

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

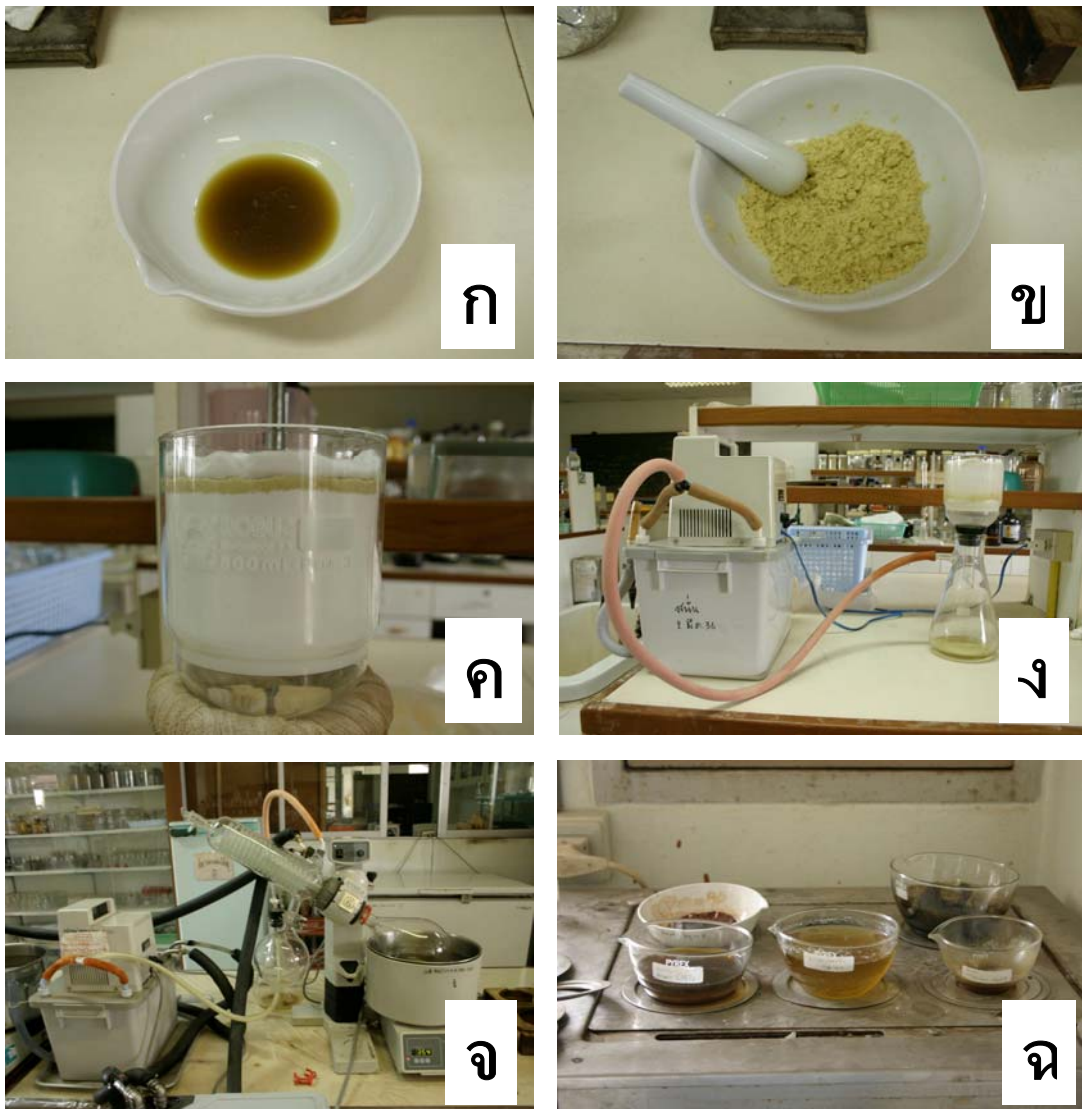
1. การแยกลำดับส่วน (fractionate) ของสารสกัดด้วย n-hexane จากเมล็ดสะเดาช้าง ด้วยวิธีการ quick column chromatography

การแยกลำดับส่วนของสารสกัด มีอยู่หลายวิธีด้วยกัน การแยกลำดับส่วนของสารสกัดหยาบด้วย n-hexane จากเมล็ดสะเดาช้างในครั้งนี้ใช้วิธีการ quick column chromatography โดยใช้ stationary phase เป็นของแข็ง (solid) คือ silica gel ส่วน mobile phase เป็นของเหลว (liquid) คือ n-hexane , chloroform , ethyl acetate และ methanol นำ silica gel 250 กรัม บรรจุลง sintered glass นำสารสกัดหยาบด้วย n-hexane จากเมล็ดสะเดาช้าง (ภาพที่ 4ก) จำนวน 20 กรัม มาผสมกับ silica gel คลุกเคล้าให้เข้ากัน แล้วบดจนเป็นผง (ภาพที่ 4ข) เทลงบนผิวหน้าของ silica gel ใน sintered glass กดให้แน่น นำสำลีมาปิดทับด้านบนเพื่อป้องกันการพังทลายของผิวหน้า (ภาพที่ 4ค) หลังจากนั้นทำการชะล้าง (eluting) สารด้วยตัวทำละลายทั้งหมด 4 ชนิด ตัวทำละลายชนิดที่ 1 คือ n-hexane ทำการริน n-hexane จำนวน 200 มิลลิลิตรอย่างช้า ๆ ลงใน sintered glass รอจน n-hexane ซึมลงใน silica gel จนหมด แล้วทำการเชื่อมต่อกับปั๊มเพื่อการดูดสารละลายออกจาก silica gel สารละลายที่ได้จะไหลลงในภาชนะรองรับ (ภาพที่ 4ง) รอจนกระทั่งไม่มีสารไหลลงมา แล้ว จึงทำการถอดการเชื่อมต่อกับปั๊มออก ทำซ้ำจนใช้ n-hexane ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำสารที่ได้เทออกจากภาชนะรองรับ ไปเก็บไว้ในขวดชมพู แล้วทำการชะล้าง ต่อด้วยตัวทำละลายชนิดที่สอง คือ chloroform โดยใช้วิธีการเดียวกันเป็นจำนวน 1,000 มิลลิลิตร และตัวทำละลายชนิดสุดท้ายคือ methanol เป็นจำนวน 1,000 มิลลิลิตร จะได้สารออกมา 4 ส่วนด้วยกัน นำสารที่ได้ในแต่ละส่วนไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง evaporator (ภาพที่ 4จ) ที่อุณหภูมิ 30-35 C° เพื่อแยกเอาตัวทำละลายออก และนำสารที่ได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายที่อาจเหลืออยู่ด้วย water bath (ภาพที่ 4ฉ) จนได้สารที่ไม่มีตัวทำละลายเหลืออยู่ทำซ้ำจนได้ปริมาณในแต่ละส่วนมีปริมาณเพียงพอต่อการทดลอง

2. การเลี้ยงเพิ่มปริมาณแมลงวันแดงในห้องปฏิบัติการ

ทำการรวบรวมแมลงวันแดงในระยะต่าง ๆ ที่เข้าทำลายบวบ แดงกวา และแตงแคนดาสูบ จากสภาพธรรมชาติในแปลงทดลองภาควิชาการจัดการศัตรูพืช และแปลงเกษตรกรในเขตตำบลบางเหริย อำเภอกวนเนียง จังหวัดสงขลา มาเลี้ยงจนกลายเป็นตัวเต็มวัย ทำการเลี้ยงตัวเต็มวัยในกรงเลี้ยงแมลงที่ทำด้วยตาข่ายไนลอนขนาด 20 x 25 x 30 เซนติเมตร ด้วยสารละลายน้ำผึ้ง

10 เปอร์เซ็นต์ น้ำ และยีสต์ผสมน้ำตาล อัตรา 1 : 1 เมื่อครบ 12 วันหลังจากออกจากคักแต่้แมลงวันแดงก็จะเริ่มจับคู่ผสมพันธุ์ปล่อยให้แมลงวางไข่โดยใช้วิธีการล่อให้แมลงวางไข่ในผลแดง แล้วแยกไข่ไปเลี้ยงในภาชนะที่บรรจุอาหารเทียม โดยใช้วิธีการและสูตรอาหารของแสน ดิควัฒนานนท์ (2529) แล้วนำภาชนะไปวางไว้บนส่วนผสมของขี้เลื่อยด้วยวิธีการร่อน นำคักแต่้ที่ได้ใส่ไว้ในกรงเลี้ยงแมลงจนกลายเป็นตัวเต็มวัย ทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณแมลงวันแดงต่อให้มีปริมาณที่เพียงพอที่จะใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 4 สารสกัดด้วย n-hexane จากเมล็ดสะเดาซึ่ง (ก) การผสมสารกับ silica gel (ข) การวางส่วนต่าง ๆ ลงใน column (ค) การชะล้างสารด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ (ง) การระเหยให้แห้งด้วยเครื่อง evaporation (จ) การระเหยตัวทำละลายที่อาจเหลืออยู่ด้วย water bath (ฉ)

3. การทดสอบความเข้มข้น และระยะเวลาของส่วนแยกย่อยของสารสกัดหยาบด้วย n-hexane จากเมล็ดสะเดาซึ่ง ที่ออกฤทธิ์ในการขับไล่แมลงวันแดง

ส่วนแยกย่อยต่าง ๆ และสารสกัดหยาบด้วย n-hexane จากเมล็ดสะเดาซึ่ง ที่นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการไล่แมลงวันแดงนี้มี 5 รูปแบบ คือ ส่วนแยกย่อยด้วย n-hexane ส่วนแยกย่อยด้วย chloroform ส่วนแยกย่อยด้วย ethyl acetate ส่วนแยกย่อยด้วย methanol และสารสกัดหยาบด้วย n-hexane จากเมล็ดสะเดาซึ่ง เจือจางสารทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10,000, 25,000, 50,000, 75,000 และ 100,000 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยใช้ acetone เป็นตัวทำละลาย

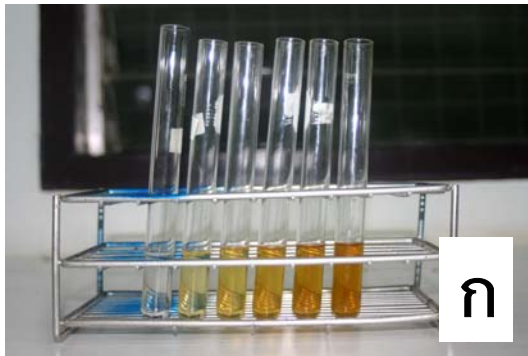
กรงทดลอง เป็นกรงรูปทรงสี่เหลี่ยมจตุรัสขนาด 30 x 30 x 30 เซนติเมตร ด้านข้าง 4 ด้านทำด้วยแผ่นพลาสติกใส เจาะรูตรงกลางเป็นรูปทรงกลมด้านใดด้านหนึ่ง และติดถุงตาข่าย เพื่อทำเป็นทางเข้าออกของกรง ด้านล่างปิดด้วยพลาสติกห่อปกหนังสือ และด้านบนปิดด้วยมุ้งตาข่าย ใช้กรงทดลองทั้งหมด 24 กรงทดลอง

วัสดุการเกาะของแมลงวันแดง โดยการนำเอาผลอ่อนของแคนตาลูปที่มีอายุประมาณ 10 วัน หลังจากดอกร่วง และไม่มีรอยทำลายของแมลงวันมาล้างน้ำสะอาด ผ่าเป็น 2 ซีก ตามความยาว ใช้เข็มหมุดเจาะรูบนผิวของแคนตาลูปจำนวน 50 รู หลังจากนั้นชุบเนื้อด้านในออกด้วยช้อนให้เหลือแต่เปลือก และใช้แผ่นพาราฟิล์มห่อด้านล่างเพื่อรักษาความชื้น แล้วนำไปวางบน plate

แมลงวันแดงสำหรับการทดลอง ใช้แมลงวันแดงที่มีอายุ 14 วัน หลังจากออกจากดักแด้ นำแมลงวันแดงเพศผู้ และเพศเมียซึ่งพร้อมจะผสมพันธุ์มาไว้ในกรงเดียวกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแมลงวันแดงไปใส่ในกรงทดลองจำนวน 10 ตัว ต่อ 1 กรงทดลอง ประกอบด้วยเพศเมีย และเพศผู้ อย่างละ 5 ตัว ปล่อยให้แมลงอดอาหาร 12 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลอง และให้อาหารทุก ๆ 12 ชั่วโมงในช่วงการทดสอบเพื่อป้องกันไม่ให้แมลงตายระหว่างการทดสอบเนื่องจากอดอาหาร

ทำการทดสอบโดยใช้แผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 6 สิ่งทดลอง คือ ส่วนแยกย่อยด้วย n-hexane นำมาเตรียมเป็น 5 ระดับความเข้มข้นคือ 10,000, 25,000, 50,000, 75,000 และ 100,000 มิลลิกรัม/ลิตร และชุดควบคุม 1 ชุด โดยใช้ acetone เป็นตัวทำละลาย (ภาพที่ 5ก) สิ่งทดลองละ 4 ซ้ำ โดยใช้วิธีการทดสอบแบบไม่ให้แมลงมีทางเลือก คือ ใน 1 กรงทดสอบจะมีสิ่งทดลองที่ใช้ล่อแมลงเพียงสิ่งทดลองเดียว และแยกชุดควบคุมไว้ต่างหาก ใช้ผลอ่อนของแคนตาลูปที่ได้เตรียมไว้ (ภาพที่ 5ข) พ่นสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยเครื่อง potter tower sprayer (ภาพที่ 5ค) 1 ชั้นต่อ 1 ความเข้มข้น ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวางบริเวณตรงกลางของกรงทดลองที่ได้เตรียมไว้ 1 ชั้น ต่อ 1 กรงทดสอบ (ภาพที่ 5ง) จากนั้นนำไปวางใน

ห้องทดลอง (ภาพที่ 5จ) บันทึกจำนวนแมลงที่เข้ามาเกาะ (ภาพที่ 5ฉ) เมื่อเวลาผ่านไป 1, 3, 6, 9, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้เวลาในการนับครั้งละ 10 นาที



ภาพที่ 5 สารละลายของส่วนแยกย่อยด้วย n-hexane ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เรียงจากน้อยไปหามาก (ก) ลักษณะผลอ่อนที่ใช้ในการทดสอบ (ข) เครื่อง potter tower sprayer (ค) การวางสิ่งล่อในกรงทดสอบ (ง) การวางกรงในห้องทดลอง (จ) ลักษณะการเกาะของแมลงวัน (ฉ)

จากนั้นจึงนำจำนวนการเข้าเกาะผลอ่อนของแมลงวันแดงมาหาเปอร์เซ็นต์การไล่แมลงโดยใช้สมการ (Nagpal *et.al.*, 2001)

$$PR = [(MC - ME) / MC] \times 100$$

โดย PR = เปอร์เซ็นต์การไล่แมลง

MC = จำนวนแมลงที่นับได้จากชุดควบคุม

ME = จำนวนแมลงที่นับได้จากสิ่งทดลองในแต่ละความเข้มข้น

นำเปอร์เซ็นต์การไล่แมลงที่ได้ดังกล่าว มาหาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละสิ่งทดลองด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) รวมถึงหาค่าเฉลี่ยเพื่อนำไปคำนวณหาค่า EC_{50} ด้วยวิธี probit analysis

การทดสอบหาความเข้มข้น และระยะเวลาการออกฤทธิ์ของส่วนแยกย่อยด้วย chloroform ส่วนแยกย่อยด้วย ethyl acetate ส่วนแยกย่อยด้วย methanol และสารสกัดหยาบด้วย n-hexane จากเมล็ดสะเดาข้าง ใช้วิธีการและการดำเนินการเช่นเดียวกับส่วนแยกย่อยด้วย n-hexane

4. การทดสอบส่วนแยกย่อยของสารสกัดหยาบด้วย n-hexane จากเมล็ดสะเดาข้าง ที่มีฤทธิ์ในการขับไล่แมลงวันแดงที่เหมาะสม ในแปลงทดลอง

แปลงที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เป็นแปลงของไร่ SMT ที่อำเภอพะเยาหะคีรี จังหวัดนครสวรรค์ (ภาพที่ 6ก) วิธีการปลูกมีดังนี้ ทำการเพาะเมล็ดแดงแคนตาลูปในถาดหลุม โดยใช้ peat moss เป็นวัสดุในการเพาะนำดินกล้าที่ได้ ไปปลูกในพื้นที่ที่เตรียมไว้ ซึ่งมีผ้าพลาสติกคลุมแปลง และมีระบบการให้น้ำแบบน้ำหยดอยู่ใต้ผ้าพลาสติก มีระยะห่างระหว่างต้น 45 เซนติเมตร และระหว่างแถว 100 เซนติเมตร ปักค้ำโดยใช้ไม้ไผ่ และมัดไม้ไผ่ตามขวาง 2 ชั้น ที่ระดับ 75 และ 150 เซนติเมตร ใช้เชือกฟางผูกระหว่างไม้ตามขวางทั้งสอง เมื่อต้นโตจะนำดินมาพันกับเชือกดังกล่าว ตลอดระยะเวลาปลูกมีการตัดต้าง และใส่ปุ๋ยตามความเหมาะสม ไร่ผลผลิตต้นละ 1 ลูก บริเวณข้อที่ 8-10 พร้อมกับห่อผล ส่วนต้นที่จะทำการทดลองจะไว้ต้นละ 3 ลูก บริเวณข้อที่ 12-20 เมื่อไว้ลูกแล้วจะเด็ดยอดทิ้ง

ส่วนแยกย่อย (fraction) ของสารสกัดด้วย n-hexane จากเมล็ดสะเดาข้าง ที่นำมาทดสอบการขับไล่แมลงวันแดงในแปลงทดลองมี 2 รูปแบบ คือ ส่วนแยกย่อยด้วย n-hexane ซึ่งเป็นส่วนแยกย่อยที่ให้ผลในการไล่ที่เหมาะสม และสารสกัดหยาบด้วย n-hexane (ภาพที่ 6ข) เตรียมสารทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นที่ระดับให้ค่า EC_{50} โดยใช้ acetone เป็นตัวทำละลาย และมีการใช้ควบคู่กับสารเพิ่มประสิทธิภาพ คือ Latron CS-7[®] ในอัตราส่วนที่ฉลากระบุ

แผ่นรองรับ (ภาพที่ 6ก) นำแผ่นฟิวเจอร์บอร์ดสีดำขนาดหนา 0.4 เซนติเมตร มาตัดเป็นรูปวงกลมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร แล้วนำผ้าหางกระรอกสีดำซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดซับได้ดีติดลงบนแผ่นฟิวเจอร์บอร์ดจำนวน 2 ชั้น เย็บด้วยลวดเย็บกระดาษ ตัดผ้าส่วนที่เกินจากฟิวเจอร์บอร์ดออก นำแผ่นรองรับไปติดตั้งที่ไม้ไผ่ในบริเวณที่ทำการทดลอง โดยที่แผ่นรองรับจะอยู่สูงจากพื้นประมาณ 75 เซนติเมตร และอยู่ระหว่างต้นแดงแคนตาลูปโดยมีจำนวนต้นทางซ้ายและสูงจากพื้นประมาณ 75 เซนติเมตร และอยู่ระหว่างต้นแดงแคนตาลูปโดยมีจำนวนต้นทางซ้ายและทางขวาเท่ากัน แต่ละแผ่นห่างกันเป็นระยะทาง 2 เมตร และใช้แผ่นรองรับ 1 แผ่นต่อ 1 หนึ่งสิ่งทดลอง

ทำการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ Randomize Completed Block Design (RCB) ประกอบด้วย 5 สิ่งทดลองดังนี้

1. สารสกัดหยาดด้วย n- hexane EC₅₀ (27,260 มิลลิกรัม/ลิตร)
2. สารสกัดหยาดด้วย n- hexane EC₅₀ (27,260 มิลลิกรัม/ลิตร) + Latron CS-7[®]
3. ส่วนแยกย่อยด้วย n- hexane EC₅₀ (77,841 มิลลิกรัม/ลิตร)
4. ส่วนแยกย่อยด้วย n-hexane EC₅₀ (77,841 มิลลิกรัม/ลิตร) + Latron CS-7[®]
5. ชุดควบคุม

มีจำนวนซ้ำ 4 ซ้ำ (block) ในหนึ่งสิ่งการทดลองจะใช้ต้นแดงแคนตาลูปทั้งหมด 12 ต้น ซึ่งอยู่ฝั่งเดียวกับแผ่นรองรับ 6 ต้น และตรงข้ามอีก 6 ต้น ทดลองโดยการเทสารที่เตรียมไว้จำนวน 10 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง แล้วฉีดพ่นสารด้วยเครื่องพ่นละอองน้ำ (foggy) ไปที่แผ่นรองรับให้ทั่วทั้งแผ่นทุก ๆ 7 วัน ฉีดทั้งหมด 3 ครั้ง ทำการนับจำนวนผลอ่อนปกติ และที่ถูกทำลายทั้งหมด ก่อนการฉีดทุกครั้ง และบันทึกผล ลักษณะการทำลาย แสดงดังภาพที่ 6(ง)

จากนั้นจึงนำผลที่บันทึกได้จากการนับจำนวนผลอ่อนที่ถูกทำลาย มาหาเปอร์เซ็นต์การทำลาย แล้วนำเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การลดการทำลายโดยใช้สมการ (Nagpal *et.al.*, 2001)

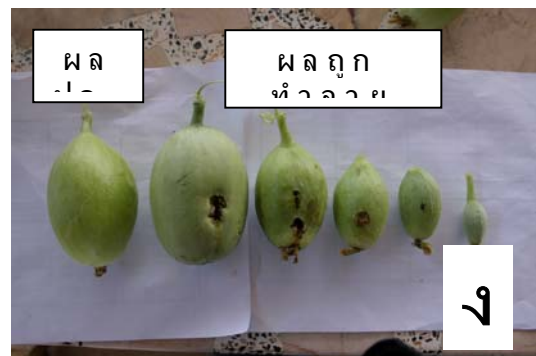
$$PR = [(MC - ME) / MC] \times 100$$

โดย PR = เปอร์เซ็นต์การลดการทำลาย

MC = เปอร์เซ็นต์การทำลายจากชุดควบคุม

ME = เปอร์เซ็นต์การทำลายจากสิ่งทดลองในแต่ละความเข้มข้น

นำผลเปอร์เซ็นต์การทำลาย และเปอร์เซ็นต์การไล่แมลงที่ได้ดังกล่าว ไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละสิ่งทดลองด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 6 ลักษณะแปลงที่ทำการทดลอง (ก) สารสกัดสะเดา และส่วนแยกย่อย n-hexane (ข) ลักษณะแผ่นรองรับสาร (ค) ลักษณะการทำลายของแมลงวันแดงเปรียบเทียบกับปกติ (ง)