โดยการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเป็นเทคนิคการทำให้เชื้อหรือตัวอย่างเจือจางลง (Dilution) ด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือ 0.85 % (Normal Saline) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว การทำให้เชื้อเจือจางเพื่อให้มีการเจริญของโคโลนีเดี่ยวๆ ของจุลินทรีย์จำนวนที่เหมาะสม ซึ่งความเจือจางที่เหมาะสม ควรเป็นความเจือจางที่มีโคโลนีของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 30-300 โคโลนี โดยปกติจะทำให้เจือจางเพิ่มขึ้นครั้งละ 10 เท่าเป็นลำดับ (Ten Fold Serial Dilution) เพื่อให้ง่ายต่อการปฏิบัติ และการคำนวณจำนวนโคโลนีต่อหน่วยนับ (กรัมหรือมิลลิลิตร)

อุปกรณ์

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) หรือ Plate Count Agar (PCA)
2) จานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว
3) น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว บรรจุขวดละ 99 มิลลิลิตร
4) ปิเปตที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

วิธีวิเคราะห์

การทำความเจือจางน้ำตัวอย่าง

1) ปิเปตน้ำตัวอย่าง ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 99 มิลลิลิตร จะได้ความเจือจาง 1:10 เขย่าให้เข้ากันดีประมาณ 25 ครั้ง

2) ใช้ปิเปตดูดเชื้อที่ทำเจือจาง 1:10 เพื่อทำความเจือจางที่จะนำมาใช้ กรณีการนับจำนวนแบคทีเรียมักใช้ความเจือจาง $1:10^3 - 1:10^{10}$

2.1 ดูดเชื้อที่ความเจือจาง 1:10 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 99 มิลลิลิตร จะได้ความเจือจางเท่ากับ $1:10^3$ เขย่าให้เข้ากันดี

2.2 ดูดเชื้อที่ความเจือจาง $1:10^3$ จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 99 มิลลิลิตร จะเท่ากับความเจือจางเท่ากับ $1:10^4$

2.3 ดูดเชื้อที่ความเจือจาง $1:10^4$ จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 99 มิลลิลิตร จะเท่ากับความเจือจางเท่ากับ $1:10^5$

2.4 ดูดเชื้อที่ความเจือจาง $1:10^5$ จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 99 มิลลิลิตร จะเท่ากับความเจือจางเท่ากับ $1:10^6$

2.5 ทำความเจือจางจนถึงระดับความเจือจางที่มีโคโลนีของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 30-300 โคโลนี โดยทำตามข้อ 2.1 เปลี่ยนความเจือจางไปเรื่อยๆ

3) การเทอาหารและผสมเชื้อในจานเพาะเชื้อ

3.1 หลอมอาหาร NA แล้ววางไว้ให้เย็นลงประมาณ 45 องศาเซลเซียส

3.2 ดูดเชื้อที่ความเจือจางที่ต้องการ 3 ความเจือจาง ความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ความเจือจางละ 2 จาน

3.3 เทอาหารจาก ข้อ 3.1 ลงในจานเพาะเชื้อทั้งหมดใน ข้อ 3.2 แล้วหมุนจานตามเข็มนาฬิกา 5 รอบ ทวนเข็มนาฬิกา 5 รอบ ทวนเข็มนาฬิกา 5 รอบ เคลื่อนจานขึ้น ลง 5 ครั้ง และเคลื่อนจานไปซ้าย ขวา อีก 5 ครั้ง (shake plate) เพื่อให้เชื้อผสมและกระจายทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ วางไว้จนอาหารเย็นและวุ้นแข็งตัว

3.4 นำไปบ่มโดยการกลับด้านล่างจานเพาะเชื้อไว้ข้างบน (สำหรับแบคทีเรีย) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

4) การตรวจผล

4.1 การนับจำนวนโคโลนีให้เลือกชุดจานเพาะเชื้อ ที่มีจำนวนโคโลนีเจริญอยู่ประมาณ 30-300 โคโลนี จากความเจือจางเดียว ถ้าทำ 2 จาน (Replicate) ในแต่ละความเจือจาง ให้รวมจำนวนโคโลนี ของทั้ง 2 จาน แล้วหารด้วย 2 จะเท่ากับจำนวนเฉลี่ยของโคโลนีที่นับได้ต่อ 1 ความเจือจางต่อจาน

4.2 คำนวณจำนวนโคโลนีต่อตัวอย่างวัสดุ 1 กรัม หรือ 1 มิลลิลิตร ได้ดังนี้ หาจำนวนโคโลนีในแต่ละจานเพาะเชื้อ และคูณด้วยการเจือจาง (dilution) แล้วนำมาเฉลี่ย

สมมุติว่า จำนวนของโคโลนีแบคทีเรียเท่ากับ 99.9 โคโลนี นับได้ที่ความเจือจาง $1:10^5$ ดังนั้น จำนวนโคโลนีต่อตัวอย่างวัสดุ 1 กรัม หรือ 1 มิลลิลิตร คำนวณได้ดังนี้

ตัวอย่างวัสดุ $1x10^5$ กรัม นับแบคทีเรียได้ = 99.9 โคโลนี

วัสดุ 1 กรัม นับแบคทีเรียได้ = 99.9×10^5 โคโลนี

= 9.99×10^6 โคโลนี

รายงานในหน่วย CFU (Colony Forming Unit) ต่อกรัมหรือต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง

3.8 การทดสอบประสิทธิภาพน้ำสกัดชีวภาพที่มีผลต่อผักกวางตุ้ง

3.8.1 การทดลอง

เลือกน้ำสกัดชีวภาพที่มีคุณสมบัติเหมาะสม โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่ม (Completely randomized design) จำนวน 4 การทดลอง (treatment) แต่ละการทดลองใช้น้ำสกัดชีวภาพที่ระยะเวลาในการหมักแตกต่างกัน คือ 7, 14, 21 และ 30 วัน ในแต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ ๆละ 20 ต้น รวม 160 ต้น โดยในแต่ละการทดลองดำเนินการดังนี้

1) ปลูกผักกวางตุ้งที่ใช้ทดลองกับน้ำสกัดชีวภาพ 2 ซ้ำ ๆละ 20 ต้น

2) มีชุดควบคุม (control) โดยไม่ใช้น้ำสกัดชีวภาพ จำนวน 2 ซ้ำ ๆละ 20 ต้น

3) ใช้น้ำสกัดชีวภาพที่เจือจางในอัตราส่วน น้ำสกัดชีวภาพ ต่อ น้ำ เท่ากับ 1 :500 โดยทำการรดผัก เช้า (08.00 น.) และเย็น (17.30 น.)

4) เก็บเกี่ยว เมื่อผักกวางตุ้งครบ 45 วัน

3.8.2 รวบรวมข้อมูล เมื่อปลูกครบ 45 วัน ทำการชั่งน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง เพื่อหาน้ำหนักสุทธิ (กรัม/ต้น) วัดความยาวราก (เซนติเมตร) และส่วนสูง(เซนติเมตร) หาค่าเฉลี่ยบันทึกผล

3.8.3 วิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างในการให้ผลผลิต คิดเป็นค่าเฉลี่ยของ น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความยาวราก และความสูง วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way analysis of variance) ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย t-test