บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 อิทธิพลของปริมาณสารสกัดจากยอดลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยที่มีต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินโดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay (SHB)

วัตถุประสงค์ เพื่อหาปริมาณสารสกัดที่พอเพียงที่จะทำให้อยู่ในช่วง linear ของกราฟมาตรฐาน

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 4 วิธีการ คือ ปริมาณสารสกัด 0.5 , 1 , 2 และ 4 กรัมสด ทำการทดลอง 6 ซ้ำ โดย 1 หน่วยการทดลองคือ Soybean hypocotyl 6 ชิ้น แต่ละชิ้นยาว 1 มิลลิเมตร

วิธีการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง การสกัด การแยกส่วน การทำให้บริสุทธิ์ และทำ bioassay ตามแบบของโรจน์รวี (2539) และดรุณี (2539) ดังนี้

1. การเก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างโดยตัดยอดลิ้นจี่ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง) 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 25 ยอดเป็นหนึ่งตัวอย่าง ใส่ถุงพลาสติกมัดปากถุงแล้วแช่ในกระติกน้ำแข็ง แล้วนำไปสกัดในข้อต่อไป

2. การสกัดตัวอย่าง นำตัวอย่างแต่ละถุงมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (blender) จากนั้นนำไปแช่ตู้เย็น –30 องศาเซลเซียสเพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป ชั่งน้ำหนักตัวอย่างสดให้ได้ประมาณ 20 กรัมต่อ 1 ตัวอย่างด้วยเครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) จากนั้นนำตัวอย่างที่บดแล้วใส่ใน erlenmayer flask ขนาด 500 มล เติมเอทานอล 80% ในอัตราส่วน 1 กรัมต่อเอทานอล 10 มล เขย่าสารละลายให้ผสมกัน ปิดปากขวดด้วยถุงพลาสติกรัดยาง แล้วนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 17 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำสารละลายที่กรองได้ไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ (vacuum rotary evaporator) ในสภาพสูญญากาศที่ 600 mmHg อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสจนเหลือปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 2.5 ด้วย HCl 6 N

3. การแยกส่วน นำสารละลายที่ปรับ pH แล้วมาแยกส่วนโดยใช้ ethyl acetate เข้มข้น (โดยใช้อัตราส่วน ตัวอย่างสด 1 กรัม : ethyl acetate 1.5 มิลลิลิตร) ด้วย separatory funnel เขย่าสารละลายให้

เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น ให้แยกเอาส่วนล่างซึ่งเป็นสารที่ละลายในน้ำ (water phase) นำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

4. การทำให้บริสุทธิ์

4.1 การกำจัดสิ่งเจือปนและสารยับยั้งการเจริญเติบโต นำสารละลายส่วน water phase (เทียบเท่าน้ำหนักสด 20 กรัม) ผ่านลงใน column ซึ่งบรรจุ Dowex 50 W เรซิน (ขนาด 50-100 mesh) column ที่ใช้คือ burette ขนาด 1x25 เซนติเมตร (เส้นผ่าศูนย์กลาง x ความยาว) ความสูงของ Dowex 50 W เรซิน ซึ่งบรรจุใน burette ประมาณ 20 เซนติเมตร การบรรจุ Dowex 50 W เรซิน ใส่ใน burette นั้นต้องแช่ Dowex 50 W เรซินในน้ำกลั่นประมาณ 20 นาที เพื่อให้ Dowex 50 W เรซิน ขยายตัวเต็มที่ก่อนจึงบรรจุลงใน burette จากนั้นล้าง column ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 100 มิลลิลิตร แล้วจึงผ่านสารละลายส่วน water phase ลงใน column ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ปล่อยให้สารละลายไหลผ่าน column ในอัตราเร็วประมาณ 2 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อสารละลายลดระดับลงจนใกล้จะถึงผิวหน้าของเรซินแล้ว เริ่มล้างด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรในอัตราเร็วเดียวกัน เมื่อน้ำกลั่นลดระดับใกล้ถึงผิวเรซินเติมเอทานอล 70% Lab grade 20 มิลลิลิตรและปรับให้มีการไหลผ่าน column ในอัตราเดียวกัน เมื่อเอทานอลลดระดับใกล้ถึงผิวเรซิน เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ล้างในอัตราเร็วเดียวกัน สารละลายทั้งหมดที่ไหลออกมาให้ทิ้งไป จากนั้นเติม NH_4OH 5 N AR grade 20 มิลลิลิตร แล้วปล่อยให้ชะในอัตราเร็วประมาณ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที (เนื่องจากจะเกิดความร้อนมากจนเดือดถ้าปล่อยให้ชะเร็วเกินไป) เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาเมื่อชะด้วย NH_4OH 5 N AR grade เมื่อ NH_4OH 5 N ลดระดับใกล้ถึงผิวเรซิน เติมน้ำกลั่นอีก 20 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาเมื่อล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นครั้งสุดท้าย ซึ่งจะมีปริมาตรรวมกันประมาณ 40 มิลลิลิตร จากนั้นล้าง column เพื่อใช้ใหม่ (เพื่อผ่าน water phase ครั้งต่อไป) โดยเติมด้วยกรด HCl 2 N AR grade ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ปล่อยให้กรดผ่าน column ในอัตรา 2 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อกรดลดระดับลงจนใกล้จะถึงผิวหน้าของเรซินแล้วเติมน้ำกลั่นทีละ 20 มิลลิลิตรจนครบ 100 มิลลิลิตร ปล่อยให้ไหลในอัตรา 2 มิลลิลิตรต่อนาที

4.2 นำสารละลายที่เหลือในข้อ 3 มาทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีการเดียวกับข้อ 4.1

4.3 นำสารละลายที่เก็บได้มารวมกัน จากนั้นนำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ (vacuum rotary evaporator) ในสภาพสูญญากาศที่ 600 mmHg ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ให้เหลือสารละลายเพียงเล็กน้อย (น้อยกว่า 1 มิลลิลิตร) จากนั้นดูดสารละลายที่เหลือภายในขวดระเหยด้วย graduate pipette 1 มิลลิลิตร แล้วล้างสารละลายที่ติดในขวดระเหยด้วยเอทานอล 80% ทีละน้อย แล้วดูดด้วย graduate pipette พยายามล้างสารละลายออกจากขวดให้ได้มากที่สุดจนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทำ Paper chromatography ต่อไป

- ในขั้นตอนนี้ไซโตไคนินที่อยู่ใน water phase เมื่อผ่าน column แล้ว ไซโตไคนินจะถูกดูดยึดอยู่ที่ Dowex 50 W เรซิน ซึ่งเป็น cation exchange resin ส่วน hormone หรือ inhibitor ตัวอื่นๆ จะไม่ถูกดูดยึดที่ Dowex resin ดังนั้นจะเหลือเฉพาะสารคล้ายไซโตไคนินและสารที่เป็น cation อยู่ และสารคล้ายไซโตไคนินจะถูกชะ (ล้าง) ออกมาด้วย NH_4OH 5 N ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และล้างด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ให้เก็บสารละลาย 40 มิลลิลิตรนี้ไว้ เพื่อวิเคราะห์ขั้นตอนต่อไป

4.4 การทำ Paper chromatography เตรียมแผ่นโครมาโตแกรมโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาด 9 x 28 เซนติเมตร ดูดสารละลายที่ได้จากข้อ 4.3 จำนวน 200 , 100 , 50 และ 25 ไมโครลิตร (ซึ่งเทียบเท่าตัวอย่างกรัมสด 4 , 2 , 1 และ 0.5 กรัมสด) แล้วใช้หลอดแก้วแคปปิลารี่ดูดสารละลายมา strip เป็นแนวยาวบนกระดาษโครมาโตแกรมห่างจากด้านล่างประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วทำให้แห้งโดยใช้เครื่องเป่าผม หลังจากนั้น strip สารละลายซ้ำจนกว่าจะหมดสารตัวอย่าง (ทุกครั้งที่ strip ก็ต้องเป่าให้แห้ง) แล้วนำไปจุ่มใน solvent chamber ซึ่งประกอบด้วย Isopropanol (AR grade) 99.7% : NH_4OH (AR grade) 25% : H_2O (อัตรา 10 : 1 : 1 โดยปริมาตร) ให้แถบสารอยู่เหนือตัวทำละลาย ทิ้งไว้จนตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปได้ระยะ solvent front ประมาณ 18 เซนติเมตร (วัดจากรอย strip) ใช้เวลาประมาณ 8 ชั่วโมง จากนั้นนำไปผึ่งให้แห้งแล้วแบ่งแผ่นโครมาโตแกรมออกเป็น 10 ส่วนเท่าๆ กันเป็น R_f 0.1-10 (ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่เหนือแถบสารจนถึงระยะ solvent front) นำ R_f ที่ 0.1 , 0.6 – 0.9 ซึ่งเป็น R_f ที่พบ activity ของไซโตไคนินในยอดลิ้นจี่ (ดรุณี , 2539) มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในขวดยาฉีดขนาด 20 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในข้อต่อไป

5. การทำ **Soybean Hypocotyl Bioassay (SHB)** (ทำในสภาพปลอดเชื้อ)

5.1 คัดเลือกเมล็ดถั่วเหลืองที่มีขนาดใกล้เคียงกันประมาณ 40 เมล็ด นำมาฆ่าเชื้อโดยใส่ลงใน erlenmayer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีสารละลาย chlorox 10% แช่เมล็ดโดยเขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้าง 5 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ทำในสภาพปลอดเชื้อ)

5.2 เตรียมอาหารวุ้นซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำตาล (sucrose) : วุ้นผงในอัตราส่วน 3 : 1 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เทใส่หลอดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.4 เซนติเมตร ยาว 15 เซนติเมตร หลอดละประมาณ 10 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยพลาสติก PP (Polypopylene) รัดด้วยยางใช้กระดาษขนาด 7.5 x 7.5 เซนติเมตร ปิดแล้วรัดด้วยยางอีกชั้นหนึ่ง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยไล่อากาศก่อนเป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนึ่งที่ความดันประมาณ 15 ปอนด์/ตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที

5.3 นำเมล็ดถั่วเหลืองในข้อ 5.1 มาเพาะในหลอดทดลองขนาด 2.4 x 15 เซนติเมตรที่มีอาหารวุ้นอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ แล้วนำไปไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน hypocotyl จะยาวประมาณ 12 เซนติเมตร (วัดจากใต้ใบเลี้ยงจนถึงจุดที่เกิดรากเป็นจุดแรก)

5.4 เตรียมอาหารวุ้นตามสูตรอาหารของ Miller (1961) โดยแต่ละขวดเติมอาหารประมาณ 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นใส่กระดาษ chromatogram R_f 0.1 , 0.6-0.9 ซึ่งตัดเป็นชิ้นเล็กๆ นำขวดที่มีอาหารและแผ่นโครมาโตแกรมที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ปิดปากขวดด้วยแผ่นพลาสติก PP รัดด้วยยาง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยไล่ฟองอากาศเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนึ่งที่ความดันประมาณ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยให้ความดันลดลงเองจนเท่ากับภายนอกจึงเปิดหม้อนึ่ง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น เพื่อจะนำไปใช้ในข้อต่อไป

5.5 นำ hypocotyl ออกมาจากหลอดทดลองในตู้ Laminar air flow โดยเปิดฝาพลาสติกแล้วลนปากหลอดที่ตะเกียงแอลกอฮอล์ แล้วใช้ปากคีบที่เผาฆ่าเชื้อแล้ว คีบ hypocotyl ออกมาตัดใน petridish โดยใช้ใบมีดเบอร์ 15 ที่เผาฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเอาส่วนที่เป็นใบเลี้ยงและส่วนรากทิ้งไป แล้วตัด hypocotyl เป็นชิ้นๆ ยาวชิ้นละ 1 มิลลิเมตร ใช้ปากคีบที่เผาฆ่าเชื้อแล้วคีบ hypocotyl ที่ตัดแล้วใส่ลงในขวดอาหารที่มีแผ่นโครมาโตแกรม ขวดละ 6 ชิ้นโดยเลือก hypocotyl ทั้งจากส่วนที่ใกล้กับบริเวณใบเลี้ยงหรือส่วนที่ใกล้กับบริเวณรากให้เฉลี่ยกันไปในแต่ละขวด เพื่อจะเป็นการลด CV. ของงานทดลอง ลนปากขวดด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์ ก่อนปิดปากขวดด้วยแผ่นพลาสติก PP รัดด้วยยาง นำออกไปบ่มในตู้ควบคุมการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงประมาณ 1000 ลักซ์ เป็นเวลา 13 วัน แล้วจึงนำออกมาชั่งน้ำหนักสด

6. การทำกราฟมาตรฐาน เตรียมสารละลายไคเนตินความเข้มข้น 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} สตล ใส่ลงในอาหารวุ้นสูตร Miller (1961) แล้วปิดปากขวดด้วยพลาสติก PP รัดด้วยยาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยไล่อากาศเป็นเวลา 5 นาที ที่ความดันประมาณ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยให้ความดันลดลงจนเท่ากับภายนอกจึงเปิดหม้อนึ่ง แล้วเลี้ยง hypocotyl ตามวิธีการในข้อ 5.5

การบันทึกผล

1. บันทึกน้ำหนักสดของ hypocotyl เมื่ออายุบ่ม 13 วัน มีหน่วยเป็น กรัม/hypocotyl 6 ชิ้น
2. คำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน จากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น mg kinetin equivalent/g fresh weight
3. วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV , LSD , Polynomial contrast , CV. , Linear regression และ correlation

การทดลองที่ 2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในช่วงก่อนการแตกใบอ่อนของยอดลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในช่วงก่อนการแตกใบอ่อนของยอดลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกอย่างสมบูรณ์ มี 5 วิธีการ คือ จำนวนสัปดาห์ก่อนการแตกใบอ่อน 0 , 2 , 4 , 6 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ ทำการทดลอง 7 ซ้ำโดย 1 หน่วยการทดลองคือต้นลิ้นจี่ 1 ต้น

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง ใช้วิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 1

2. การสกัดตัวอย่าง ใช้วิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 2

3. การทำให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 4

4. การทำ Paper chromatography นำสารที่สกัดจากยอดลิ้นจี่ในข้อ 3 ซึ่งลดปริมาตรลงเหลือ 1 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง (เทียบเท่าน้ำหนักสด 20 กรัม) มาทำ paper chromatography โดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารสกัดจากยอดลิ้นจี่มา 200 ไมโครลิตร (เทียบเท่าน้ำหนักสด 40 กรัม) ใส่ลงในหลอด micro tube แล้วปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 4.4 เมื่อได้แผ่นโครมาโตแกรมแล้วตัดแผ่นโครมาโตแกรมเฉพาะ R_f ที่ 0.1 และ 0.6-0.9 ซึ่งเป็น R_f ที่พบ activity ของไซโตไคนินในยอดลิ้นจี่ (ดรุณี , 2539) แล้วนำไปหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินโดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay ตามแบบของดรุณี (2539)

5. การหาปริมาณ ใช้วิธีการ SHB เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 5.1-5.5

6. การทำกราฟมาตรฐาน ใช้วิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 6

การบันทึกผล

1. บันทึกน้ำหนักสดของ hypocotyl เมื่ออายุบ่ม 13 วัน มีหน่วยเป็น กรัม/hypocotyl 6 ชิ้น

2.คำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน จากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น mg kinetin equivalent/g fresh weight

3. วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV , LSD , Polynomial contrast , CV. , Linear regression และ correlation

การทดลองที่ 3 อิทธิพลของระยะเวลาในการเก็บรักษายอดลิ้นจี่ที่มีต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินโดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาในการเก็บรักษายอดลิ้นจี่ที่มีต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินโดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 4 วิธีการ คือ ระยะเวลาในการเก็บรักษาตัวอย่างพืช คือ ยอดลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยที่อุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน คือ 1 เดือน , 2 เดือน , 3 เดือน และ 4 ชั่วโมง หลังจากเก็บตัวอย่างโดยไม่แช่เย็น ทำ 10 ซ้ำ โดย 1 หน่วยการทดลองคือ soybean hypocotyl 8 ชิ้น แต่ละชิ้นยาว 1 มิลลิเมตร

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง ใช้วิธีการเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 1

2. การสกัดตัวอย่าง หลังจากบดตัวอย่างด้วยเครื่อง blender แล้วจึงนำตัวอย่างไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 , 2 , 3 เดือน และ 4 ชั่วโมงหลังเก็บตัวอย่างโดยไม่ต้องแช่เย็น

3. การแยกส่วน ใช้วิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 3

4. การทำให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 4 แต่ในข้อ 4.4 ซึ่งทำ Paper chromatogram ให้ใช้ไมโครปิเปตดูดสารสกัดจากยอดลิ้นจี่จำนวน 100 ไมโครลิตร (เทียบเท่าน้ำหนักสด 2 กรัมสด) นอกจากนั้นให้ปฏิบัติเหมือนกันตลอดข้อ 4.4

5. การทำ bioassay ใช้วิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 5.1-5.5 เพียงแต่จำนวนของ hypocotyl ที่ใช้ต่อ 1 หน่วยการทดลองจะให้ 8 ชิ้น ซึ่งทำให้มีค่า CV. ที่ต่ำพอเหมาะ (ชัยวัฒน์ , 2542)

6. การทำกราฟมาตรฐาน ใช้วิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 6

การบันทึกผล

1. บันทึกน้ำหนักสดของ hypocotyl 8 ชิ้น (มีหน่วยเป็นกรัม) เมื่ออายุบ่ม 13 วัน

2. คำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน จากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น mg kinetin equivalent/g fresh weight

3. วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV , LSD , Polynomial contrast , CV. , Linear regression และ correlation

สถานที่ทำการวิจัย

1. สวนสองแสน ดอยปุย อ. เมือง จ. เชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

เดือน ตุลาคม 2539 ถึง มกราคม 2541

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University