บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 การทดสอบยืนยันฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากค้างคาวดำและดีปลี

3.1.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากค้างคาวดำและดีปลี

ทำการบดลำต้นใต้ดินค้างคาวดำสดและผลดีปลีแห้งให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่างพืช ชั่งน้ำหนักก่อนแช่ลำต้นใต้ดินค้างคาวดำในตัวทำละลายเอทธานอล 95 %และผลดีปลีในตัวทำละลายเฮกเซน แช่ไว้เป็นเวลา 3 วัน กรองเอาส่วนที่เป็นสารละลายเอทธานอลและเฮกเซนไว้แล้วนำระเหยเอาตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำจนได้สารสกัดหยาบลำต้นใต้ดินค้างคาวดำและดีปลี (crude extract) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.1.2 การเตรียมหนอนกระทู้ผักเพื่อใช้ในการทดลอง

1) เก็บรวบรวมหนอนและกลุ่มไข่หนอนกระทู้ผัก จากแปลงปลูกผักปลอดสารพิษของเกษตรกร โดยไข่อยู่ใต้ใบพืช มีลักษณะเป็นกลุ่มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-2.0 เซนติเมตร ปกคลุมด้วนขนสีน้ำตาลอ่อน กลุ่มหนอนวัยที่ 1 อยู่รวมกันบริเวณที่วางไข่ กัดกินผิวด้านล่างของใบพืช ทำให้เห็นใบพืชมีลักษณะโปร่งแสง (ภาพที่ 3) ส่วนหนอนวัยที่ 5 มักพบบริเวณใต้ดินบริเวณแปลงปลูก (ภาพที่ 4)

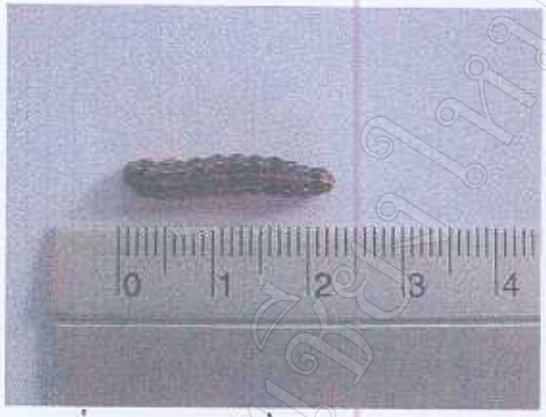
ภาพที่ 3 กลุ่มหนอนวัยที่ 1

ภาพที่ 4 หนอนวัยที่ 5

2) นำหนอนมาเลี้ยงในกล่องพลาสติก ที่มีรูระบายอากาศ และมีกระดาษทิชชู่รองพื้นกล่อง สำหรับให้หนอนมุดตัวลงไปพักตัวอยู่ข้างใต้ในระยะดักแด้ เลี้ยงหนอนด้วยใบบัวหลวงสด

3) ย้ายดักแด้ไว้ในตู้เลี้ยงแมลง จนกระทั่งเป็นผีเสื้อ ให้อาหารผีเสื้อด้วยน้ำผึ้ง 1-10 เปอร์เซ็นต์ และเตรียมต้นหญ้ามาเลเซียใส่ในภาชนะไว้ในตู้เลี้ยงแมลงด้วย เพื่อให้ผีเสื้อเกาะวางไข่

4) ย้ายกลุ่มไข่นำมาเลี้ยงในกล่องพลาสติกที่มีรูระบายอากาศ ประมาณ 3-5 วัน ไข่ฟักเป็นตัวหนอน เมื่อหนอนมีอายุ 7-10 วัน (หนอนวัยที่ 3) จึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 หนอนวัยที่ 3

3.1.3 การทดสอบยืนยันฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากค้างคาวดำและดีปลี

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้จากข้อ 3.1.1 ในการยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผักและผลกระทบต่อการเจริญเติบโตในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยวิธีเลือกกิน (two - chioce leaf disk bioassay) โดยนำใบคะน้าปลอดสารพิษมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด ใช้ที่เจาะรูไม้คอร์กตัดใบคะน้าเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร จำนวน 4 ชิ้น ต่อสารสกัด 1 ความเข้มข้น ทาสารสกัดประมาณ 20 มิลลิกรัมต่อ 1ชิ้น จำนวน 2 ชิ้น อีก 2 ชิ้นล้างด้วยอะซีโตนเจือจาง (กลุ่มควบคุม) วางสลับกันใน petridish ปล่อยหนอนกระทู้ผัก วัยที่ 3 ลงไป 10 ตัว ทิ้งไว้ในที่มืดนาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกหนอนออก วัดพื้นที่ใบที่เหลือจากการกัดกินของหนอนด้วยเครื่องวัดพื้นที่ใบ แล้วนำไปคำนวนค่า antifeedant index (AFI) โดยทำการทดลอง 7 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ดังนี้

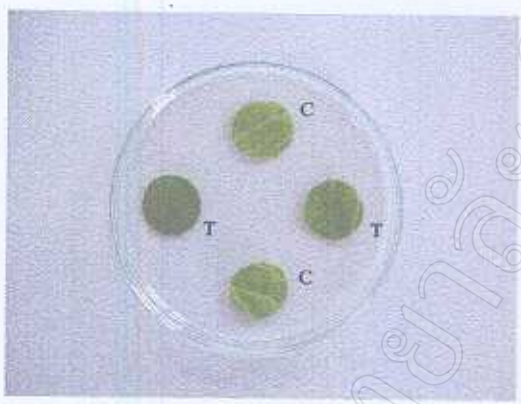
กรรมวิธีที่ 1 คือ กลุ่มควบคุม
กรรมวิธีที่ 2 คือ สารสกัดหยาบจากลำต้นใต้ดินค้างคาวดำ เข้มข้น 0.1 %
กรรมวิธีที่ 3 คือ สารสกัดหยาบจากลำต้นใต้ดินค้างคาวดำ เข้มข้น 0.5 %
กรรมวิธีที่ 4 คือ สารสกัดหยาบจากลำต้นใต้ดินค้างคาวดำ เข้มข้น 1 %
กรรมวิธีที่ 5 คือ สารสกัดหยาบจากผลดีปลี เข้มข้น 0.1 %
กรรมวิธีที่ 6 คือ สารสกัดหยาบจากผลดีปลี เข้มข้น 0.5 %
กรรมวิธีที่ 7 คือ สารสกัดหยาบจากผลดีปลี เข้มข้น 1 %

Antifeedant Index = [% T / (% T +% C)] X 100

% T = ร้อยละของพื้นที่ใบพืชทดสอบที่ถูกกัดกิน

% C = ร้อยละของพื้นที่ใบพืชควบคุมที่ถูกกัดกิน

กำหนดตัดสินสารสกัดจากพืชว่ามีศักยภาพมีฤทธิ์ยับยั้งการกิน ตามวิธีการของ Escoubas *et al* .,(1993) เมื่อค่า AFI น้อยกว่า 20



ภาพที่ 6 การวางใบคะน้าลงใน petridish

ภาพที่ 7 การปล่อยหนอนลงใน petridish

หลังการทดลองสิ้นสุดนำหนอนกระทู้ผักที่รอดตายมาเลี้ยงต่อ เพื่อศึกษาความเป็นพิษและผลกระทบในระยะยาวของสารสกัดจากพืชต่อการเจริญเติบโตของหนอน และตัวเต็มวัย โดยใช้ใบคะน้าสดปลอดสารพิษเป็นอาหารหนอน และน้ำผึ้งความเข้มข้น 1-10 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารเลี้ยงตัวเต็มวัย บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนหนอนที่ตายที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่า Oral LC_{50} และ OralLC_{90} ของแต่ละสารที่มีต่อหนอนกระทู้ผัก โดยใช้โปรแกรม Logit PC และบันทึกจำนวนหนอนที่เข้าดักแด้ได้เป็นปกติและผิดปกติ จำนวนตัวเต็มวัยที่ปกติและผิดปกติ

3.2 การแยกสารกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบที่ได้จากค้างคาวดำและดีปลี

3.2.1 การแยกสารกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบที่ได้จากดีปลีและค้างคาวดำโดย การทำโครมาโทกราฟีผิวบาง (เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์)

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากข้อ 3.1.1 ของการทดลองที่ 1 มาแยกกลุ่มสารออกฤทธิ์ โดยวิธี TLC โดยใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (developing solvent) เป็น เฮกเซน : เอธิลอะซิเตท : เมทานอล ในอัตราส่วน ที่เหมาะสมของดีปลีและค้างคาวดำ บันทึกค่า Rf ของแต่ละ fraction ที่แยกออกจากกัน

3.2.2 การตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์โดยวิธี insect feeding bioassay

ใช้แผ่นกระจกขนาด 5 X 20 ซม. เคลือบด้วย silica gel 60 F_{254} หนา 0.25 มม. แยกองค์ประกอบของสารสกัดหยาบจากค้างคาวดำและดีปลี ภายใต้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ เฮกเซน : เอธิลอะซิเตท : เมทานอล หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้แห้ง นำแผ่น TLC ที่ได้มาฉาบด้วยอาหารเทียมแล้วปล่อยหนอนกระทู้ผักวัย 3 จำนวน 15 ตัว ลงในกล่องที่มีแผ่น TLC ทิ้งไว้ที่มืด 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกหนอนออก บันทึกค่า Rf ของแถบที่ยับยั้งการกินของหนอน จากบริเวณที่หนอนไม่กิน

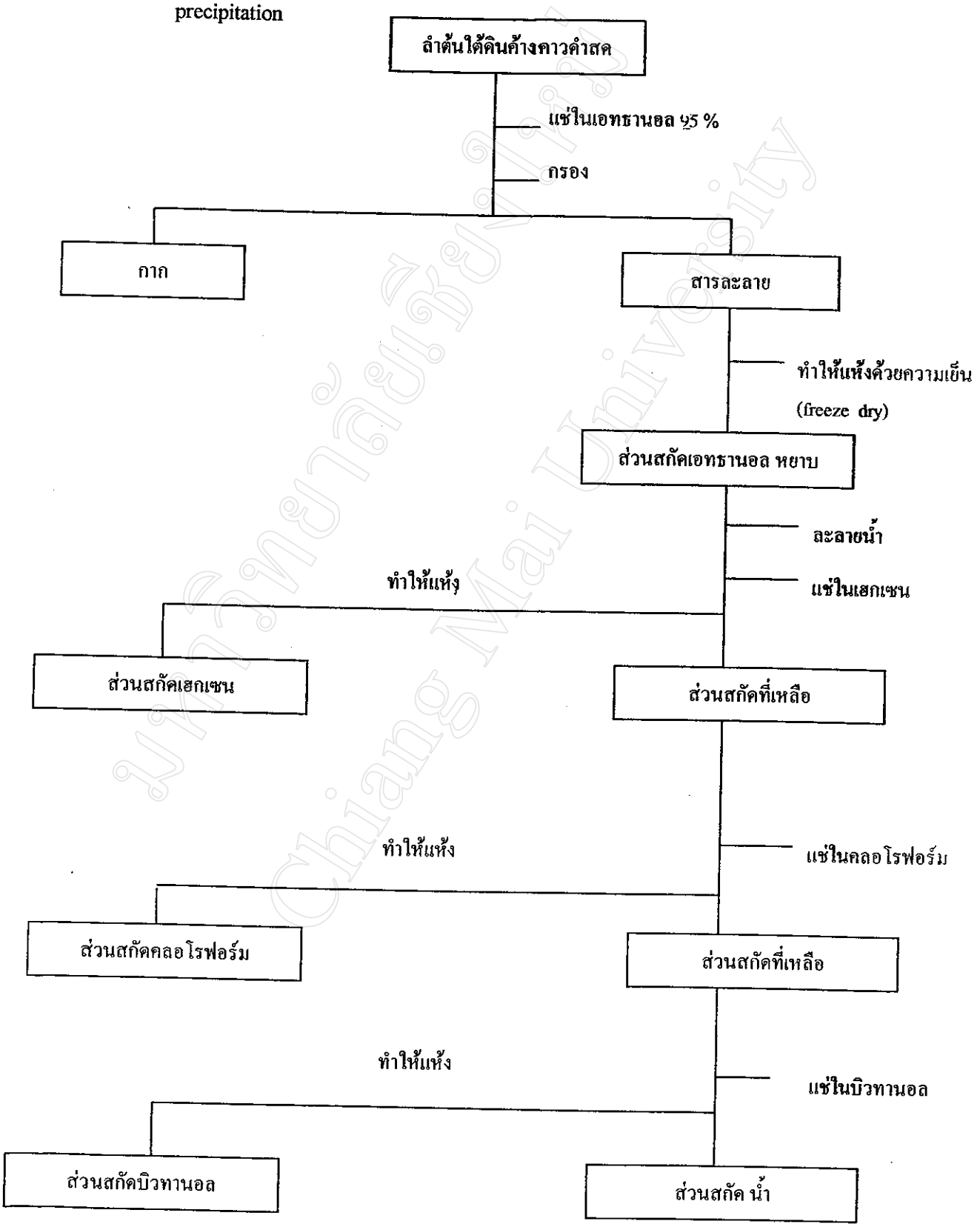
3.2.3 การทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

สภาวะที่ใช้ทดลองเป็นดังนี้

- เฟสคงที่ ใช้ ซิลิกาเจล 60 G
- เฟสเคลื่อนที่ใช้ เฮกเซน, เฮกเซน / ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน , ไดคลอโรมีเทน/ อะซีโตน และ อะซีโตน
- วิธีการตรวจวัดสาร โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบผิวบาง ตรวจวัดด้วยการตรวจสอบค่า Rf บนแผ่น TLC ซึ่งรมด้วยไอของไอโอดีน
- การแยก โดยเตรียมคอลัมน์ ใส่สารสกัดหยาบลงไป ชะด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ (developing solvent) ทำการเก็บสารละลายที่ไหลออกมาครั้งละ 10 ml. จัดกลุ่มสารที่ ได้โดยการตรวจสอบค่า Rf บนแผ่น TLC

3.2.4 การแยกสารกึ่งบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบที่ได้จากค้างคาวดำโดยนำสารสกัดหยาบจากค้างคาวดำที่ได้จากการทดลอง 3.1.1 ไปแยกด้วยวิธี solvent / solvent precipitation (นันทวัน, 2534) โดยแยกสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ตามไดอะแกรม (ภาพที่ 8) โดยสารสกัดหยาบละลายในตัวทำละลายแต่ละชนิดและแยกชั้นกับน้ำ เก็บส่วนสกัดแต่ละส่วน มาระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ จนได้สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ภาพที่ 8 ไดอะแกรมแสดงการแยกสารสกัดหยาบจากค้างคาวดำด้วยวิธี solvent / solvent precipitation



3.3 การทดสอบยืนยันฤทธิ์ของสารสกัดหยาบกึ่งบริสุทธิ์ในระดับห้องปฏิบัติการโดยวิธีเลือกกิน (leaf disk bioassay)

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้จากข้อ 3.2.3 และ 3.2.4 ในการยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผักและผลกระทบต่อการเจริญเติบโตในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยวิธีเลือกกิน (two - chioce leaf disk bioassay) วัดพื้นที่ใบที่เหลือจากการกัดกินของหนอนด้วยเครื่องวัดพื้นที่ใบแล้วนำไปคำนวณค่า antifeedant index (AFI) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมีทั้งหมด 3 การทดลองย่อย แต่ละการทดลอง แบ่งเป็นความเข้มข้น 4 ระดับ (0-100 %) และจำนวนซ้ำ 4 ซ้ำ

การทดลองย่อยที่ 1 สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากค้างคาวดำ ที่ความเข้มข้น 0.01%, 0.1%, 0.5%, และ 1%

การทดลองย่อยที่ 2 สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากดีปลี ที่ความเข้มข้น 0.01%, 0.1%, 0.5%, และ 1%

การทดลองย่อยที่ 3 สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากค้างคาวดำผสมดีปลี ในอัตราส่วน 1 : 1, 5 : 1 และ 50 : 1 ที่ความเข้มข้น 0.01%, 0.1%, 0.5%, และ 1%

หลังการทดลองสิ้นสุดนำหนอนกระทู้ผักที่รอดตายมาเลี้ยงต่อ เพื่อศึกษาความเป็นพิษและผลกระทบในระยะยาวของสารสกัดจากพืชต่อการเจริญเติบโตของหนอน และตัวเต็มวัย บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนหนอนที่ตายที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่า Oral LC_{50} และ OralLC_{90} ของแต่ละสารที่มีต่อหนอนกระทู้ผัก โดยใช้โปรแกรม Logit PC และบันทึกจำนวนหนอนที่เข้าดักแด้ได้เป็นปกติและผิดปกติ จำนวนตัวเต็มวัยที่ปกติและผิดปกติ

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพและผลกระทบของสารสกัดจากค้างคาวดำและดีปลีในสภาพแปลงปลูก

3.4.1 พืชทดลอง

ปลูกคะน้าโดยวิธีย้ายปลูกต้นกล้าอายุ 24 วัน หลังจากเพาะเมล็ด ลงบนแปลงทดลอง ขนาด 1 x 12 เมตร ระยะปลูก 15 x 15 เซนติเมตร ระหว่างการเจริญเติบโตมีการให้น้ำตามปกติและใส่ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) แปลงละ 25 กรัม เมื่อหลังย้ายปลูก 7 วัน และฉีดพ่นปุ๋ยปลาอัตราส่วน 5 ซีซี/น้ำ 5 ลิตร เมื่อหลังย้ายปลูก 14 วัน และเก็บเกี่ยวคะน้าเมื่ออายุ 60 วัน

3.4.2 ปัจจัยศึกษา

กรรมวิธีที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มุ่งเน้นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากค้างคาวดำและดีปลี กับสารธรรมชาติเพื่อป้องกันกำจัดแมลงที่มีการซื้อขายในท้องตลาด ได้แก่สาร azadiracthin จากผลสะเดา และสาร permethrin ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์เลียนแบบสาร pyrethrin

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completly randomized design) โดยมีทั้งหมด 6 กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำ ได้แก่

Control	=	น้ำเปล่า
TACC II	=	สารสกัดจากค้างคาวดำและดีปลี สูตร 1 (อัตราส่วน 5:1)
TACC III	=	สารสกัดจากค้างคาวดำและดีปลี สูตร 2 (อัตราส่วน 50:1)
MIX	=	สารสมุนไพรรวม
AZT	=	สาร azadirachtin ทางการค้า
PYR	=	สารไพรีทรอยด์สังเคราะห์

3.4.3 วิธีการทดลอง

หลังจากย้ายปลูกคะน้า 24 วัน เมื่อต้นพืชตั้งตัวได้พ่นสารครั้งที่ 1 หลังจากนั้นพ่นสารอีกเป็นระยะๆ ระยะเวลาห่างกัน 1 สัปดาห์ รวมทำการพ่นสารทั้งหมด 4 ครั้ง โดยพ่นตอนเย็น ในแต่ละกรรมวิธีผสมสารเพิ่มประสิทธิภาพการจับใบลงไปด้วยในอัตรา 5 มิลลิลิตรต่อ 20 ลิตร เครื่องพ่นสารใช้ระบบแบบอัดอากาศเพียงครั้งเดียว (compressed air sprayer) (รังสิต, 2523) หลังจากพ่นสารครั้งสุดท้ายเว้นระยะไว้อีก 7 วันจึงเก็บเกี่ยว

3.4.4 การบันทึกข้อมูล

โดยสุ่มตัวอย่างแปลงละ 10 ต้น บันทึกข้อมูลก่อนการพ่นสารทดลองแต่ละครั้ง

ภาพที่ 9 แปลงปลูกคะน้า

ก. ผลต่อการเจริญเติบโตของคะน้า

1.ความสูง โดยวัดจากโคนต้นจนถึงปลายใบที่ยาวที่สุด หน่วยวัดเป็นเซนติเมตร

ข. ผลต่อปริมาณผลผลิตคะน้า

1.น้ำหนักสดและแห้งของส่วนเหนือดิน (ลำต้นและใบ)

2.น้ำหนักสดและแห้งของราก

3.น้ำหนักสดของส่วนที่บริโภคได้

ค. ประสิทธิภาพการป้องกันกำจัดแมลง

โดยสุ่มตัวอย่างแปลงละ 10 ต้น บันทึกข้อมูลก่อนการพ่นสารทดลองแต่ละครั้ง ตรวจนับประชากรแมลงศัตรูพืชที่พบเห็น เช่น หนอนกระทู้ผัก หนอนใยผัก เพลี้ยอ่อน หนอนคืบ ด้วงหมัดผัก เป็นต้น

ง. ผลต่อสรีรวิทยาคะน้า

1. วัดอัตราการสังเคราะห์แสง , ค่าความต้านทานปากใบ และอัตราการคายน้ำโดยใช้เครื่อง CIRAS – 1 PORTABLE PHOTOSYNTHESIS SYSTEM TUTORAL (PP SYSTEMS) เพื่อวัดอัตราการสังเคราะห์แสง, ค่าความต้านทานปากใบ และอัตราการคายน้ำ หลังจากพ่นสารครั้งที่ 3 เป็นเวลา 1 วัน ในต้นคะน้าอายุ 38 วัน โดยวัดที่ตำแหน่งใบคะน้าที่ 3 (นับจากใบแรกที่คลี่สมบูรณ์แล้ว) โดยสุ่มวัดต้นคะน้า 4 ต้น ในแต่ละกรรมวิธี ระหว่างเวลา 9:00 10:00 13:00 และ 15:00 น.
2. ปริมาณคลอโรฟิลล์ ทำการวิเคราะห์เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ตามวิธีการของ Procter (1981) และดัดแปลงโดย Schaffer and Gaye (1989) (รายละเอียดวิธีการแสดงในภาคผนวก)
3. ปริมาณ total non-structural carbohydrate (TNC) ตามวิธี Nelson's reducing procedure หน่วยวัดเป็น มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (สุจริต, 2531) (รายละเอียดวิธีการแสดงในภาคผนวก)

ระยะเวลาการทำวิจัย

ตั้งแต่เดือน กุมภาพันธ์ 2544 ถึง พฤศจิกายน 2545

สถานที่ทำวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการพืชเครื่องเทศและพืชสมุนไพร ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. แปลงเพาะปลูกผักของเกษตรกร