บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. สัตว์ทดลอง

หนอนใยผัก *Plutella xylostella* L. จากแหล่งปลูกผักแปลงเกษตรกร อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี

2. พืชทดลอง

สาบเสือ *Chromolaena odorata* (L.) จากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่

คะน้า *Brassica oleracea* var. *alboglabra* Bail. เพาะปลูกที่กองวัตถุมีพิษ กรมวิชาการเกษตร ซึ่งไม่มีการใช้สารฆ่าแมลง

3. วัสดุและอุปกรณ์

เครื่องกวนด้วยแท่งแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer)

เครื่องกลั่นด้วยไอน้ำ (liquid-liquid extractor)

เครื่อง gas liquid chromatography ของ Hewlett packard รุ่น 5890

เครื่องปั่นละเอียด (blender)

เครื่องสกัดซอกซ์เลต (soxhlet extractor)

เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (rotatory vacuum evaporator)

เครื่อง spectrophotometer ของ Hitachi รุ่น U-2,000

เครื่อง ultracentrifuge รุ่น Centricon T-1080

กล่องพลาสติก ขนาด 6x8x3 นิ้ว

กล่องพลาสติก ขนาด 3x2x0.8 นิ้ว

กระดาษ thermal paper

โกร่งบด

หลอด centrifuge ขนาด 10 มิลลิลิตร

4. สารเคมี

absolute ethanol

aldrin

dichloronitrobenzene (DCNB) ของ Aldrich D6,880-0

diethyl maleate (DEM) ของ Sigma M5887

ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) ของ Fluka R02295

glycerol ของ Fluka R1383

glucose 6 - phosphate ของ Sigma P6888

glucose 6 - phosphate dehydrogenase ของ Sigma G4134

hexane

hydrochloric acid (HCl)

liquid nitrogen

nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) ของ Sigma N3880

paranitrophenyl acetate (PNPA) ของ Sigma N8130

piperonyl butoxide (PB) ของ Fluka R04115

polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) ของ Fluka R03588

sodium hydroxide (NaOH)

triphenyl phosphate (TPP) ของ Fluka R04074

trishydroxymethyl amino-methane ของ Sigma T1503

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเลี้ยงหนอนใยผัก *Plutella xylostella* L.

นำหนอนใยผัก *Plutella xylostella* L. จากแหล่งปลูกผักแปลงเกษตรกร เขตอำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี มาเลี้ยงโดยให้พืชอาหารคือผักคะน้า ซึ่งเพาะปลูกโดยวิธีปลอดจากสารฆ่าแมลง เปลี่ยน

คะน้าทุกวันจนหนอนเข้าดักแด้ นำดักแด้ไปใส่ไว้ในกรงผสมพันธุ์ เพื่อขยายพันธุ์ ระยะดักแด้ใช้เวลา 3 -4 วัน เมื่อเจริญเป็นตัวเต็มวัยแล้วนำต้นกล้าของคะน้าที่เพาะไว้มาใส่ในกรงผสมพันธุ์ประมาณ 7 วัน เพื่อให้ผีเสื้อวางไข่ เปลี่ยนต้นกล้าของคะน้าทุกวัน นำต้นกล้าของคะน้าที่มีไข่ของผีเสื้อเก็บในกล่องพลาสติกเพื่อรอให้ไข่ฟักออกมาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 ซึ่งจะกินต้นกล้าของคะน้าจนเข้าสู่ตัวอ่อนระยะที่ 2 จึงนำใบคะน้ามาเป็นพืชอาหารและทำการเปลี่ยนทุกวันจนหนอนเข้าดักแด้ หนอนจะเข้าดักแด้บริเวณฝาและผนังของกล่องพลาสติกที่เลี้ยง รวบรวมดักแด้และดำเนินการขยายจำนวนประชากรต่อไป

2. การสกัดสารจากใบสาบเสือ *Chromolaena odorata* (L.)

เก็บใบสาบเสือ *Chromolaena odorata* (L.) จากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ นำมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแห้งแล้วนำไปปั่นให้ละเอียด เพื่อนำมาสกัดสารที่มีอยู่ในใบสาบเสือ

2.1 การสกัดสารจากใบสาบเสือโดยวิธีหมัก

นำใบสาบเสือที่ปั่นละเอียดมาใส่น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1 หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชม. กรองเอากากออก เก็บสารละลายที่ได้จากการหมักไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

2.2 การสกัดสารจากใบสาบเสือโดยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำ

นำใบสาบเสือที่ปั่นละเอียด 500 กรัม เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำไปสกัดสารโดยเครื่องกลั่นด้วยไอน้ำ เก็บสารละลายที่ได้จากการสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

2.3 การสกัดสารจากใบสาบเสือโดยวิธีการสกัดซอกซ์เลต (soxhlet extraction)

2.3.1 การสกัดสารจากใบสาบเสือโดยวิธีการสกัดซอกซ์เลต ซึ่งมี ethanol เป็นตัวทำละลาย

นำใบสาบเสือที่ปั่นละเอียด 50 กรัม ไปสกัดด้วยเครื่องสกัดซอกซ์เลต โดยใช้ absolute ethanol 500 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการสกัดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (rotatory vacuum evaporator) เก็บส่วนของสารที่ได้จากการระเหยตัวทำละลายออกไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

2.3.2 การสกัดสารจากใบสาบเสือโดยวิธีการสกัดซอกซ์เลต ซึ่งมี hexane เป็นตัวทำละลาย

นำใบสาบเสือที่ปั่นละเอียด 50 กรัม ไปสกัดด้วยเครื่องสกัดซอกซ์เลต โดยใช้hexane 500 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการสกัดไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (rotatory vacuum evaporator) เก็บส่วนของสารที่ได้จากการระเหยตัวทำละลายออกไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

3. การศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดโดยวิธีต่างๆ ต่อหนอนใยผัก

เป็นการทดสอบเบื้องต้น เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดโดยวิธีการต่างๆ กัน คือ โดยวิธีการหมักซึ่งมีน้ำเป็นตัวทำละลาย วิธีกลั่นด้วยไอน้ำ และวิธีการสกัดซอกซ์เลตซึ่งมี ethanol และ hexane เป็นตัวทำละลาย เลือกวิธีสกัดสารจากใบสาบเสือที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดและช่วงความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสม เพื่อนำไปศึกษาระดับเอนไซม์ขจัดพิษของหนอนใยผักต่อไป การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ในแต่ละกลุ่มทำการทดลอง 5 ซ้ำ

วิธีการทดลอง

ใช้การทดสอบแบบจุ่มใบ (leaf dipping bioassay)

1. เตรียมสารสกัดจากใบสาบเสือ ดังนี้

- สารสกัดจากใบสาบเสือโดยวิธีการหมักซึ่งมีน้ำเป็นตัวทำละลาย ความเข้มข้น 25, 50, 75 และ 100% (v/v)
- สารสกัดจากใบสาบเสือโดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ ความเข้มข้น 25, 50, 75 และ 100% (v/v)
- สารสกัดจากใบสาบเสือโดยวิธีการสกัดซอกซ์เลตซึ่งมี ethanol เป็นตัวทำละลาย ความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 และ 2.00% (w/v)
- สารสกัดจากใบสาบเสือโดยวิธีการสกัดซอกซ์เลตซึ่งมี hexane เป็นตัวทำละลาย ความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 และ 1.50% (w/v)

2. ตัดใบคะน้าที่ปลูกประมาณ 30 วัน เป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว จุ่มลงในสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดโดยวิธีการต่างๆที่ระบุไว้ในแต่ละการทดลอง ซึ่งใส่สารจับใบ 1 หยด เป็นเวลา 30 วินาที นำไปผึ่งให้แห้ง เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออก เมื่อแห้งแล้วนำไปใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 3x2x0.8 นิ้ว ซึ่งมีกระดาษซับรองอยู่

3. นำหนอนใยผักระยะที่ 3 จำนวน 10 ตัว ผ่านการอดอาหาร 2 ชม. ปล่อยลงบนใบคะน้าที่ชุบสารสกัดจากใบสาบเสือดังกล่าว เปลี่ยนใบคะน้าทุก 24 ชม. ตรวจนับเปอร์เซนต์การตายของหนอนใยผักที่ 72 ชม.

4. การศึกษาระดับเอนไซม์ขจัดพิษของหนอนใยผัก

4.1 การทดสอบหนอนใยผักกับสารสกัดจากใบสาบเสือโดยวิธีการสกัดซอกซ์เลตซึ่งมี ethanol เป็นตัวทำละลายและสารสกัดจากใบสาบเสือผสมกับ synergists

การทดลองเพื่อศึกษาระดับเอนไซม์ขจัดพิษของหนอนใยผัก 3 รุ่น เมื่อได้รับสารสกัดจากใบสาบเสือโดยใช้วิธีการสกัดซอกซ์เลต ซึ่งมี ethanol เป็นตัวทำละลาย และได้รับสารสกัดจากใบสาบเสือดังกล่าวผสมกับ synergists 3 ชนิด คือ

1. diethyl maleate (DEM)
2. piperonyl butoxide (PB)
3. triphenyl phosphate (TPP)

โดยใช้วิธีทดสอบแบบจุ่มใบ (leaf dipping bioassay) การทดลองนี้วางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ในแต่ละกลุ่มทำการทดลอง 5 ซ้ำ ดังนี้

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารสกัดจากใบสาบเสือดังนี้ คือ

- สารสกัดจากใบสาบเสือความเข้มข้น 0.00, 0.05, 0.25 และ 0.5% (w/v)
- สารสกัดจากใบสาบเสือความเข้มข้น 0.00, 0.05, 0.25 และ 0.5% (w/v) ผสมกับ diethyl maleate ความเข้มข้น 0.1% ทุกความเข้มข้น
- สารสกัดจากใบสาบเสือความเข้มข้น 0.00, 0.05, 0.25 และ 0.5% (w/v) ผสมกับ piperonyl butoxideความเข้มข้น 0.1% ทุกความเข้มข้น
- สารสกัดจากใบสาบเสือความเข้มข้น 0.00, 0.05, 0.25 และ 0.5% (w/v) ผสมกับ triphenyl phosphate ความเข้มข้น 0.1% ทุกความเข้มข้น

2. นำใบคะน้าที่ปลูกประมาณ 30 วัน มาชุบสารสกัดจากใบสาบเสือดังกล่าว ใส่สารจับใบ 1หยด เป็นเวลา 30 วินาที นำมาผึ่งให้แห้งแล้วใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 6x8x3 นิ้ว ที่มีกระดาษซับรองอยู่

3. นำหนอนใยผักระยะที่ 3 มาปล่อยลงบนใบคะน้าที่ชุบสารสกัดจากใบสาบเสือดังกล่าว เปลี่ยนใบคะน้าทุกวันจนหนอนเข้าสู่ระยะที่ 4

4. นำหนอนใยผักระยะที่ 4 มาสกัดและตรวจวัดระดับเอนไซม์ ส่วนหนอนใยผักที่เหลือเลี้ยงจนหนอนเข้าดักแด้เพื่อนำมาทดลองในรุ่นที่ 2 และ 3 ต่อไป

4.2 การสกัดเอนไซม์ของหนอนใยผัก

วิธีการสกัด

1. ชั่งหนอนใยผักระยะที่ 4 ที่ทดสอบด้วยใบคะน้าชุบสารสกัดจากใบสาบเสือในแต่ละการทดลอง 0.5 กรัม และ polyvinylpolypyrrolidone 0.25 กรัม ใส่ลงในโกร่งบดที่แช่เย็น บดให้ละเอียดโดยค่อย ๆ เติม 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.5

2. เมื่อบดละเอียด กรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวที่กรองได้ใส่ในหลอด centrifuge

3. นำหลอด centrifuge ไปปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge ความเร็ว 18,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที

4. ดูดส่วนใสข้างบน (supernatant) ไว้ นำมาใส่หลอดไมโครทิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวัด esterase ส่วนที่เหลือนำมาใส่หลอด centrifuge

5. นำหลอด centrifuge ไปปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ความเร็ว 52,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

6. ดูดส่วนใสข้างบน (supernatant) ใส่ในหลอดไมโครทิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวัด glutathione S-transferase

7. นำส่วนตะกอน (pellet) มาบดใน 0.2M EDTA ผสมกับ 20% glycerol phosphate buffer เพื่อนำไปวัด monooxygenase (Visetson, 1992)

4.3 การตรวจวัดระดับเอนไซม์ขจัดพิษของหนอนใยผัก

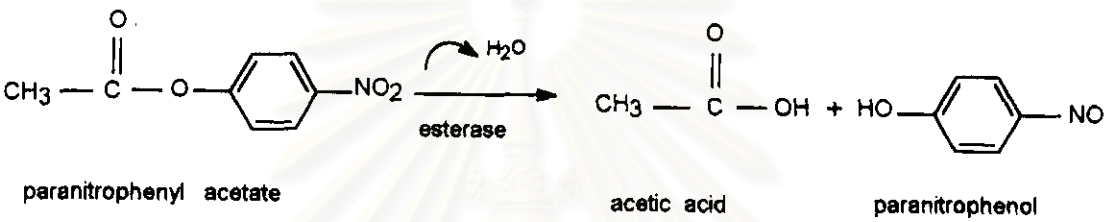
การศึกษาครั้งนี้ทำการตรวจวัดระดับเอนไซม์ขจัดพิษ 3 ชนิด คือ

1. esterase
2. glutathione S-transferase
3. monooxygenase

ซึ่งมีวิธีการตรวจวัดดังนี้

4.3.1 การตรวจวัดระดับ esterase

การตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของ paranitrophenol โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา hydrolysis ของ paranitrophenyl acetate เปลี่ยนไปเป็น paranitrophenol โดยมี esterase เป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยา (Mackness et al. , 1983)



paranitrophenyl acetate — acetic acid — paranitrophenol

วิธีการตรวจวัด

หลอด reference ประกอบด้วย

- 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.5 = 2900 µl
- 0.1 M potassium phosphate + EDTA + GSH pH 7.5 = 50 µl
- PNPA = 50 µl

หลอด sample ประกอบด้วย

- 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.5 = 2900 µl
- enzyme = 50 µl
- PNPA = 50 µl

นำไปตรวจวัด esterase โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร

4.3.2 การตรวจวัดระดับ glutathione S-transferase

การตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของ monochloronitrobenzene-glutathion โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา conjugation ของ dichloronitrobenzene กับ glutathion โดยมี glutathione S-transferase เป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยา (Booth et al., 1961)

dichloronitrobenzene monochloronitrobenzene - glutathione

วิธีการตรวจวัด

หลอด reference ประกอบด้วย

- trishydroxymethylamino-methane + GSH pH8.1	=	1100 µl
- 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.5	=	200 µl
- DCNB	=	10 µl

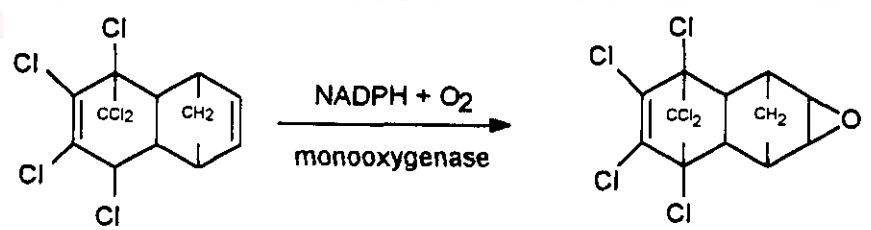
หลอด sample ประกอบด้วย

- trishydroxymethylamino-methane + GSH pH8.1	=	1100 µl
- enzyme	=	200 µl
- DCNB	=	10 µl

นำไปตรวจวัด glutathione S-transferase โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

4.3.3 การตรวจวัดระดับ monooxygenase

การตรวจวัดปริมาณ dieldrin โดยใช้เครื่อง gas liquid chromatography ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา oxidation ของ aldrin เปลี่ยนไปเป็น dieldrin (Wolff et al., 1979)



aldrin dieldrin

วิธีการตรวจวัด

1. นำ 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.5 มา 3.4 ml ใส่ glucose-6-phosphate dehydrogenous + NADP + glucose-6-phosphate 0.5 ml. แล้วใส่ enzyme 1ml.

2. ใส่ aldrin 100 µl. เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติม 2 ml. ของ 3mhcl แล้วเติม hexane 10 ml. เขย่าตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น เมื่อแยกชั้นแล้วนำส่วนบนมาตรวจวัด monooxygenase โดยใช้ Gas liquid chromatography

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองโดยวิธี Probit analysis เพื่อหาค่า LC_{50} ของสารสกัดจากใบสาบเสือต่อหนอนใยผัก โดยใช้โปรแกรม SPSS

2. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ Analysis of variance เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราการตายและระดับเอนไซม์ของหนอนใยผักในแต่ละตัวอย่างทดลองที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย