

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

วัสดุพันธุ์พืช วัสดุพันธุ์พืชที่ใช้ได้แก่ ผลลำไยพันธุ์ดอที่แก่จัดในระยะตัดจำหน่าย จากสวนของเกษตรกรในเขตจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำพูน โดยขนส่งมายังห้องปฏิบัติการภายใน 12 ชั่วโมงหลังจากเก็บเกี่ยว พันธุ์ที่นำมาถึงห้องปฏิบัติการ คัดเลือกผลที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ไม่มีตำหนิจากโรคและแมลงมาใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดสี ยี่ห้อ Hunter Lab รุ่น color quest XE
 2. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (digital refractometer) ยี่ห้อ Atago รุ่น PR-101
 3. เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น Model PB 3002-S
 4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (heat circulate water bath) ยี่ห้อ รุ่น Model YCW-010
 5. ตู้แช่เย็น (incubator) ยี่ห้อ Sanyo รุ่น NIR-533
 6. ตู้ถ่ายเชื้อ
 7. หม้อนึ่งความดันไอ () ยี่ห้อ รุ่น
 8. กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Olympus
 9. กล้องถ่ายรูป (digital still camera) ยี่ห้อ Sony รุ่น DSC-P72
 10. Micropipette ยี่ห้อ Biohit ของ GIBTHAI
 11. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
- สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ didecyl dimethyl ammonium bromide (DDAB), imazalil, Sunfresh, Sta-fresh 310, Chitosan (ยี่ห้อ Difco)
อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ potato dextrose agar (PDA)

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการของสถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว และห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ตั้งแต่เดือนมกราคม 2547 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2548

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ทดสอบประสิทธิภาพของสาร DDAB ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าลำไยในห้องปฏิบัติการ

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาประสิทธิภาพของ DDAB เปรียบเทียบกับ imazalil ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ

แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ซึ่งมี 5 ซ้ำของการทดลอง ประกอบด้วยชุดการทดลองทั้งหมด 7 ชุด ดังนี้

1. DDAB (Sunclean) 0.2%
2. DDAB (Sunclean) 0.33%
3. DDAB (Sunclean) 1%
4. imazalil 0.1%
5. imazalil 0.15%
6. imazalil 0.2%
7. น้ำกลั่น

วิธีการทดลอง

ผสมสารแต่ละชนิดในอาหาร PDA ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายตามต้องการ จากนั้นเทอาหารที่ผสมสารเรียบร้อยแล้วลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petridish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ย้ายเส้นใยของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าลำไย ซึ่งได้แก่ *Cladosporium* sp. *Lasiodiplodia* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. ที่แยกเชื้อบริสุทธิ์จากผลลำไยที่มีอาการเน่าโดยใช้เส้นใยบริเวณปลายโคโลนีด้วย cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางบน

จุดศูนย์กลางของอาหารที่เตรียมไว้ บ่มเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิห้อง (25±2 องศาเซลเซียส) ทำการวัด ทุกๆ วันเว้นวันจนเสร็จสิ้นการทดลอง โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาผลของ DDAB เปรียบเทียบกับ imazalil ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อ น้ำป่นเปลือกลำไยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ซึ่งมี 5 ซ้ำของการทดลอง ประกอบด้วยชุดการทดลองทั้งหมด 7 ชุด ดังนี้

1. DDAB (Sunclean) 0.2%
2. DDAB (Sunclean) 0.33%
3. DDAB (Sunclean) 1%
4. imazalil 0.1%
5. imazalil 0.15%
6. imazalil 0.2%
7. น้ำกลั่น

วิธีการทดลอง

สุ่มตัดข้าวและเปลือกลำไย 1 กรัม เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นทิ้งไว้ให้ตกตะกอน คูดน้ำป่นลำไยมา 0.1 มิลลิลิตร ผสมลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 0.9 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเจือจางลง 10 เท่า และลดความเข้มข้นของสารลงอีก 10 เท่า ลดหลั่นตามลำดับ 5 ลำดับ จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น $1/10$, $1/10^2$, $1/10^3$, $1/10^4$ และ $1/10^5$ (w/v) จากนั้นนำสารละลายที่ได้มา 0.1 มิลลิลิตร หยอดลงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารเคมีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เกลี่ยให้ทั่วจานอาหาร บ่มเชื้อไว้ภายใต้อุณหภูมิห้อง (25±2 องศาเซลเซียส) บันทึกจำนวนโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ในวันที่ 7

การทดลองที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของ DDAB เปรียบเทียบกับ imazalil และน้ำร้อนในการควบคุมโรคบนผลลำไยหลังการเก็บเกี่ยว

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาผลของน้ำร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ในการควบคุมโรคบนผลลำไย

แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ซึ่งมี 5 ซ้ำของการทดลอง ประกอบด้วยชุดการทดลองทั้งหมด 4 ชุด ดังนี้

1. น้ำ (อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส)
2. น้ำ (อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส)

3. น้ำ (อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส)

4. น้ำ (อุณหภูมิห้อง)

วิธีการทดลอง

ทำการจุ่มผลลำไยในน้ำที่อุณหภูมิห้อง, 48, 50 และ 52 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที โดยใช้ลำไยที่จุ่มในน้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นชุดควบคุม จากนั้นฝั่งลมให้แห้ง แล้วจัดเรียงผลลำไยบนถาดโฟมถาดละ 10 ผล หุ้มถาดโฟมที่บรรจุผลลำไยแล้วด้วยพลาสติก polyvinyl chloride (PVC) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุกๆ วัน ที่อุณหภูมิห้อง และทุกๆ 3 วัน ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จนกระทั่งผลลำไยมีการเกิดโรค 25 เปอร์เซ็นต์ สังเกตเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและการเปลี่ยนแปลงของสีผิวบนเปลือกลำไย

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาผลของ DDAB เปรียบเทียบกับ imazalil ในการควบคุมโรคบนผลลำไยหลังเก็บเกี่ยว

แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ซึ่งมี 5 ซ้ำของการทดลอง ประกอบด้วยชุดการทดลองทั้งหมด 7 ชุด ดังนี้

1. DDAB (Sunclean) 0.2%
2. DDAB (Sunclean) 0.33%
3. DDAB (Sunclean) 1%
4. imazalil 0.1%
5. imazalil 0.15%
6. imazalil 0.2%
7. น้ำกลั่น

วิธีการทดลอง

ทำการจุ่มผลลำไยในสารแต่ละชนิด นาน 5 นาที โดยใช้ลำไยที่จุ่มในน้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นชุดควบคุม จากนั้นฝั่งลมให้แห้ง แล้วจัดเรียงผลลำไยบนถาดโฟมถาดละ 10 ผล หุ้มถาดโฟมที่บรรจุผลลำไยแล้วด้วยพลาสติก polyvinyl chloride (PVC) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุกๆ วัน ที่อุณหภูมิห้อง และทุกๆ 3 วัน ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จนกระทั่งผลลำไยมีการเกิดโรค 25 เปอร์เซ็นต์ สังเกตเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและการเปลี่ยนแปลงของสีผิวบนเปลือกลำไย

การทดลองที่ 2.3 ผลของประสิทธิภาพร่วมระหว่างน้ำร้อนและ DDAB เปรียบเทียบกับ imazalil ในการควบคุมโรคบนผลลำไยหลังเก็บเกี่ยว

แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ซึ่งมี 5 ซ้ำของการทดลอง ประกอบด้วยชุดการทดลองทั้งหมด 12 ชุด ดังนี้

1. น้ำ (อุณหภูมิห้อง)
2. น้ำ (อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส)
3. น้ำ (อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส)
4. น้ำ (อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส)
5. DDAB (Sunclean) 1% (อุณหภูมิห้อง)
6. DDAB (Sunclean) 1% (อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส)
7. DDAB (Sunclean) 1% (อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส)
8. DDAB (Sunclean) 1% (อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส)
9. imazalil 0.2% (อุณหภูมิห้อง)
10. imazalil 0.2% (อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส)
11. imazalil 0.2% (อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส)
12. imazalil 0.2% (อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส)

วิธีการทดลอง

ทำการจุ่มผลลำไยในสารแต่ละชนิด นาน 5 นาที โดยใช้ลำไยที่จุ่มในน้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นชุดควบคุม จากนั้นผึ่งลมให้แห้ง แล้วจัดเรียงผลลำไยบนถาดโฟมถาดละ 10 ผล หุ้มถาดโฟมที่บรรจุผลลำไยแล้วด้วยพลาสติก polyvinyl chloride (PVC) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุกๆ วัน ที่อุณหภูมิห้อง และทุกๆ 3 วัน ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จนกระทั่งผลลำไยมีการเกิดโรค 25 เปอร์เซ็นต์ สังเกตเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและการเปลี่ยนแปลงของสีผิวบนเปลือกลำไย

ข้อมูลที่ใช้การศึกษา

เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค

วัดความเสียหายที่เกิดจากโรคบนผลลำไยโดยการประเมินด้วยตาเปล่าบริเวณผิวผลและเปลือกผลโดยพิจารณาจากการปรากฏของเส้นใยของเชื้อรา แล้วหาเปอร์เซ็นต์จำนวนผลที่เกิดโรคจากสูตร ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์จำนวนผลที่เกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนผลที่เกิดโรค}}{\text{จำนวนผลทั้งหมด}} \times 100$$

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีผิวของเปลือกลำไย

วัดการเปลี่ยนแปลงสีผิวด้วยใช้เครื่องวัดสี (color quest XE) โดยวัดสีผิวที่เปลือกผล บริเวณกึ่งกลางผลทั้ง 2 ด้าน ทั้งเปลือกนอกและเปลือกในผล รวม 10 ซ้ำต่อกรรมวิธี ค่าที่ได้จากการวัดแสดงในรูปของค่า L^* , C^* , และ h° ดังนี้

L^* = The lightness factor value เป็นค่าแสดงถึงความสว่างของวัตถุ ถ้า L เข้าใกล้ 0 แสดงว่าวัตถุมีสีทึบ ถ้าค่า L เข้าใกล้ 100 แสดงว่าวัตถุมีสีสว่าง ถ้า L เท่ากับ 100 วัตถุจะมีสีขาว

C^* = chroma โดยค่า C มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ หมายถึงวัตถุมีสีซีดจาง (เทา) หากมีค่าเข้าใกล้ 60 วัตถุมีสีเข้ม

h° = hue angle ซึ่งเท่ากับ arctangent b^*/a^* เมื่อค่า h มีค่าเข้าใกล้มุม 90 องศา สีของวัตถุ จะอยู่ในกลุ่มเหลือง (+b) หากมีค่าเข้าใกล้ 180 องศา สีของวัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีเขียว (-a)

การทดลองที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพของ DDAB เปรียบเทียบกับ imazalil และน้ำร้อนกับสารเคลือบผิวในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวบนผลลำไย

แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ซึ่งมี 5 ซ้ำของการทดลอง ประกอบด้วยชุดการทดลองทั้งหมด 8 ชุด ดังนี้

1. DDAB (Sunclean) 1% (อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) ร่วมกับ Sunfresh 5%
2. DDAB (Sunclean) 1% (อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) ร่วมกับ Sta-fresh 310 5%
3. DDAB (Sunclean) 1% (อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) ร่วมกับ Chitosan 0.5%
4. DDAB (Sunclean) 1% (อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส)
5. Sta-fresh 310 5%
6. Sunfresh 5%
7. Chitosan 0.5%
8. น้ำ (อุณหภูมิห้อง)

วิธีการทดลอง

จากการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในการทดลองที่ 2.3 พบว่าการใช้สาร DDAB (Sunclean) 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสพบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยที่สุดจึงนำสารดังกล่าวมาทำการศึกษาคือ โดยทำการจุ่มผลลำไยในสาร นาน 5 นาที จากนั้นผึ่งลมให้แห้งแล้วทำการจุ่มผลลำไยในสารเคลือบผิว นาน 5 นาที โดยใช้ลำไยที่จุ่มในน้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นชุด

ควบคุม จากนั้นจึงลมนให้แห้ง แล้วจัดเรียงผลลำไยบนถาดโพลีเอทิลีน 10 ผล หุ้มถาดโพลีเอทิลีนที่บรรจุผลลำไยแล้วด้วยพลาสติก polyvinyl chloride (PVC) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุกๆ วัน ที่อุณหภูมิห้อง และทุกๆ 3 วัน ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จนกระทั่งผลลำไยมีการเกิดโรค 25 เปอร์เซ็นต์หรือมีคะแนนการประเมินคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสอยู่ในระดับที่ไม่สามารถยอมรับได้ โดยมีบันทึกการเปลี่ยนแปลงทางคุณภาพของผลลำไยดังนี้ คือ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค การเปลี่ยนแปลงสีผิวของเปลือกผลลำไย เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของผู้บริโภค และอายุในการเก็บรักษา

การตรวจคุณภาพของผลลำไย

เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค

วัดความเสียหายที่เกิดจากโรคบนผลลำไยโดยการประเมินด้วยตาเปล่าบริเวณข้าวผลและเปลือกผลโดยพิจารณาจากการปรากฏของเส้นใยของเชื้อรา แล้วหาเปอร์เซ็นต์จำนวนผลที่เกิดโรคจากสูตร ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์จำนวนผลที่เกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนผลที่เกิดโรค}}{\text{จำนวนผลทั้งหมด}} \times 100$$

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีผิวของเปลือกผลลำไย

วัดการเปลี่ยนแปลงสีผิวด้วยใช้เครื่องวัดสี (color quest XE) โดยวัดสีผิวที่เปลือกผลบริเวณกึ่งกลางผลทั้ง 2 ด้าน ทั้งเปลือกนอกและเปลือกในผล รวม 10 ซ้ำต่อกรรมวิธี ค่าที่ได้จากการวัดแสดงในรูปของค่า L^* , C^* , และ h° ดังนี้

L^* = The lightness factor value เป็นค่าแสดงถึงความสว่างของวัตถุ ถ้า L เข้าใกล้ 0 แสดงว่าวัตถุมีสีทึบ ถ้าค่า L เข้าใกล้ 100 แสดงว่าวัตถุมีสีสว่าง ถ้า L เท่ากับ 100 วัตถุจะมีสีขาว

C^* = chroma โดยค่า C มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ หมายถึงวัตถุมีสีซีดจาง (เทา) หากมีค่าเข้าใกล้ 60 วัตถุมีสีเข้ม

h° = hue angle ซึ่งเท่ากับ arctangent b^*/a^* เมื่อค่า h มีค่าเข้าใกล้มุม 90 องศา สีของวัตถุจะอยู่ในกลุ่มเหลือง (+b) หากมีค่าเข้าใกล้ 180 องศา สีของวัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีเขียว (-a)

เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก

วัดการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของผลลำไย โดยชั่งน้ำหนักของผลลำไยทีละ 1 ผล และ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่สูญเสียไป ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่สูญเสียไป} = \frac{\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักวันที่ต้องการวัด}}{\text{น้ำหนักวันเริ่มต้น}} \times 100$$

ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids) ในน้ำคั้น วัดปริมาณโดยใช้ digital refractometer ซึ่งปรับศูนย์ด้วยน้ำกลั่น อ่านค่าเป็นเปอร์เซ็นต์บริกซ์ (% Brix)

การประเมินคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของผู้บริโภค

ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 5 คน ซึ่งเป็นชุดเดียวกันตลอดการทดลองทุกครั้ง ซึ่งสามารถระบุความแตกต่างของลักษณะที่ปรากฏภายนอกและรสชาติลำไยได้เป็นอย่างดี สำหรับการกำหนดคะแนนจะใช้ตามแบบที่ดัดแปลงจาก พรวิสาข์ (2544) ดังนี้

ลิเป็ลือกด้านนอก (Profile test)

- 1 = สีน้ำตาลทั้งผล (สีน้ำตาล 100% ของผล)
- 2 = สีเหลืองปนน้ำตาล (สีน้ำตาล 50% ของผล)
- 3 = สีเหมือนลำไยสด
- 4 = สีเหลือง

ลิเป็ลือกด้านใน (Profile test)

- 1 = สีฝืดปกติมาก
- 2 = สีฝืดปกติเล็กน้อย
- 3 = สีปกติ

รสชาติ (Profile test)

- 1 = มีรสชาติฝืดปกติ
- 2 = มีรสชาติฝืดปกติเล็กน้อย แต่ยังยอมรับได้
- 3 = มีรสชาติลำไยสด ไม่มีรสชาติฝืดปกติ

กลิ่นขณะรับประทาน (Profile test)

- 1 = มีกลิ่นแปลกปลอม และ/หรือ ไม่พึงประสงค์
- 2 = มีกลิ่นแปลกปลอม และ/หรือ ไม่พึงประสงค์เล็กน้อย แต่ยังสามารถรับได้
- 3 = มีกลิ่นลำไส้ดี ไม่มีกลิ่นแปลกปลอม และ/หรือ ไม่พึงประสงค์

สำหรับคะแนนการชิมแบบ scoring test ของสีเปลือกด้านนอก สีเปลือกด้านใน รสชาติ กลิ่น และ

คุณภาพโดยรวม จะมีระดับการให้คะแนนดังนี้

- 1 = ไม่ชอบมากที่สุด
- 2 = ไม่ชอบปานกลาง
- 3 = เฉยๆ
- 4 = ชอบปานกลาง
- 5 = ชอบมากที่สุด

อายุการเก็บรักษา

ใช้เกณฑ์พิจารณาอายุในการเก็บรักษาดังนี้

- 6.1 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ต้องมีค่าการเกิดโรคน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์
- 6.2 การประเมินคุณภาพการบริโภค

คะแนนการประเมินแบบ profile เกี่ยวกับสีเปลือก กลิ่น และรสชาติ มีค่าเฉลี่ยไม่น้อยกว่า 2 คะแนนการประเมินแบบ scoring ในทุกด้านต้องมีค่าเฉลี่ยไม่น้อยกว่า 2.5