บทที่ 4

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ในการเตรียมต้นกล้าที่สมบูรณ์ของหญ้ารูซี่และหญ้าอะตราตัม

1. การหาความบริสุทธิ์ของเมล็ด

ตารางที่ 4.1 แสดงน้ำหนักเมล็ดขั้นต่ำที่ใช้ในการคัดความบริสุทธิ์ โดยใช้เมล็ดหญ้ารูซี่ จำนวน 150 กรัมและหญ้าอะตราตัม จำนวน 100 กรัม เป็นเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากแปลงเมล็ดพันธุ์ของศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ขอนแก่น ในแต่ละครั้งแบ่งตัวอย่างเมล็ดหญ้ารูซี่และหญ้าอะตราตัม น้ำหนักประมาณ 15 และ 7 กรัม ตามลำดับ มาทดสอบความบริสุทธิ์

ตารางที่ 4.1 วิธีการทดสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดหญ้ารูซี่ และหญ้าอะตราตัม

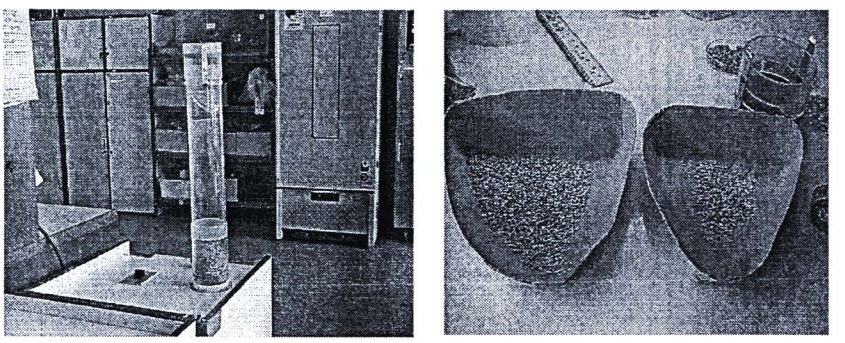
ชนิดเมล็ด	น้ำหนักเมล็ดขั้นต่ำที่ใช้ในการคัดความบริสุทธิ์ (กรัม)	
	น้ำหนักที่ใช้ทั้งหมด (กรัม)	น้ำหนักที่ใช้ทดสอบความบริสุทธิ์ (กรัม)
หญ้ารูซี่	150	15
หญ้าอะตราตัม	100	7

ตารางที่ 4.2 ผลการหาความบริสุทธิ์ของเมล็ดหญ้ารูซี่และหญ้าอะตราตัม

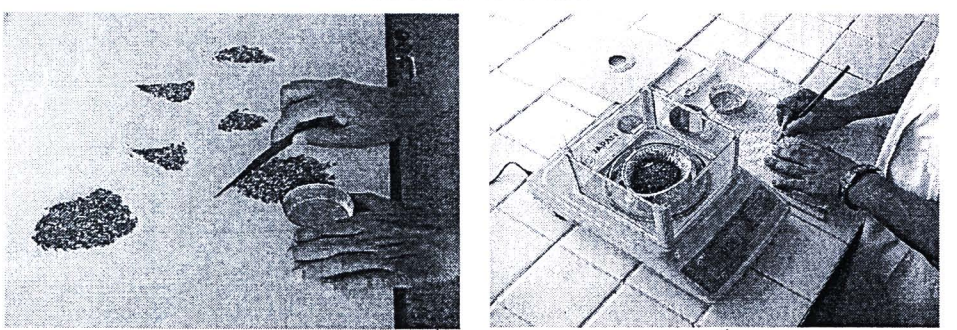
ส่วนประกอบ	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3		**เฉลี่ย**
1. หญ้ารูซี่	น้ำหนักเริ่มต้น 3.268 กรัม		น้ำหนักเริ่มต้น 3.174 กรัม		น้ำหนักเริ่มต้น 3.512 กรัม		% โดยนน.
	น้ำหนัก (กรัม)	%	น้ำหนัก (กรัม)	%	น้ำหนัก (กรัม)	%	
- สิ่งเจือปน	0.035	1.07	0.031	0.98	0.039	1.11	1.05
- เมล็ดพันธุ์พืชอื่น	-	-	-	-	-	-	-
- เมล็ดพันธุ์แท้	3.208	98.16	3.112	98.04	3.451	98.26	**98.15**
2. หญ้าอะตราตัม	น้ำหนักเริ่มต้น 1.531 กรัม		น้ำหนักเริ่มต้น 1.818 กรัม		น้ำหนักเริ่มต้น 1.338 กรัม		
	น้ำหนัก (กรัม)	%	น้ำหนัก (กรัม)	%	น้ำหนัก (กรัม)	%	
- สิ่งเจือปน	0.053	3.46	0.066	3.63	0.051	3.81	3.63
- เมล็ดพันธุ์พืชอื่น	-	-	-	-	-	-	-
- เมล็ดพันธุ์แท้	1.473	96.21	1.748	96.15	1.284	95.96	**96.11**

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการหาความบริสุทธิ์ของเมล็ดหญ้ารูซี่ และหญ้าอะตราตัม โดยการนำเมล็ดพันธุ์หญ้าทั้งหมดที่ต้องการใช้มาเป่าด้วยเครื่องเป่าระบบแรงลม จากนั้นนำเมล็ดมาคัดแยกด้วยมืออีกครั้ง สุ่มแบ่งตัวอย่าง ชั่งน้ำหนัก แล้วทำการคัดแยกออกเป็นส่วนต่างๆ คือ สิ่งเจือปน เมล็ดพันธุ์พืชอื่น และเมล็ดพันธุ์แท้ พร้อมทั้งชั่งน้ำหนักแต่ละส่วน ดังภาพที่ 4.1 แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ พบว่า ความบริสุทธิ์โดยเฉลี่ยของเมล็ดหญ้ารูซี่ และหญ้าอะตราตัม คือ 98.15 และ 96.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

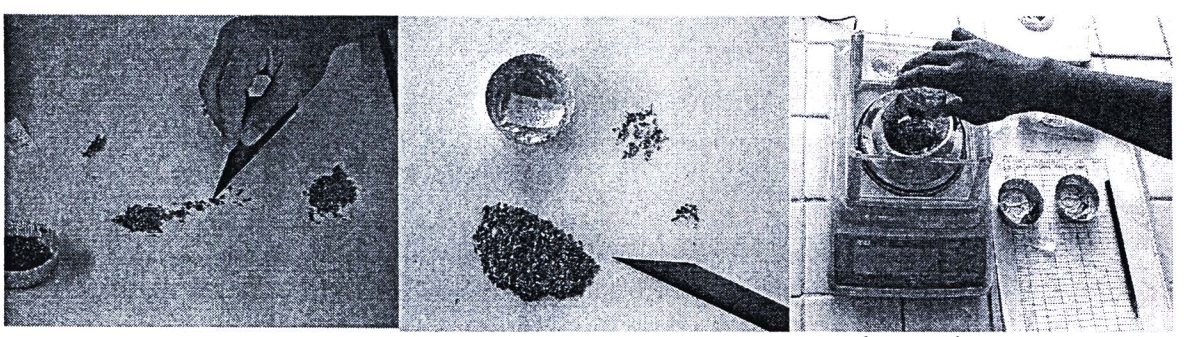
การร่อนเศษผงออกด้วยตะแกรง



การเป่าโดยใช้แรงลม



แบ่งตัวอย่างเมล็ดจนได้น้ำหนักตามที่กำหนด ชั่งน้ำหนัก



นำมาคัดแยกออกเป็นส่วนต่างๆ คือ เมล็ดพันธุ์แท้ เมล็ดพันธุ์พืชอื่น และสิ่งเจือปน
พร้อมทั้งชั่งน้ำหนักในแต่ละส่วน

ภาพที่ 4.1 ขั้นตอนการทดสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ด

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

2. ผลการศึกษาอัตราการงอกของเมล็ด

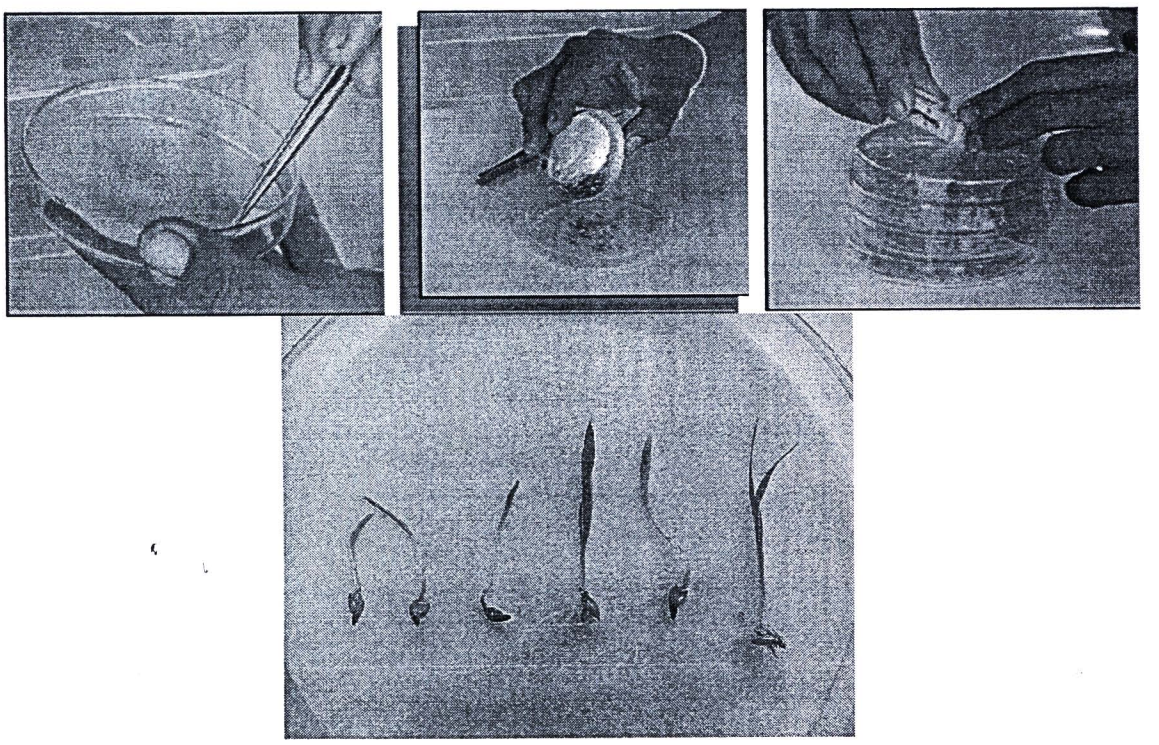
นำเมล็ดพันธุ์แท้ของหญ้ารูซี่ และหญ้าอะตราตัม ที่ผ่านการคัดความบริสุทธิ์เรียบร้อยแล้ว มาศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสม สำหรับการเพาะเพื่อให้ได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ โดยกำหนด Treatments ดังนี้

2.1 ลักษณะการเพาะ

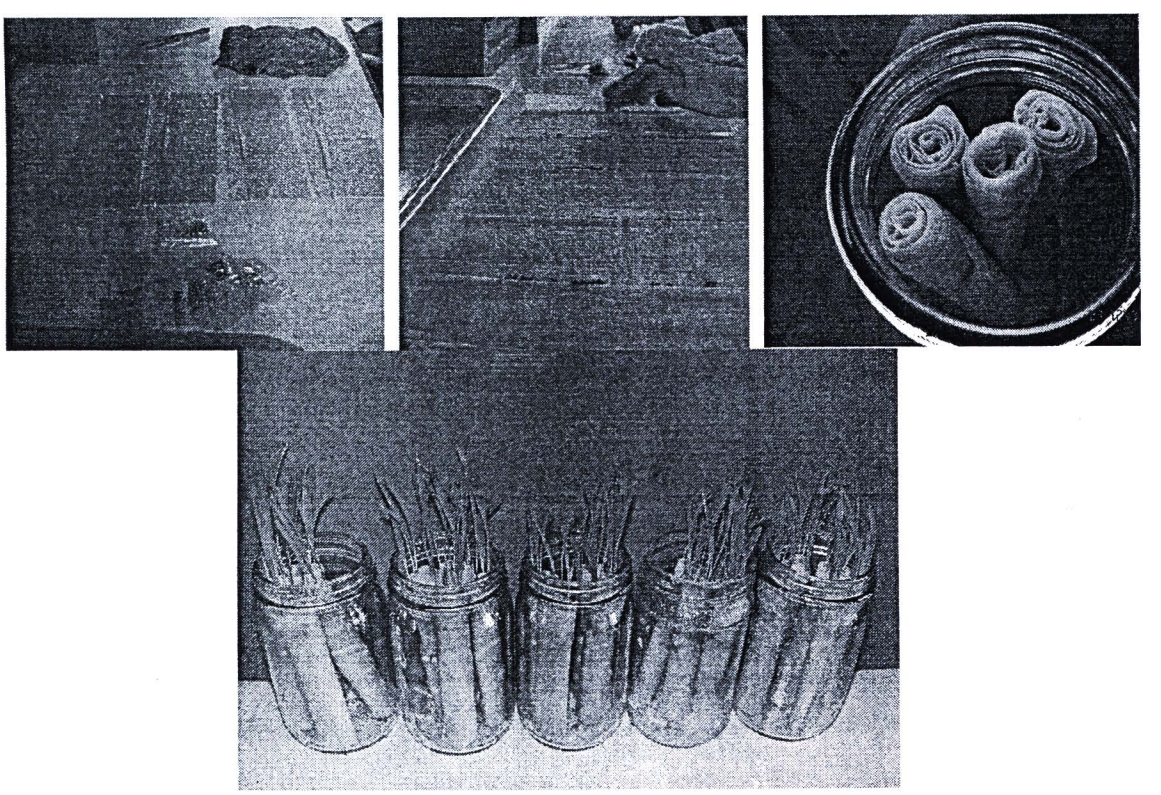
ตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.2 แสดงผลของลักษณะการเพาะที่แบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ แบบ TP และแบบ BP สำหรับสภาวะอื่นๆ กำหนดให้เหมือนกัน ปล่อยไว้ 7 วัน พบว่า การเพาะเมล็ดหญ้ารูซี่แบบ TP มีอัตราการงอก 72.12 เปอร์เซ็นต์ ให้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ 5.03 เปอร์เซ็นต์ การเพาะแบบ BP มีอัตราการงอก 45.11 เปอร์เซ็นต์ ให้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ 12.12 เปอร์เซ็นต์ และเมล็ดหญ้าอะตราตัม์ ที่เพาะแบบ TP มีอัตราการงอก 83.23 เปอร์เซ็นต์ ให้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ 5.12 เปอร์เซ็นต์ การเพาะแบบ BP มีอัตราการงอก 62.41 เปอร์เซ็นต์ ให้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ 15.20 เปอร์เซ็นต์ นั่นคือ การเพาะแบบ TP จะให้อัตราการงอกที่ดีกว่า แบบ BP แต่ให้จำนวนต้นกล้าที่สมบูรณ์น้อยกว่า

ตารางที่ 4.3 อัตราการงอก จำนวนต้นกล้าที่สมบูรณ์ของหญ้ารูซี่ และหญ้าอะตราตัม โดยการแบ่งตามลักษณะการเพาะ

ลักษณะการเพาะ	สภาวะทั้งหมด สำหรับการเพาะเมล็ด				ผลการทดสอบ	
	วิธีเร่งความงอก	อุณหภูมิที่เพาะ	ความเข้มแสงที่เพาะ	ระยะเวลาการเพาะ	การงอกของต้นกล้า (%)	ต้นกล้าสมบูรณ์ (%)
1. หญ้ารูซี่						
TP	ชุบน้ำกลั่น	อุณหภูมิห้อง	แสงในห้อง	7 วัน	72.12%	5.03%
BP	ชุบน้ำกลั่น	อุณหภูมิห้อง	แสงในห้อง	7 วัน	45.11%	12.12%
2. หญ้าอะตราตัม						
TP	ชุบน้ำกลั่น	อุณหภูมิห้อง	แสงในห้อง	7 วัน	83.23%	5.12%
BP	ชุบน้ำกลั่น	อุณหภูมิห้อง	แสงในห้อง	7 วัน	62.41%	15.20%



(ก) การเพาะเมล็ดแบบ TP (Top of Paper)



(ข) การเพาะเมล็ดแบบ BP (Between Paper)

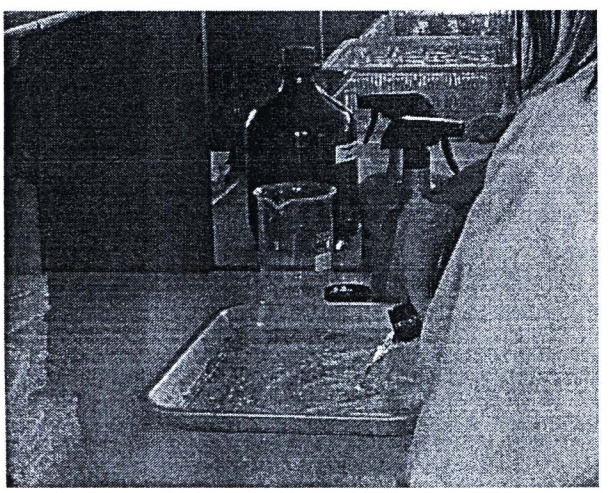
ภาพที่ 4.2 ลักษณะการเพาะเมล็ดแบบ TP (ก) และแบบ BP (ข)

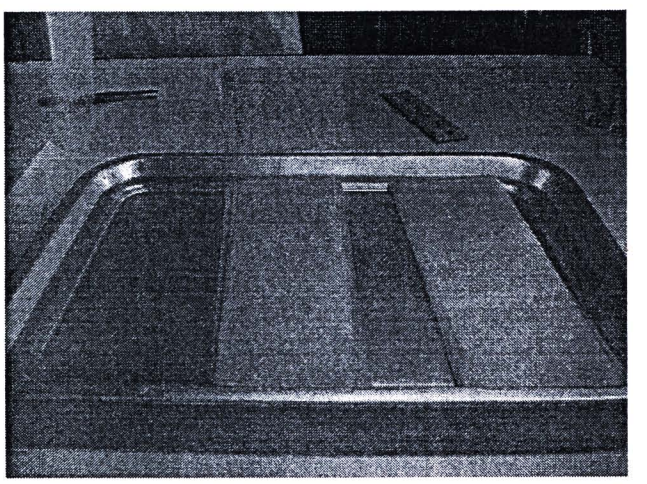
2.2 ชนิดน้ำยาที่ใช้ในการชุบกระดาษเพาะ

ตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.3 แสดงผลของการเร่งการงอก โดยการชุบกระดาษเพาะด้วยน้ำยาชนิดต่างๆ 3 ชนิด คือ น้ำกลั่น สารละลายโพแทสเซียมไนเทรท ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายธาตุอาหาร Hoagland solution (HA) สำหรับสภาวะอื่นๆ กำหนดให้เหมือนกัน ปล่อยไว้ 7 วัน พบว่า การชุบกระดาษเพาะด้วยสารละลายธาตุอาหาร HA จะให้อัตราการงอก และต้นกล้าที่สมบูรณ์ดีที่สุด โดยหญ้ารูซีมีอัตราการงอก 52.21 เปอร์เซ็นต์ ให้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ 16.33 เปอร์เซ็นต์ และหญ้าอะตราตัมมีอัตราการงอก 63.56 เปอร์เซ็นต์ ให้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ 18.78 เปอร์เซ็นต์ และจากผลการทดลองการชุบกระดาษเพาะด้วยสารละลาย KNO_3 0.2% จะให้อัตราการงอก และต้นกล้าที่สมบูรณ์ใกล้เคียงกับการชุบกระดาษเพาะด้วยสารละลายธาตุอาหาร HA แต่ลักษณะต้นกล้าที่ได้ จะมีลำต้นที่อ่อน และต้นกล้ามีสีเขียวน้อยกว่า จึงเลือกชนิดน้ำยาที่ใช้เป็นสารละลายธาตุอาหาร HA ในการชุบกระดาษเพาะ

ตารางที่ 4.4 อัตราการงอก จำนวนต้นกล้าที่สมบูรณ์ของหญ้ารูซี่ และหญ้าอะตราตัม โดยการแบ่งตามชนิดน้ำยาที่ใช้ชุบกระดาษเพาะ

ชนิดน้ำยาที่ใช้	สภาวะทั้งหมด สำหรับการเพาะเมล็ด				ผลการทดสอบ	
	ลักษณะการเพาะ	อุณหภูมิที่เพาะ	ความเข้มแสงที่เพาะ	ระยะเวลาการเพาะ	การงอกของต้นกล้า (%)	ต้นกล้าสมบูรณ์ (%)
1. หญ้ารูซี่						
ชุบน้ำกลั่น	BP	อุณหภูมิห้อง	แสงในห้อง	7 วัน	45.34 ± 0.0143	10.42 ± 0.0050
ชุบ KNO_3 0.2%	BP	อุณหภูมิห้อง	แสงในห้อง	7 วัน	50.87 ± 0.0026	15.12 ± 0.0028
ชุบ Hoagland sol[n]	BP	อุณหภูมิห้อง	แสงในห้อง	7 วัน	52.21 ± 0.0017	16.33 ± 0.0023
2. หญ้าอะตราตัม						
ชุบน้ำกลั่น	BP	อุณหภูมิห้อง	แสงในห้อง	7 วัน	63.23 ± 0.0073	12.12 ± 0.0064
ชุบ KNO_3 0.2%	BP	อุณหภูมิห้อง	แสงในห้อง	7 วัน	62.41 ± 0.0032	18.20 ± 0.0033
ชุบ Hoagland sol[n]	BP	อุณหภูมิห้อง	แสงในห้อง	7 วัน	63.56 ± 0.0027	18.78 ± 0.0019





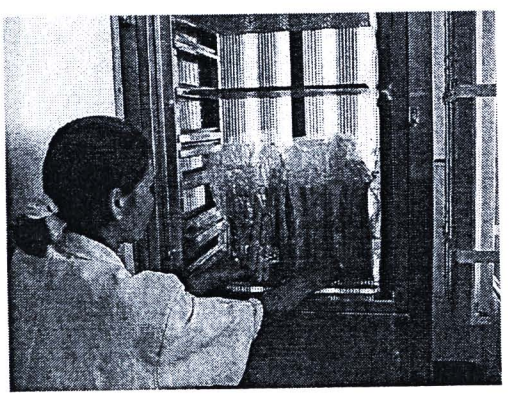
ภาพที่ 4.3 วิธีการชุบกระดาษเพาะด้วยน้ำยา

2.3 อุณหภูมิสำหรับการเพาะ

จากตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะ โดยแบ่งเป็น 2 สภาวะ คือ การเพาะที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 32±1 °C ดังภาพที่ 4.4 สำหรับสภาวะอื่น ๆ กำหนดให้เหมือนกัน ระยะเวลาการเพาะ 7 วัน ลักษณะการเพาะแบบ BP ชุบกระดาษเพาะด้วยสารละลายธาตุอาหาร HA ความเข้มแสงในห้องปกติ พบว่า การเพาะที่อุณหภูมิ 32±1 °C ให้อัตราการงอก และต้นกล้าที่สมบูรณ์ ดีกว่าการเพาะที่อุณหภูมิห้อง โดยหญ้ารูซี่ มีอัตราการงอก 60.12 เปอร์เซ็นต์ ให้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ 20.78 เปอร์เซ็นต์ และหญ้าอะตราตัม มีอัตราการงอก 72.57 เปอร์เซ็นต์ ให้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ 25.17 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการควบคุมอุณหภูมิการเพาะจะทำให้เมล็ดงอกเร็วขึ้น

ตารางที่ 4.5 อัตราการงอก จำนวนต้นกล้าที่สมบูรณ์ของหญ้ารูซี่ และหญ้าอะตราตัม โดยการแบ่งตามอุณหภูมิการเพาะ

อุณหภูมิการเพาะ	สภาวะสำหรับการเพาะเมล็ด				ผลการทดสอบ	
	ลักษณะการเพาะ	ชนิดน้ำยาที่ใช้เร่งการงอก	ความเข้มแสงที่เพาะ	ระยะเวลาการเพาะ	การงอกของต้นกล้า (%)	ต้นกล้าสมบูรณ์ (%)
1. หญ้ารูซี่						
อุณหภูมิห้อง	BP	Hoagland	แสงในห้อง	7 วัน	53.15 ± 0.0045	17.81 ± 0.0026
อุณหภูมิ 32±1 °C	BP	Hoagland	แสงในห้อง	7 วัน	60.12 ± 0.0023	20.78 ± 0.0020
2. หญ้าอะตราตัม						
อุณหภูมิห้อง	BP	Hoagland	แสงในห้อง	7 วัน	62.84 ± 0.0019	18.23 ± 0.0023
อุณหภูมิ 32±1 °C	BP	Hoagland	แสงในห้อง	7 วัน	72.57 ± 0.0014	25.17 ± 0.0013



ภาพที่ 4.4 วิธีการควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเมล็ด

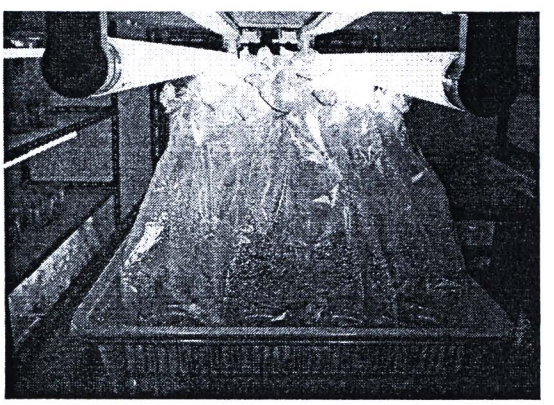
2.4 ความเข้มแสงสำหรับการเพาะ

ตารางที่ 4.6 ผลของความเข้มแสงที่ใช้ในการเพาะแบ่งเป็น 2 สภาวะ คือ วางให้ได้รับแสงปกติในห้องปฏิบัติการ (ช่วงเช้าและเย็น ประมาณ 700 ลักซ์ ช่วงกลางวัน ประมาณ 3000 ลักซ์ และวางบนความเข้มแสง 1500 ลักซ์ ช่วงแสง 12 ชั่วโมง และช่วงมืด 12 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4.5 สำหรับสภาวะอื่นๆ กำหนดให้เหมือนกัน ปล่อยไว้ 7 วัน พบว่า การเพาะบนความเข้มแสง 1500 ลักซ์ ให้อัตราการงอกและต้นกล้าที่สมบูรณ์ดีกว่า โดยมีลักษณะของลำต้นที่แข็งแรงและให้สีเขียวข้มกว่า นอกจากนี้ โดยหญ้ารูซี่ มีอัตราการงอก 68.13 เปอร์เซ็นต์ ให้ต้นกล้าที่สมบูรณ์

24.64 เปอร์เซ็นต์และหญ้าอะตราตัม มีอัตราการงอก 75.17 เปอร์เซ็นต์ ให้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ 30.12 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.6 อัตราการงอก จำนวนต้นกล้าที่สมบูรณ์ของหญ้ารูซี่และหญ้าอะตราตัม โดยการแบ่งตามความเข้มแสงที่ใช้ในการเพาะ

ความเข้มแสงสำหรับการเพาะ	สภาวะสำหรับการเพาะเมล็ด				ผลการทดสอบ	
	ลักษณะการเพาะ	ชนิดน้ำยาที่ใช้เร่งการงอก	อุณหภูมิที่เพาะ	ระยะเวลาการเพาะ	การงอกของต้นกล้า (%)	ต้นกล้าสมบูรณ์
1. หญ้ารูซี่						
แสงในห้อง	BP	Hoagland	32±1 °C	7 วัน	60.52 ± 0.0013	18.11 ± 0.0030
ความเข้ม 1500 Lux	BP	Hoagland	32±1 °C	7 วัน	68.13 ± 0.0014	24.64 ± 0.0042
2. หญ้าอะตราตัม						
แสงในห้อง	BP	Hoagland	32±1 °C	7 วัน	65.43 ± 0.0012	20.09 ± 0.0065
ความเข้ม 1500 Lux	BP	Hoagland	32±1 °C	7 วัน	75.17 ± 0.0012	30.12 ± 0.0017



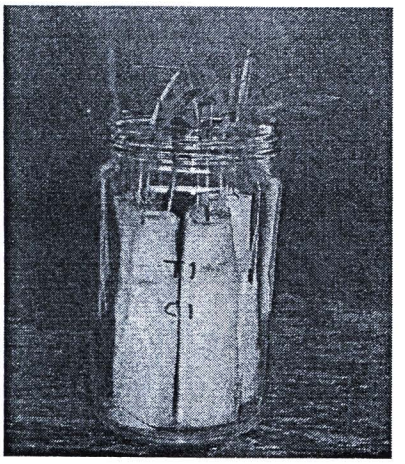
ภาพที่ 4.5 วิธีการควบคุมความเข้มแสงที่ใช้ในการเพาะเมล็ด

3. ผลการศึกษาวิธีการใช้สารละลายธาตุอาหาร Hoagland solution (HA) เลี้ยงต้นกล้าของหญ้ารูซี่ และหญ้าอะตราตัม

ตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.6 แสดงผลของการนำต้นกล้าที่สมบูรณ์ของทั้งหญ้ารูซี่ และหญ้าอะตราตัมที่ได้จากการเพาะตามวิธีการในข้อ 1.2 มาเลี้ยงทดสอบในสารละลายธาตุอาหาร HA และกำหนดปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของต้นกล้า เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า จำนวนต้นกล้าที่เหมาะสมในการเลี้ยงในขวดแก้ว คือ 100 ต้น/ขวด ปริมาณสารละลายธาตุอาหาร HA ที่เติมในขวด คือ 30 มิลลิลิตร จะเหมาะสมที่สุด เนื่องจากถ้าใช้สารละลายธาตุอาหาร HA 40 มิลลิลิตร จะทำให้ท่วมในส่วนลำต้นของต้นกล้ามีผลให้ต้นกล้าเน่าตายได้ และระยะเวลาในการเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหาร HA คือ เปลี่ยนทุก 2 วัน แต่ถ้าเพิ่มเป็นเปลี่ยนทุก 3 วัน สารละลายธาตุอาหาร HA จะแห้งก่อน

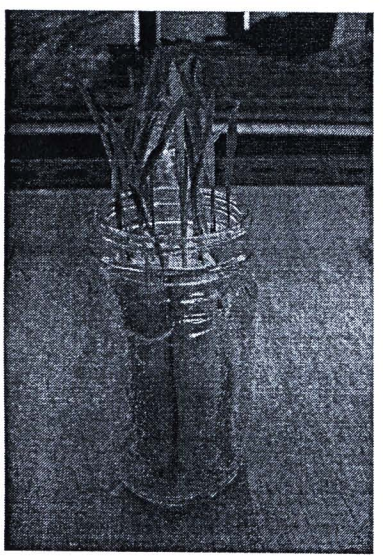
ตารางที่ 4.7 ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงต้นกล้าในสารละลายธาตุอาหาร HA

ปัจจัยที่ศึกษา	ข้อสังเกตที่พบ
1. จำนวนต้นกล้าที่เลี้ยงในขวดแก้ว	
- 50 ต้น/ขวด	ต้นกล้ายังคงอยู่ในสภาพปกติ ไม่เหี่ยวเฉา หรือตายไป
- 100 ต้น/ขวด	ต้นกล้ายังคงอยู่ในสภาพปกติ ไม่เหี่ยวเฉา หรือตายไป
2. ปริมาณสารละลายธาตุอาหาร HA ที่เติมในขวดแก้ว	
- 20 มิลลิลิตร	หลังผ่านไป 1 วัน สารละลายธาตุอาหาร HA ในขวดแห้งเกือบหมด
- 30 มิลลิลิตร	หลังผ่านไป 3 วัน สารละลายธาตุอาหาร HA ในขวดแห้งเกือบหมด
- 40 มิลลิลิตร	หลังผ่านไป 3 วัน สารละลายธาตุอาหาร HA ในขวดแห้ง
3. ระยะเวลาในการเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหาร HA	
- เปลี่ยนทุกวัน	ต้นกล้ายังคงอยู่ในสภาพปกติ ไม่เหี่ยวเฉา หรือตายไป
- เปลี่ยนวันเว้นวัน	ต้นกล้ายังคงอยู่ในสภาพปกติ ไม่เหี่ยวเฉา หรือตายไป
- เปลี่ยนทุก 2 วัน	ต้นกล้ายังคงอยู่ในสภาพปกติ ไม่เหี่ยวเฉา หรือตายไป

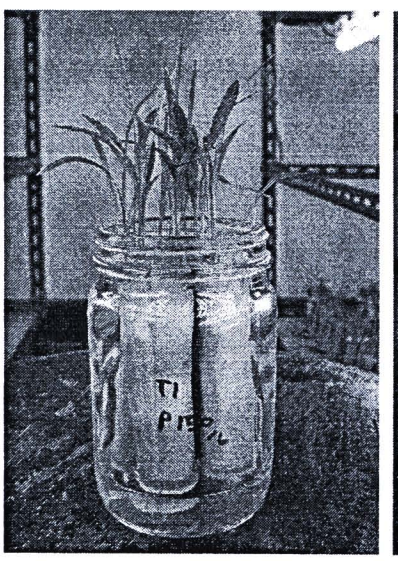


ต้นกล้า 50 ต้น/ขวด

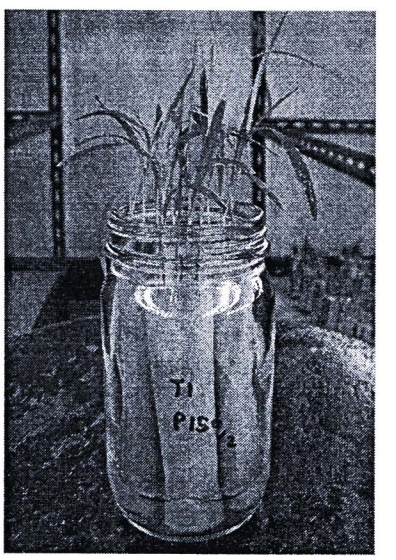
ต้นกล้า 100 ต้น/ขวด



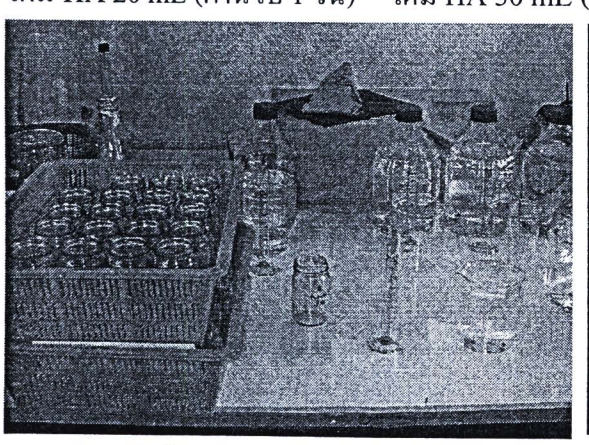
เติม HA 20 mL (ผ่านไป 1 วัน)



เติม HA 30 mL (ผ่านไป 1 วัน)



เติม HA 40 mL (ผ่านไป 1 วัน)



การเตรียมสารลายธาตุอาหาร HA

สารลายธาตุอาหาร HA ที่พร้อมใช้เปลี่ยน

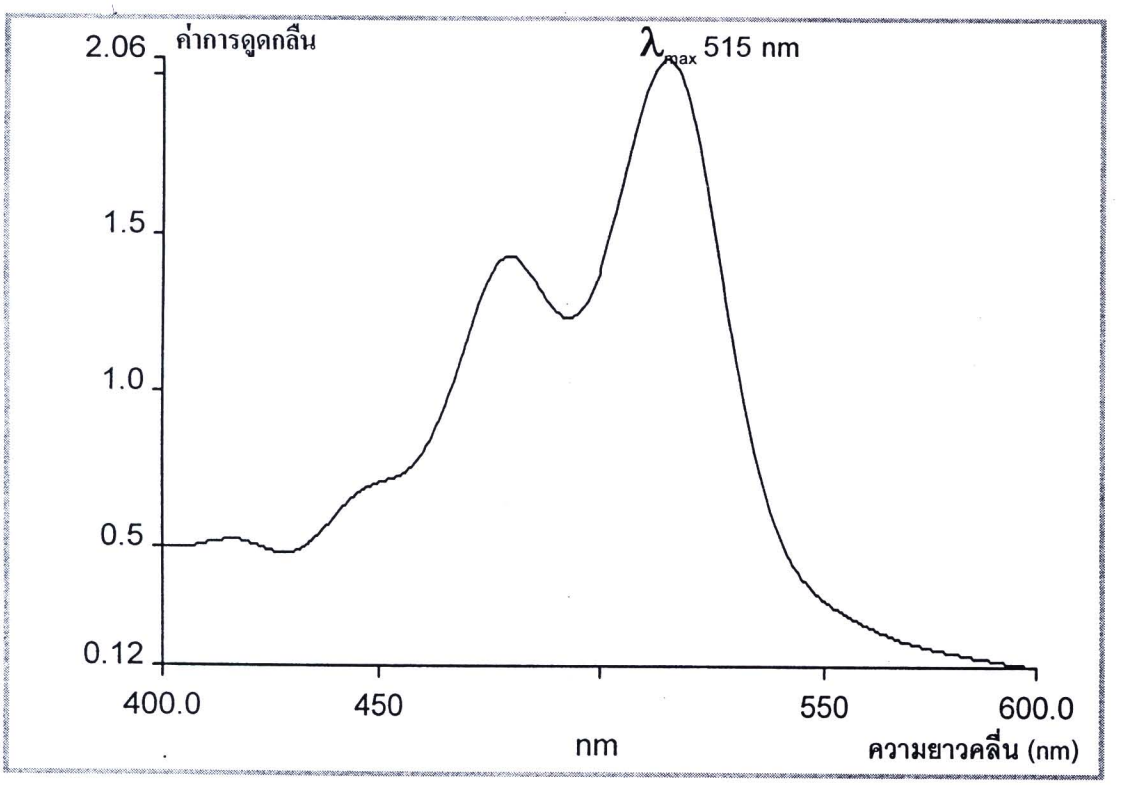
ภาพที่ 4.6 วิธีการทดสอบการเลี้ยงต้นกล้าในสารละลายธาตุอาหาร Hoagland solution

การทดลองที่ 2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร โพรลีนในหญ้าด้วยเทคนิค Spectrophotometry

2.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวัด

2.1.1 ผลการศึกษาค่าความยาวคลื่น ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max})

ภาพที่ 4.7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของสารสี (colored product) ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายมาตรฐานโพรลีน (standard praline) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ ninhydrin acid reagent จะให้สเปกตราการดูดกลืน (absorption spectra) และให้ค่า λ_{max} ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร



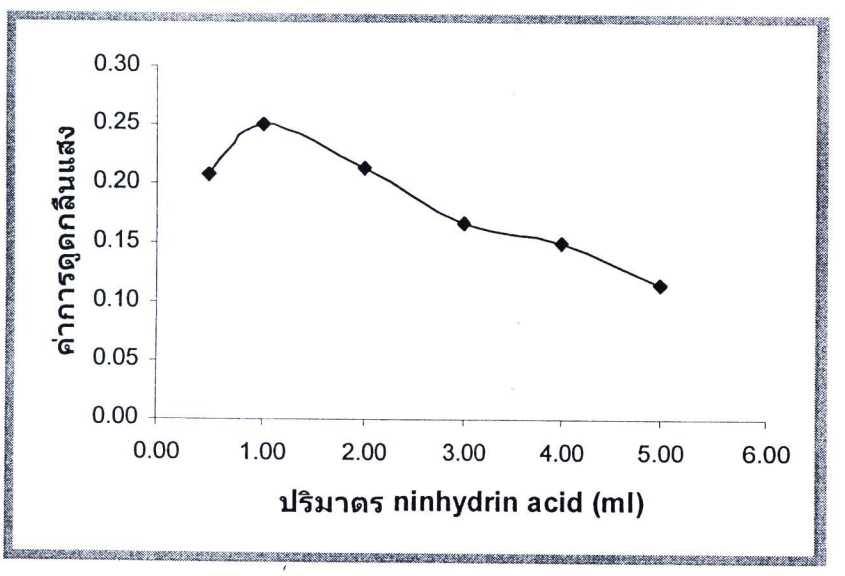
ภาพที่ 4.7 ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของสารละลายมาตรฐานโพรลีนที่ทำปฏิกิริยากับ ninhydrin acid reagent

2.1.2 ผลการศึกษาปริมาตรการเติม ninhydrin acid ที่เหมาะสม

ตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.8 แสดงผลของปริมาตรการเติม ninhydrin acid ลงในสารละลาย standard proline ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบว่า การเติม ninhydrin acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

ตารางที่ 4.8 ผลของปริมาตรการเติม ninhydrin acid ต่อค่าการดูดกลืนแสง

ปริมาตร ninhydrin acid (ml)	ค่าการดูดกลืนแสง
0.05	0.2067
1.00	0.2502
2.00	0.2128
3.00	0.1673
4.00	0.1506
5.00	0.1156



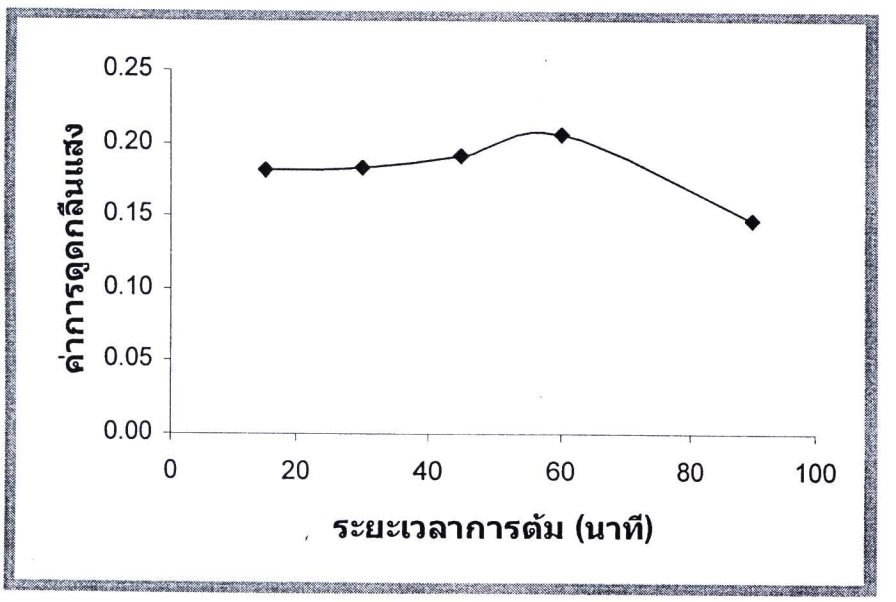
ภาพที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตร ninhydrin acid ต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานโพรลีน

2.1.3 ผลการศึกษาระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม

ตารางที่ 4.9 และภาพที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่า สารละลายมาตรฐานโพรลีน ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำปฏิกิริยากับ ninhydrin acid เร่งปฏิกิริยาโดยต้มที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 60 นาที ปฏิกิริยาจะเกิดสมบูรณ์และให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด คือ 0.2060 ซึ่งหลังจากเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว ต้องหยุดปฏิกิริยาทันทีโดยการแช่ในอ่างน้ำแข็ง (Ice bath)

ตารางที่ 4.9 ผลของระยะเวลาในการต้มเร่งปฏิกิริยา ต่อค่าการดูดกลืนแสง

ระยะเวลาการต้มเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 90 °C (นาที)	ค่าการดูดกลืนแสง
15	0.1808
30	0.1827
45	0.1915
60	0.2060
90	0.1478



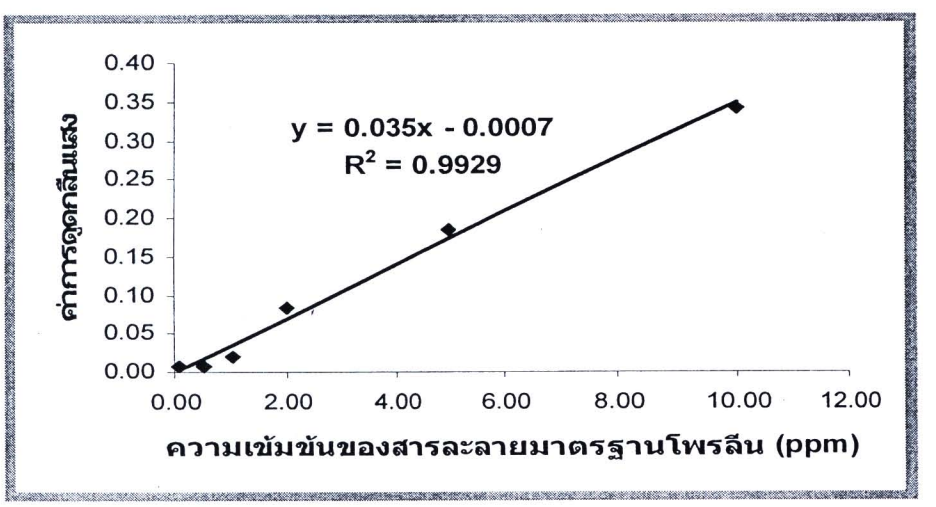
ภาพที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการต้มเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 90 °C ต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานโพรลีน

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารโพรลีนด้วยเทคนิค Spectrophotometry

ตารางที่ 4.10 และภาพที่ 4.10 แสดงวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารโพรลีนด้วยเทคนิค Spectrophotometry และให้ค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนได้ของโพรลีนในตัวอย่างสารละลายหญ้ารูซี่ ซึ่ง spike สารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 0.5-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติม glacial acetic acid 5 มิลลิลิตร และ acid ninhydrin 1 มิลลิลิตร นำไปต้มบน water bath ที่อุณหภูมิประมาณ 90 °C นานประมาณ 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาทันทีโดยการแช่ใน ice bath วัดค่าการดูดกลืนด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร วิเคราะห์หาปริมาณโพรลีนโดยเทียบสารกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานโพรลีน (ภาพที่ 4.10) พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนได้ของโพรลีนมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 98 (98.23-98.34) เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.10 ค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนได้เฉลี่ย (mean recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของปริมาณสารโพรลีนที่ spike ลงไปในตัวอย่างหญ้ารูซี่

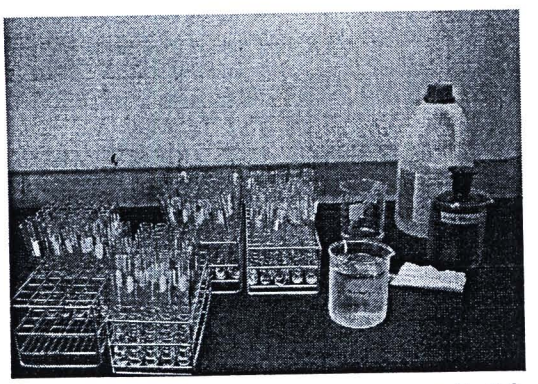
ปริมาณสารโพรลีน			
ปริมาณที่เติม (mg/1000 g)	ปริมาณที่ตรวจพบ (mg/1000 g)	การกลับคืนได้เฉลี่ย (%)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%)
0.5	0.491	98.276	0.657
1.0	0.983	98.344	0.448
2.0	1.985	98.246	0.431
5.0	4.912	98.233	0.596

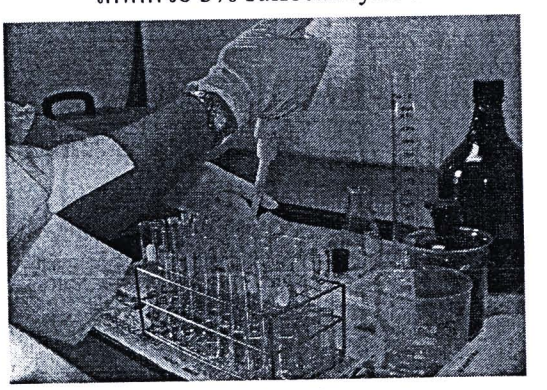


ภาพที่ 4.10 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานโพรลีน

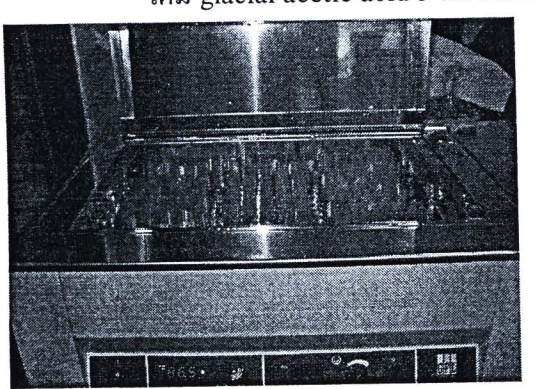
ชั่งตัวอย่าง

สกัดด้วย 3% sulfosalicylic acid



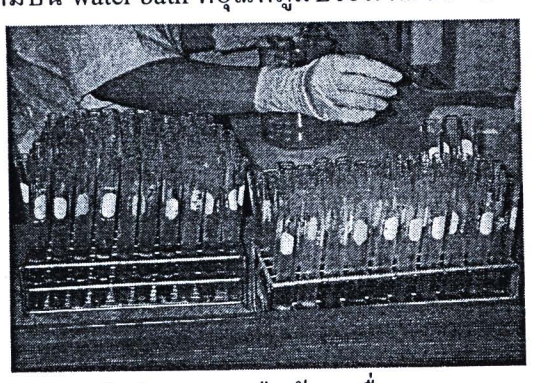


เติม glacial acetic acid 5 มิลลิลิตร และ acid ninhydrin 1 มิลลิลิตร



ต้มบน water bath ที่อุณหภูมิประมาณ 90 °C

หยุดปฏิกิริยาทันทีโดยการแช่ใน ice bath

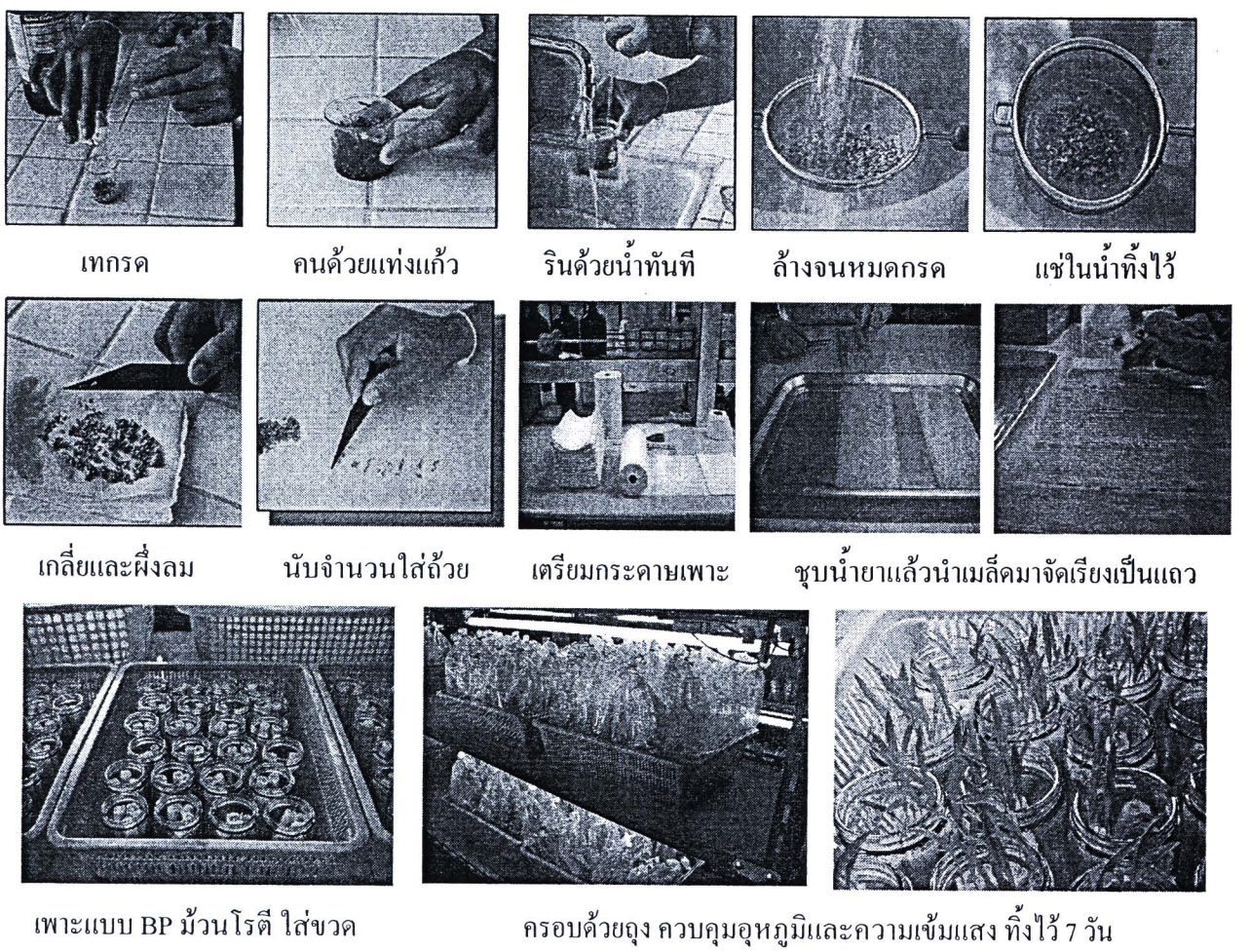


วัดค่าการดูดกลืนด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

ภาพที่ 4.11 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารโพรลีนด้วยเทคนิค Spectrophotometry

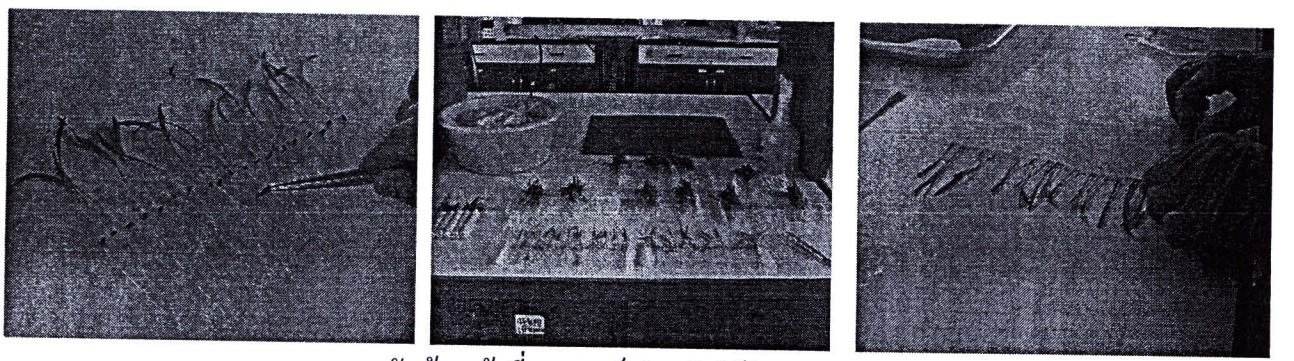
การทดลองที่ 3 การศึกษาปริมาณสารโพรลีนที่มีในต้นกล้าของหญ้าที่จำลองให้เกิดสภาวะแล้ง และเจริญเติบโตในสารละลายธาตุอาหาร Hoagland solution

ก่อนการ Treated ให้เกิดสภาวะแล้งด้วยสารละลาย Polyethylene glycol 6000 (PEG6000) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต้องทำการเตรียมต้นกล้าที่สมบูรณ์ของทั้งหญ้ารูซี่ และหญ้าอะตราตัม ภาพที่ 4.12 แสดงวิธีการเพาะ โดยการนำเมล็ดหญ้ามา Treated ด้วยกรดซัลฟุริกเข้มข้น เพื่อเร่งการงอก ก่อนเพาะทำการชุบกระดาษเพาะด้วยสารละลายธาตุอาหาร Hoaglang solution (HA) เพาะแบบ BP ม้วนโรตี จำนวน 25 เมล็ด/ม้วน ใส่ในขวดแก้ว ครอบด้วยถุงพลาสติกใส เพื่อกันการระเหยของน้ำจากกระดาษเพาะ มัดปากถุง นำไปวางบนชั้นที่ควบคุมความเข้มของแสงเป็น 1500 ลักซ์ ให้ได้รับช่วงแสง 12 ชั่วโมง และช่วงมืด 12 ชั่วโมง ภายในห้องเพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิระหว่าง 32 ± 1 °C เป็นเวลา 7 วัน

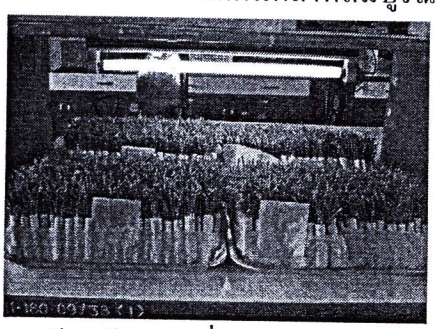


ภาพที่ 4.12 วิธีการเพาะ เพื่อให้ได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์

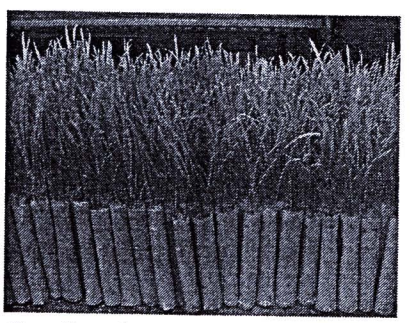
ภาพที่ 4.13 แสดงวิธีการนำต้นกล้าที่ได้จากการเพาะ มาคัดเอาเฉพาะต้นกล้าที่สมบูรณ์และมีขนาดความสูงของลำต้นและใบใกล้เคียงกัน วางเป็นแถวบนกระดาษเพาะที่ชุบด้วยสารละลายธาตุอาหาร HA จำนวน 20 ต้น/ม้วน จากนั้นย้ายม้วนต้นกล้าใส่ลงในขวดแก้วที่เติมสารละลายธาตุอาหาร HA และเติมสารละลาย PEG6000 ที่ให้ระดับความเข้มข้นเป็น 5 10 15 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 4 ม้วน/ขวด นำไปวางเลี้ยงบนชั้นที่ควบคุมความเข้มของแสงเป็น 1500 ลักซ์ และกำหนดให้ได้รับช่วงแสง 12 ชั่วโมง และช่วงมืด 12 ชั่วโมง ภายในห้องเพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิระหว่าง 30-33 °C เป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยทำการเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหาร HA ทุก ๆ 2 วัน



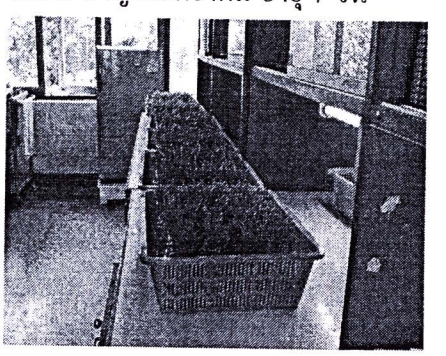
การคัดต้นกล้าที่สมบูรณ์ สำหรับใช้ในการทดสอบ



ต้นกล้าหญ้ารูซี่ อายุ 7 วัน



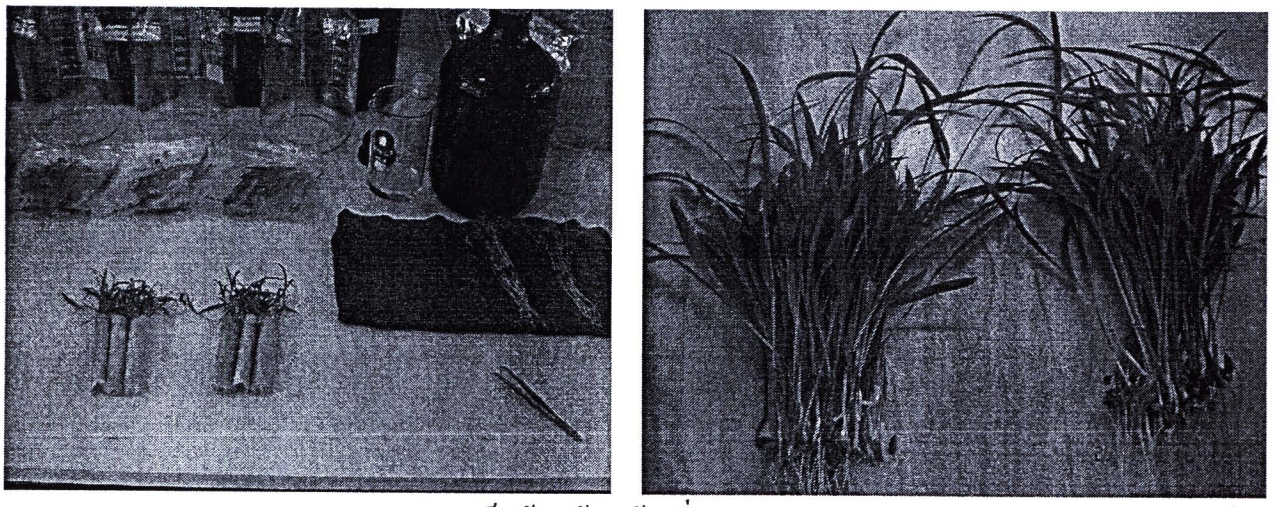
ต้นกล้าหญ้าอะตราตัม อายุ 7 วัน



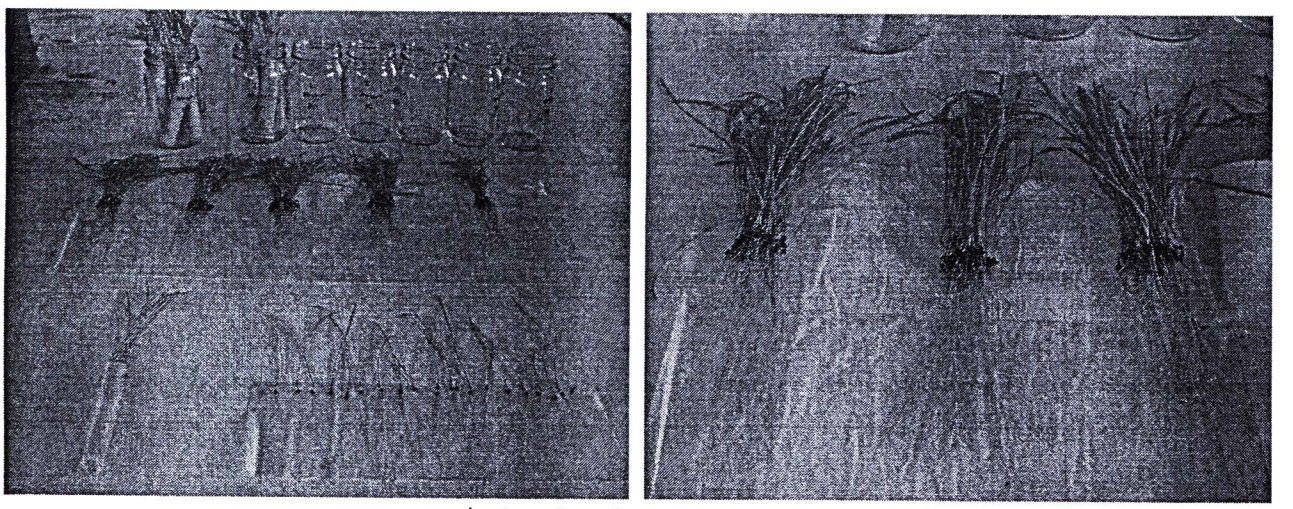
ต้นกล้าที่พร้อมสำหรับการทดสอบ

ภาพที่ 4.13 วิธีการคัดต้นกล้าที่สมบูรณ์ และการเตรียมต้นกล้าสำหรับการทดสอบ

ภาพที่ 4.14 แสดงวิธีการเก็บตัวอย่างต้นกล้าในทุก ๆ สัปดาห์ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างในแต่ละ Treatments ใส่ในถุงพลาสติกซิบอย่างดี แล้วนำไปเก็บไว้ในระบบแช่แข็ง ก่อนนำไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารโพรลีนต่อไป



การเก็บต้นกล้าหญ้ารูซี่



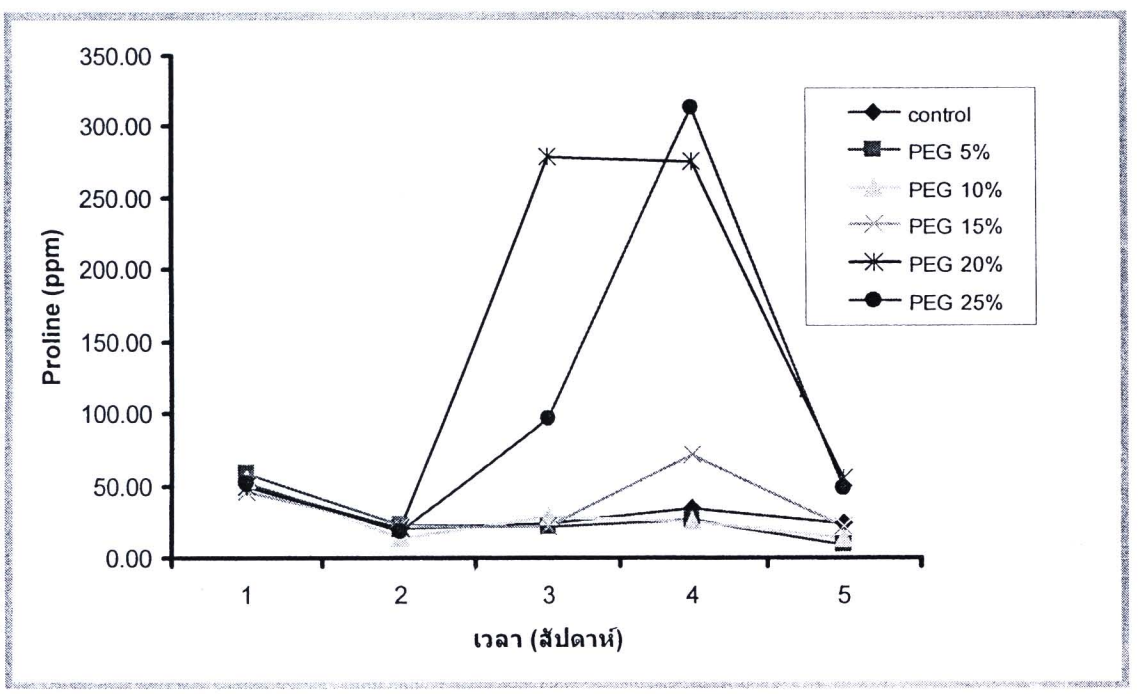
การเก็บต้นกล้าหญ้าอะตราตัม

ภาพที่ 4.14 วิธีการสุ่มเก็บตัวอย่างต้นกล้า

ตารางที่ 4.11 ปริมาณสารโพรลีนในต้นกล้าหญ้ารูซี่ ที่อายุการเพาะ 7 วัน และเลี้ยงใน สารละลายธาตุอาหาร Hoagland solution ที่เติม PEG6000 ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

Treatment	ค่าปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ย (ppm of fresh weight)					
	Control	PEG 5%	PEG 10%	PEG 15%	PEG 20%	PEG 25%
week 1	50.8248[a]	58.6425[b]	53.7887[a]	46.5875[a]	49.7577[a]	52.0676[a]
week 2	21.2033[a]	22.9470[b]	13.3020[c]	22.2931[a]	20.7678[a]	18.3637[a]
week 3	23.7584[a]	21.3994[a]	28.3153[b]	22.1078[c]	278.4692[d]	96.3102[e]
week 4	34.5887[a]	26.3009[b]	25.1820[c]	71.3133[d]	275.0889[e]	313.7054[f]
week 5	24.0459[a]	8.9242[b]	13.9426[c]	22.3494[d]	55.7191[e]	48.7459[f]

หมายเหตุ ตารางสถิติวิเคราะห์แยกในแต่ละสัปดาห์ และแยกระดับความเข้มข้นของ PEG6000 (ดูผลแนวนอน)
ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$
ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$



ภาพที่ 4.15 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารโพรลีนในต้นกล้าหญ้ารูซี่ที่ได้รับ PEG6000 ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

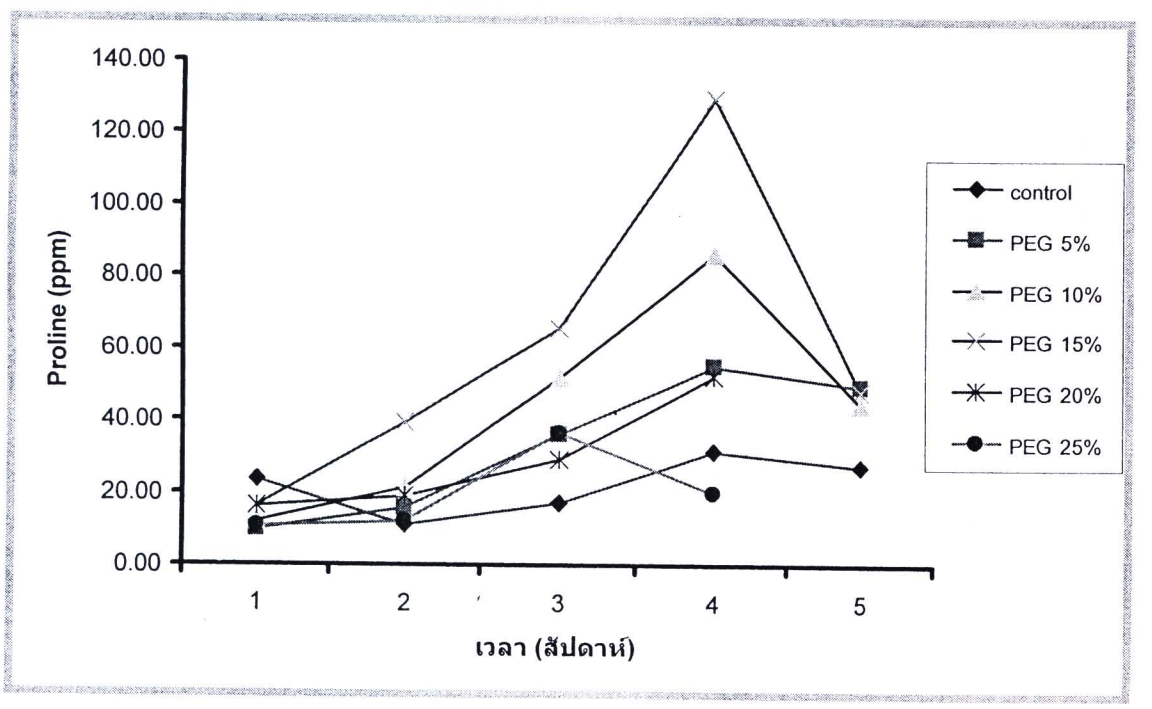
ตารางที่ 4.11 แสดงปริมาณสารโพรลีนในต้นกล้าของหญ้ารูซี่ ที่เลี้ยงในสารละลายธาตุอาหาร HA และจำลองให้เกิดสภาวะแล้งโดยการเติมสารละลาย PEG6000 ความเข้มข้นระดับต่างๆ กัน และทำการเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่ควบคุมความเข้มแสง ระยะเวลาการให้ช่วงแสง และอุณหภูมิภายในห้องเพาะเลี้ยง พบว่า ค่าปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ยที่พบในชุดควบคุม เทียบกับชุดทดสอบที่ได้รับ PEG6000 ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ส่วนใหญ่จะให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นที่ระดับความเข้มข้น PEG 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 และที่ระดับความเข้มข้น PEG 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในสัปดาห์ที่ 2 ส่วนในสัปดาห์ที่ 3 ค่าปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ยในชุดควบคุมเทียบกับชุดทดสอบที่ได้รับ PEG6000 ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10-25% จะให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจะเห็นผลชัดเจนในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 พบว่าค่าปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ยในชุดควบคุมเทียบกับชุดทดสอบที่ได้รับ PEG6000 ในทุกระดับความเข้มข้น จะให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ภาพที่ 4.15 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ยที่พบในต้นกล้าหญ้ารูซี่ที่ได้รับ PEG6000 ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วง 5 สัปดาห์ พบว่า ในชุดทดสอบที่ระดับความเข้มข้น PEG 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ยที่พบตั้งแต่ในสัปดาห์ที่ 1-5 จะมีการเปลี่ยนแปลงทั้งเพิ่มขึ้นและลดลงเล็กน้อย แต่ปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ยที่พบจะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในชุดทดสอบที่ระดับความเข้มข้น PEG 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณสารโพรลีน เฉลี่ยจะเพิ่มขึ้นมากในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 แต่ในสัปดาห์ที่ 5 ปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ยจะลดลง ทั้งนี้เนื่องจาก ต้นกล้าของหญ้าอาจจะได้รับสาร PEG6000 ที่ระดับความเข้มข้นมาก ทำให้เกิดสภาวะขาดน้ำมากไปจนไม่สามารถทนได้ ทำให้เริ่มมีการแห้ง และเฉาของต้นกล้า

ตารางที่ 4.12 ปริมาณสารโพรลีนในต้นกล้าหญ้าอะตราตัม ที่อายุการเพาะ 7 วัน และเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหาร Hoagland solution ที่เติมสาร PEG6000 ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

Treatment	ค่าปริมาณสาร โพรลีนเฉลี่ย (ppm of fresh weight)					
	Control	PEG 5%	PEG 10%	PEG 15%	PEG 20%	PEG 25%
week 1	23.6010[a]	19.5063[a]	11.8377[b]	16.0693[c]	16.2059[d]	10.6416[e]
week 2	11.1828[a]	15.4648[b]	21.1991[c]	39.2179[d]	19.0800[e]	12.1932[f]
week 3	17.0743[a]	35.7526[b]	51.7358[c]	65.5903[d]	28.8590[e]	36.3476[f]
week 4	31.4757[a]	54.8220[b]	86.2725[c]	129.4626[d]	52.0113[e]	19.6475[f]
week 5	27.0134[a]	49.3145[b]	44.1614[c]	48.0010[d]	-	-

หมายเหตุ ตารางสถิติวิเคราะห์แยกในแต่ละสัปดาห์ และแยกระดับความเข้มข้นของ PEG6000 (ดูผลแนวนอน)
ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$
ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$



ภาพที่ 4.16 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารโพรลีนในต้นกล้าหญ้าอะตราตัมที่ได้รับ PEG6000 ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 4.12 แสดงปริมาณสารโพรลีนในต้นกล้าของหญ้าอะตราตัมที่เลี้ยงในสารละลาย ธาตุอาหาร HA และจำลองให้เกิดสภาวะแล้งโดยการเติมสารละลาย PEG6000 ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน และทำการเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่ควบคุมความเข้มแสง ระยะเวลาการให้ช่วงแสง และอุณหภูมิภายในห้องเพาะเลี้ยง พบว่า ค่าปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ยที่พบในชุดควบคุม เทียบกับชุดทดสอบที่ได้รับ PEG6000 ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในทุก ๆ สัปดาห์ให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นในสัปดาห์ที่ 1 และที่ระดับความเข้มข้น PEG 5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ในสัปดาห์ที่ 5 ชุดทดสอบที่ได้รับ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ต้นกล้าหญ้าอะตราตัมที่เพาะเลี้ยงจะแห้งเฉาตายไปก่อน ทำให้ไม่มีผลวิเคราะห์ปริมาณสารโพรลีน

ภาพที่ 4.16 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ยที่พบในต้นกล้าหญ้าอะตราตัมที่ได้รับ PEG6000 ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วง 5 สัปดาห์ พบว่า เมื่อต้นกล้าหญ้าอะตราตัมได้รับ PEG6000 ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ จะทำให้ปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ยที่พบเพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ยจะเห็นชัดเจนในต้นกล้าที่ได้รับ PEG6000 ระดับความเข้มข้น PEG 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ยในทุกระดับความเข้มข้นของ PEG6000 ในสัปดาห์ที่ 5 จะมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 4

การทดลองที่ 4 การศึกษาปริมาณสารโพรลีนที่มีในหญ้าที่สภาวะปกติและสภาวะขาดน้ำ โดยการปลูกหญ้าในกระถาง และเลี้ยงในโรงเรือนเพาะชำ

ตารางที่ 4.13 แสดงผลการนำหญ้ารูซี่และหญ้าอะตราตัมมาทดสอบเลี้ยงในโรงเรือนเพาะชำ แสดงในภาพที่ 4.17 และแบ่งเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดควบคุม ที่ทำการรดน้ำเพื่อให้หญ้าเจริญเติบโตในสภาวะปกติ และชุดทดสอบ ที่ไม่รดน้ำเพื่อจำลองให้อยู่ในสภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 6 วัน พบว่า ค่าปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ยในชุดควบคุมเทียบกับชุดทดสอบ โดยวิเคราะห์สถิติแยกในแต่ละวัน ผลคือ ทั้งในหญ้ารูซี่ และหญ้าอะตราตัม จะให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p \leq 0.05$

ตารางที่ 4.13 ปริมาณสารโพรลีนในหญ้ารูซี่ และหญ้าอะตราตัมที่เลี้ยงในโรงเรือนเพาะชำ

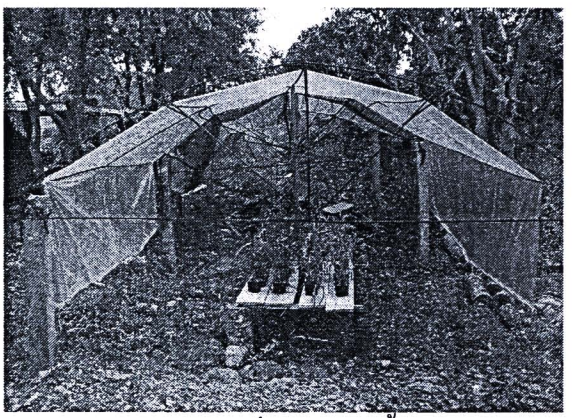
Treatments	ปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ย (ppm of fresh weight)					
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
หญ้ารูซี่						
- Control (รดน้ำ)	23.9960[a]	16.1302[a]	24.4324[a]	24.1220[a]	15.4490[a]	17.9387[a]
- ไม่รดน้ำ	11.7044[b]	15.5905[b]	76.4561[b]	55.1051[b]	66.1194[b]	67.4717[b]
หญ้าอะตราตัม						
- Control (รดน้ำ)	1.1302[a]	0.8361[a]	1.2402[a]	0.5366[a]	0.8929[a]	0.6654[a]
- ไม่รดน้ำ	1.0805[a]	3.1601[b]	9.2439[b]	18.5860[b]	8.1325[b]	35.3588[b]

หมายเหตุ ตารางสถิติวิเคราะห์แยกในแต่ละวัน (ดูผลแนวตั้ง)

ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

การเตรียมหญ้าในกระถางก่อนนำมาทดสอบ



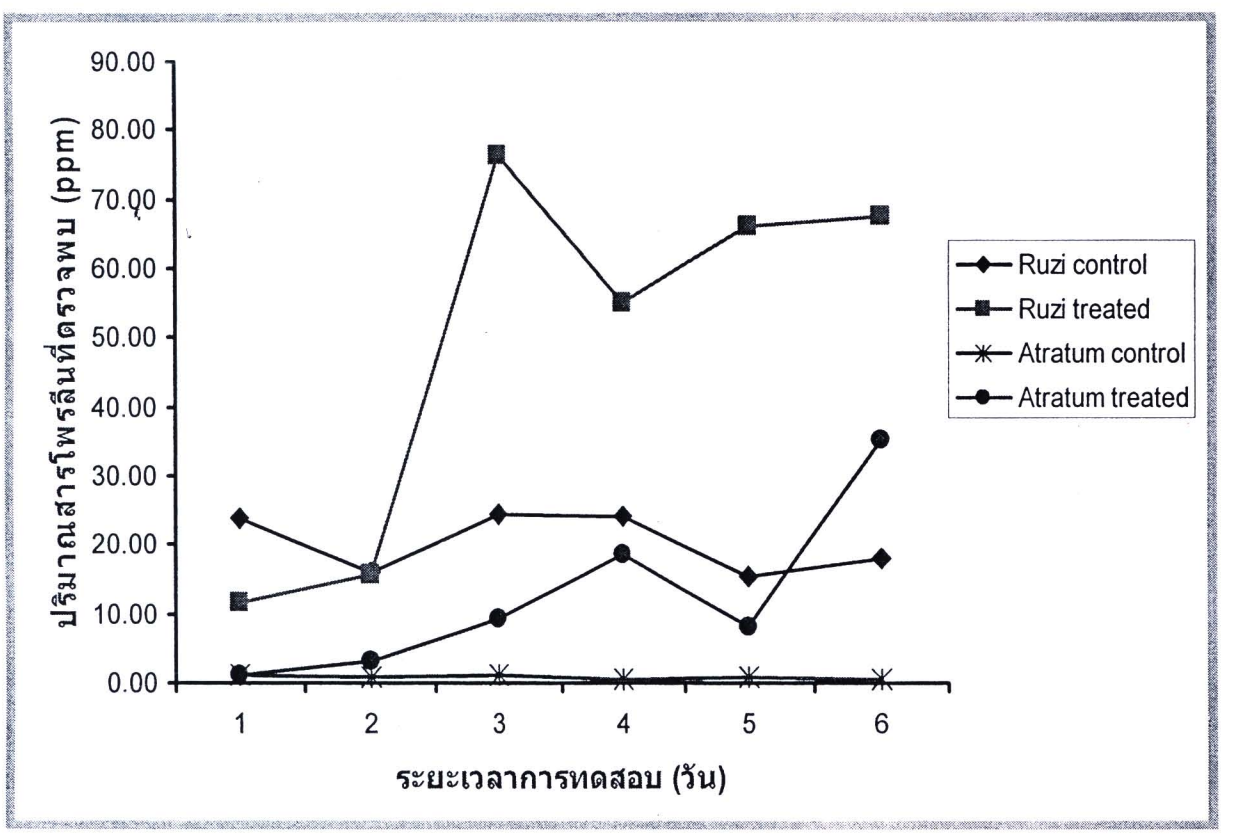
ลักษณะโรงเรือนที่ใช้ในการเลี้ยงทดสอบ

การจัดวางกระถางในโรงเรือน

ตัดเก็บตัวอย่างหญ้าในกระถางทุกวัน แล้วนำมาบดก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโพรลีน

ภาพที่ 4.17 การทดสอบเลี้ยงหญ้ารูซี่และหญ้าอะตราตัมในโรงเรือนเพาะชำ

ภาพที่ 4.18 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ยที่พบในหญ้ารูซี่และหญ้าอะตราตัมที่รดน้ำและไม่รดน้ำ ซึ่งพบว่าในชุดที่รดน้ำตามปกติปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ยในหญ้าทั้ง 2 ชนิด มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย แต่ปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ยจะเพิ่มขึ้นในชุดที่ไม่รดน้ำโดยจะเพิ่มมากขึ้นตามเวลา และเมื่อพิจารณาลักษณะการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารโพรลีนเฉลี่ยพบว่าในหญ้ารูซี่เพิ่มขึ้นมากกว่าในหญ้าอะตราตัม



ภาพที่ 4.18 ปริมาณสารโพรลีนของหญ้ารูซี่ และหญ้าอะตราตัมที่ทดสอบให้ขาดน้ำ โดยการปลูกหญ้าในโรงเรือนเพาะ