บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุในการทดลอง

พันธุ์ข้าวเหนียวก่ำพันธ์พื้นเมืองที่รวบรวมจากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ จำนวนทั้งหมด 31 พันธุ์ และพันธุ์ข้าวเปรียบเทียบ 2 พันธุ์ (ตาราง 3.1)

ตาราง 3.1 แสดงสายพันธุ์ข้าวเหนียวก่ำทั้ง 31 พันธุ์ และพันธุ์เปรียบเทียบ 2 พันธุ์

Varieties	
1. ก่ำเวียงสา (Kum wiengsa)	18. ก่ำ 5153 (Kum 5153)
2. ก่ำดอยมูเซอ (Kum doi moosoeur)	19. ก่ำ 88061 (Kum 88061)
3. ก่ำน่าน (Kum nan)	20. ก่ำ 87046 (Kum 87046)
4. ก่ำดอยสะเก็ด (Kum doi saket)	21. ก่ำสุพรรณ (Kum Supan)
5. ก่ำนา (Kum na)	22. ก่ำเวียดนาม (Kum Vietnam)
6. ก่ำพะเยา (Kum phayao)	23. ก่ำหกสาลี (Kum Hoksalee)
7. ก่ำฝาง (Kum Fang)	24. ก่ำS0901 (S0901)
8. ก่ำ 19959 (Kum 19959)	25. ก่ำS0902 (S0902)
9. ก่ำ 19104 (Kum 19104)	26. ก่ำS0903 (S0903)
10. ก่ำ 99151 (Kum 99151)	27. ก่ำS0904 (S0904)
11. ก่ำ 7677 (Kum 7677)	28. ก่ำS0905 (S0905)
12. ก่ำ 89038 (Kum 89038)	29. ก่ำS0906 (S0906)
13. ก่ำ 87090 (Kum 87090)	30. ก่ำS0907 (S090)
14. ก่ำ 89057 (Kum 89057)	31. ก่ำS090ค (S090ค)
15. ก่ำ 87061 (Kum 87061)	32. ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105 ; Check)
16. ก่ำ 88083 (Kum 88083)	33. กข 6 (RD6 ; Check)
17. ก่ำ 88069 (Kum 88069)	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 สถานที่ทดลอง

งานวิจัยนี้ทำที่แปลงทดลอง สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ แปลงวิจัยพืชไร่ ณ ศูนย์วิจัย สาธิตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อปี พ.ศ. 2552-2553

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การวางแผนการทดลอง

ทำการปลูกข้าวเหนียวก่ำแต่ละพันธุ์จำนวน 31 พันธุ์ โดยมีข้าวขาวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ กข 6 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ โดยเริ่มปลูก เมื่อเดือนกรกฎาคม – ธันวาคม 2552 ปักดำกอละ 2-3 ต้น ระยะปักดำ 25x25 เซนติเมตร ในการดูแลรักษาแปลงทดลองนั้น ใส่ปุ๋ยรองพื้นสูตร 16-20-0 หลังอายุข้าวประมาณ 30 วัน ครั้งที่ 2 ใส่เมื่อต้นข้าวอายุได้ 55 วัน หลังปักดำ

การทดลองนี้ได้ดำเนินการทดลอง ที่แปลงทดลองสาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ดูแลรักษา กำจัดวัชพืช ป้องกันโรคและแมลงตามความเหมาะสม

3.3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตามมาตรฐานสีต้นข้าวแบบบันทึก descriptors for rice ของ IBPGR-IRRI (1980) โดยบันทึกลักษณะดังนี้

1. ระยะแตกกอ 6 ลักษณะ คือ ได้แก่ สีแผ่นใบ (leaf blade) สีกาบใบ (leaf sheath) สีเขี้ยวกันแมลง (auricle) สีเยื่อกันน้ำฝน (ligule) สีข้อ (node) และสีปล้อง (internode)

2. ระยะออกรวง 3 ลักษณะ คือ สีเกสรตัวเมีย (stigma) สีปลายยอดดอก (apiculus) และสีกลีบรองดอก (inner glumes)

3. ระยะเก็บเกี่ยว 3 ลักษณะ คือ สีเปลือกเมล็ด (husk) สีเยื่อหุ้มเมล็ด (pericap) และการปรากฏของหาง (present of awn)

3.3.3 การศึกษาความแตกต่างของการปริมาณสารโปรแอนโธไซยานิน (Proanthocyanin)

หาปริมาณสารโปรแอนโธไซยานินในเมล็ดข้าวเหนียวก่ำกล้องของแต่ละสายพันธุ์ ตามวิธีของ Abdel-Aal *et al.* (1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เก็บตัวอย่างเมล็ดทุกต้นแล้วทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดในแต่ละพันธุ์ จากนำไปสกัดสารโปรแอนโธไซยานิน โดยบดเมล็ดข้าวเหนียวก่ำกล้อง และชั่งข้าวที่บดจำนวน 3 กรัม ใส่ใน centrifuge tube ขนาดความจุ 50 มิลลิลิตร เติมสาร acidified ethanol (ethanol และ HCl 1 *N* 85:15 v/v) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้น ปรับค่า pH ให้เป็น 1 โดย 4 *N* HCl แล้วเขย่าต่ออีก 15 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย ความเร็วรอบ 27,200 g เป็นเวลา 15 นาที นำสารสกัดที่ได้ไปในขวดปรับปริมาตร ปรับปริมาตรด้วยสาร acidified ethanol ให้มีปริมาตร เป็น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยอ่านค่า absorbance ที่ความยาวคลื่นแสง 535 นาโนเมตร และทำกราฟมาตรฐานของสารไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ความเข้มข้น 0-48 ไมโครกรัม ในสาร ethanol 3 มิลลิลิตร นำไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่นแสง 535 นาโนเมตร แล้วนำไปคำนวณหาค่าปริมาณสารโปรแอนโธไซยานินตามสมการดังนี้

$$C = (A/B \times (vol/1{,}000) \times MW \times (1/\text{sample wt}) \times 10^6)$$

$$C = (A/25{,}\ 965) \times (50/1{,}000) \times 499 \times (1/3) \times 10^6$$

$$C = A \times 288.21 \text{ mg/kg}$$

เมื่อ C = concentration of total anthocyanin (mg/kg)

B = molar absorptivity (Cyanidin 3-glucoside = 25,965 cm^{-1} M^{-1})

Vol = total volume of anthocyanin extract

MW = molecular weight of cyanidin 3-glucoside = 449

3.3.4 การศึกษาความแตกต่างของการสะสมสารไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์

วิธีการวิเคราะห์ไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์

เก็บตัวอย่างเมล็ดข้าวทุกต้นแล้ว ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดในแต่ละพันธุ์จากนำไปสกัดไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ในส่วนของเมล็ด โดยวิธีของ (Ryu *et al*., 1998) นำตัวอย่างของข้าวเหนียวก่ำจำนวน 1 กรัม มาสกัดในสารสกัด 0.5%TFA- 95%EtOH ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องเขย่าเป็นเวลา 9 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) ตัวอย่างที่สกัดได้นำมากรองเอากากเบื้องต้นโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นกำจัดสิ่งปนเปื้อน ซ้ำอีกครั้งโดยใช้ C_{18} cartridge (กรองสารสกัดเก็บไว้ประมาณ 10 มิลลิลิตร) นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ในเครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography) ยี่ห้อ Shimadzu เพื่อวัดปริมาณสารไซยานิดิน โดยใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คอลัมน์ Allure C_{18} 5μM ความยาวคอลัมน์ 250 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ที่ mobile phase A คือ 0.1%TFA-H_2O และ mobile phase B คือ 0.1%TFA-MeOH เปลี่ยน mobile phase A ไปเป็น B โดยใช้สมการเส้นตรงจาก 0.1%TFA-H_2O ไปเป็น 0.1%TFA-MeOH ใช้เวลา 30 นาที ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์และเปรียบเทียบไซยานิ-ดินมาตรฐานต่อไป

3.3.5 การศึกษาความแตกต่างของการสะสมสารฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ตามวิธีของ Folin and Ciocalteu, 1927

เก็บตัวอย่างเมล็ดทุกต้นแล้วทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวเหนียวก่ำแต่ละพันธุ์ จากนำไปสกัดโดยทำการเจือจางสารสกัด นำตัวอย่างของข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมือง 1 กรัม มาสกัดในสารเอทานอล 85%- HCl ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้น ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Folin Ciocalteu reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (เจือจางอัตราส่วน 1:1 ระหว่างสารละลายและน้ำกลั่น) ร่วมกับ 10% Na_2CO_3 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง วัดปฏิกิริยาด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำค่าที่ได้จากน้ำกลั่น และสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิคความเข้มข้นต่างๆ มาทำกราฟมาตรฐานเพื่อใช้เปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้จาการสกัด และคำนวณความเข้มข้นของสารสกัดในรูปของมิลลิกรัมของกรดแกลลิคสมมูลต่อ 100 กรัม

3.3.6การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity)

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ตามวิธีของ Brand-William *et al*., 1995

เตรียมสารละลายของ DPPH ที่ความเข้มข้น 0.08 มิลลิโมล ในสารละลายเอทานอล 100% หลังจากนั้นผสมสารละลาย DPPH, tris buffer solution และ 80% เอทานอล ในอัตราส่วน 1: 1: 1 เพื่อให้ได้สารผสมปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารสกัดจากตัวอย่างปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร (ในกรณีของสารมาตรฐานให้เติมสารมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ลงไปแทนสารสกัดจากตัวอย่าง โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน) ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2.4 มิลลิลิตร บ่มปฏิกิริยาไว้นาน 30 นาที ในที่มืด วัดปฏิกิริยาโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 525 นาโนเมตร หน่วยวัดมีค่าเท่ากับ ไมโครโมลาร์ Trolox ต่อกรัมตัวอย่าง (μM TE/g sample)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.5 การศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณสารโปรแอนโธไซยานิน ไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ สารฟีนอลิกทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของปริมาณสารโปรแอนโธไซยานิน ปริมาณไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการวิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of variance) แต่ละข้อมูลโดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และ กข 6 และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ $P < 0.05$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved