

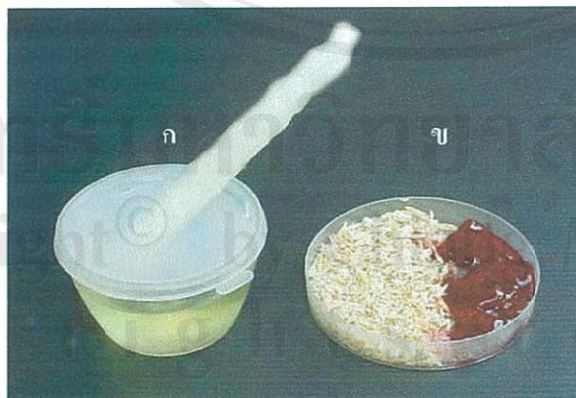
บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ความเป็นพิษของสารสกัดกวางเครือขาวต่อตัวเต็มวัยแมลงวันบ้าน

1.1 การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณแมลงวันบ้าน

แมลงวันบ้านที่ใช้ในการทดลองได้มาจากคักแค้ที่เลี้ยงในสภาพห้องปฏิบัติการของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ นำมาเลี้ยงในสภาพห้องปฏิบัติการของภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยใช้กรงเลี้ยงแมลงขนาด 30×30×30 เซนติเมตร ซึ่งหุ้มด้วยผ้ามุ้งสีขาว ภายในกรงเลี้ยงมีถ้วยพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5 เซนติเมตร สูง 8 เซนติเมตร ใช้สำหรับบรรจุอาหารของตัวเต็มวัยแมลงวันบ้านซึ่งประกอบด้วย สารละลายน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์ ที่มีส่วนผสมของวิตามินรวม (ชนิดน้ำตาล nutroplex ซึ่งมีส่วนประกอบ คือ วิตามิน เอ วิตามิน ดี วิตามิน บี 2 วิตามิน บี 6 วิตามิน บี 12 nicotinamide, ferric ammonium citrate, calcium glycerophosphate และ manganese glycerophosphate) การเตรียมสารละลายน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งน้ำตาลทราย 100 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นอุ่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรและเติมวิตามินรวม 15 มิลลิลิตรลงไป การให้สารละลายน้ำตาลแก่แมลงวันบ้านทำได้โดยนำหลอดพลาสติกที่พันสำลีจุ่มลงในถ้วยพลาสติกที่มีฝาเจาะรูสำหรับใส่ก้านสำลี (ภาพที่ 4 ก) ซึ่งจะเปลี่ยนทุก 3 วัน และให้ด้บบหมูดที่หั่นเป็นชิ้นบาง ๆ และอาหารแห้งที่มีส่วนผสมของรำข้าวและเกลบในอัตราส่วน 1 : 1 โดยน้ำหนัก (ภาพที่ 4 ข) ส่วนอาหารในระยะหนอนเป็นอาหารที่มีส่วนผสมของรำข้าว เกลบ ด้บบหมูด และน้ำ ในอัตราส่วน 2 : 1 : 1 : 1 โดยน้ำหนัก



ภาพที่ 4 ภาพขณะบรรจุอาหารสำหรับตัวเต็มวัยแมลงวันบ้าน

(ก) สารละลายน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์ (ข) อาหารแห้งและด้บบหมูด

1.2 การเตรียมผงกาวเครื่องขาวป่นแห้งเพื่อใช้ในการสกัด

นำหัวกาวเครื่องขาวที่เก็บจากอำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย ที่ระดับความสูง 420 เมตรจากระดับน้ำทะเล มาปอกเปลือก (ที่เก็บเมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ. 2545) แล้วหั่นเป็นแผ่น ๆ ตากแดดทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงจนแห้งสนิท แล้วนำไปบดให้เป็นผงด้วยเครื่องบดสมุนไพร จะได้ผงกาวเครื่องขาวป่นแห้งเก็บใส่ภาชนะที่แห้งปิดให้สนิท

1.3 การสกัดสารจากหัวกาวเครื่องขาว

การสกัดสารจากหัวกาวเครื่องขาวใช้วิธีการหมัก (maceration) ซึ่งเป็นการแช่ผงกาวเครื่องขาว (อายุการเก็บรักษา 5 เดือน) กับเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน โดยในวันที่ 5 ถึงวันที่ 7 ของการแช่ เขย่าหรือคนสารอย่างสม่ำเสมอด้วยเครื่องเขย่า (shaker) เมื่อครบกำหนดจึงรินสารละลายออก นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 และนำมาระเหยแห้งโดยวิธี distillation in vacuum ด้วยเครื่องสกัดสารภายใต้แรงดันต่ำ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 5) จะได้ ส่วนสกัดหยาบ (crude extracts) (ภาพที่ 6) โดยส่วนสกัดหยาบนี้มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งได้ทำการตรวจสอบแล้วกับลูกหนูถีบจักรที่ตัดรังไข่ด้วยวิธี uterine weight method (บุษธนา, 2546: ข้อมูลจากการสัมภาษณ์)



ภาพที่ 5 เครื่องสกัดสารภายใต้แรงดันต่ำ (rotary evaporator)



ภาพที่ 6 ส่วนสกัดหยาบ (crude extracts) ที่ได้จากการสกัด

1.4 วิธีการทดลอง

ทำการสลบตัวเต็มวัยแมลงวันบ้านด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อแยกเพศผู้และเพศเมีย นำแมลงวันบ้านที่แยกเพศแล้วแต่ละเพศเลี้ยงในกรงเลี้ยง เพื่อให้แมลงวันบ้านปรับตัวจากการสลบด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบกำหนดย้ายตัวเต็มวัยแมลงวันบ้านลงในแก้วพลาสติกใส ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร สูง 22.5 เซนติเมตร โดยที่ฝาปิดแก้วเจาะรูไว้เป็นจำนวนมาก โดยแก้ว 1 แก้วบรรจุแมลงวันบ้าน 50 ตัว (เพศละ 25 ตัว) ทำการสลบแมลงวันบ้านในแต่ละแก้วนานแก้วละ 1 นาที จากนั้นทำการฉีดพ่นฝอยละเอียด (spray) ของสารสกัดกวางเครือขาวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ด้วย badger sprayer model 150-4-PK ในปริมาณ 2 มิลลิลิตร (ภาพที่ 7) โดยระยะห่างการฉีดพ่น 25 เซนติเมตร บันทึกอาการและเปอร์เซ็นต์การตายที่ 6, 12 และ 24 ชั่วโมงหลังการฉีดพ่น ซึ่งมีทั้งหมด 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ฉีดพ่นด้วยสารสกัดกวางเครือขาวความเข้มข้น 10 ppm

กรรมวิธีที่ 3 ฉีดพ่นด้วยสารสกัดกวางเครือขาวความเข้มข้น 100 ppm

กรรมวิธีที่ 4 ฉีดพ่นด้วยสารสกัดกวางเครือขาวความเข้มข้น 1,000 ppm

กรรมวิธีที่ 5 ฉีดพ่นด้วยสารสกัดกวางเครือขาวความเข้มข้น 10,000 ppm

กรรมวิธีที่ 6 ฉีดพ่นด้วยสารสกัดกวางเครือขาวความเข้มข้น 100,000 ppm

หลังจากฉีดพ่นเสร็จ บันทึกอาการและเปอร์เซ็นต์การตายที่ 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้แผนการทดลอง Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ตัวเลขทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)



ภาพที่ 7 เครื่องฉีดพ่นสาร (badger sprayer model 150-4-PK)

2. ความเป็นพิษของสารสกัดควาวเครือขาวต่อหนอนแมลงวันบ้าน

2.1 การเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนแมลงวันบ้าน

นำด้บบหมูดที่หั่นเป็นชิ้นบาง ๆ และอาหารที่มีส่วนผสมของรำข้าวและแกลบ ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยน้ำหนักวางในภาชนะ จากนั้นนำอาหารดังกล่าวไปวางไว้ในกรงเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ไข่ที่มีอายุเฉลี่ยเท่ากัน เมื่อครบกำหนดย้ายไข่แมลงวันบ้านลงในด้บบหมูดเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นเตรียมอาหารซึ่งมีส่วนผสมของรำข้าว แกลบ และด้บบหมูด ในอัตราส่วน 2 : 1 : 1 โดยน้ำหนักและผสมน้ำในปริมาณ 1/3 ของน้ำหนักอาหารทั้งสามชนิด นำอาหารที่เตรียมได้ย้ายลงในกล่องพลาสติกขนาดกว้าง×ยาว×สูง 14×21.25×6.25 เซนติเมตร และย้ายหนอนแมลงวันบ้านอายุ 1 วัน ตามลงไปลงในกล่อง ทำการตรวจดูการเจริญเติบโตของหนอนแมลงวันบ้านวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น ถ้าอาหารหมดก็ใส่ลงไปตามความเหมาะสม ตรวจวัยของหนอนในแต่ละวันตั้งแต่หนอนฟักออกจากไข่ โดยดูจาก posterior spiracle ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอกำลังขยาย 40 เท่า เมื่อหนอนเข้าสู่วัย 3 นำไปใช้ในใช้ในการทดลองต่อไป

2.2 วิธีการทดลอง

นำหนอนแมลงวันบ้านวัย 3 จำนวน 50 ตัว วางลงในภาชนะที่มีลักษณะเป็นตะแกรงมีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 6.5 เซนติเมตร ลึก 3 เซนติเมตรที่มีผ้าขาวบางรองที่ก้นตะแกรง จุ่มลงในสารสกัดควาวเครือขาวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 30 วินาที แล้วย้ายหนอนที่จุ่มเสร็จแล้วลงในกล่องเลี้ยงแมลงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 8.5 เซนติเมตร สูง 4.5 เซนติเมตร ซึ่งภายในกล่องได้บรรจุอาหารที่ผสมเรียบร้อยแล้ว นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 0.5 องศาเซลเซียส บันทึก

เปอร์เซ็นต์การตายที่ 6, 12 และ 24 ชั่วโมงหลังจากการจุ่ม โดยใช้ฟูกันเขี้ยวที่บริเวณลำตัวของหนอน สังเกตดูว่ามีการเคลื่อนไหวหรือไม่ ถ้าไม่มีการเคลื่อนไหวถือว่าการตายอย่างสมบูรณ์ (Welty *et al.*, 1988) ทำการทดลอง 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 จุ่มในน้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 จุ่มในสารสกัดกวาวเครือขาวความเข้มข้น 10 ppm

กรรมวิธีที่ 3 จุ่มในสารสกัดกวาวเครือขาวความเข้มข้น 100 ppm

กรรมวิธีที่ 4 จุ่มในสารสกัดกวาวเครือขาวความเข้มข้น 1,000 ppm

กรรมวิธีที่ 5 จุ่มในสารสกัดกวาวเครือขาวความเข้มข้น 10,000 ppm

กรรมวิธีที่ 6 จุ่มในสารสกัดกวาวเครือขาวความเข้มข้น 100,000 ppm

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้แผนการทดลอง Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ตัวเลขทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3. ความเข้มข้นของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อการเจริญเติบโตของแมลงวันบ้าน

3.1 การเตรียมสารสกัดกวาวเครือขาวในการทดลอง

นำส่วนสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยเครื่องสกัดสารภายใต้แรงดันต่ำ นำสารที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้ง จะได้ของแข็งเป็นเกล็ดสีน้ำตาล (ภาพที่ 8) นำสารที่ได้ไปเตรียมความเข้มข้นเป็นเปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 8 ลักษณะของส่วนสกัดหยาบที่อบแห้งแล้ว

3.2 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงหนอนแมลงวันบ้าน

นำรำข้าว แกลบ และตับหมูสด ในอัตราส่วน 2 : 1 : 1 โดยน้ำหนัก นำส่วนผสมทั้งหมดไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเก็บ

อาหารใส่ภาชนะที่ปิดมิดชิด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อทำการทดลองนำอาหารดังกล่าว มาผสมกับน้ำกลั่นหรือสารสกัดในปริมาณ 1/3 ของน้ำหนักอาหาร ด้วยเครื่องปั่นตรา freshman รุ่น blender mill grater 3 โดยปั่นนาน 7 นาที จากนั้นเก็บอาหารที่ปั่นแล้วในภาชนะและเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (การผสมอาหารกับสารสกัดควาเวอหรือข้าว ทำการผสมเพียงครั้งเดียวและ ทอยแบ่งอาหารแก่หนอนในปริมาณที่เหมาะสม)

3.3 วิธีการทดลอง

ใช้พุ่มข้าวหนอนแมลงวันบ้านวัย 1 ที่เพิ่งฟักออกจากไข่อย่างระมัดระวังลงในอาหารที่อยู่ใน กล่องเลี้ยงแมลงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร สูง 4.5 เซนติเมตร นำหนอนแมลงวันบ้าน มาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 0.5 องศาเซลเซียส การให้อาหารในวันแรกในปริมาณน้อย และเพิ่มปริมาณ ขึ้นจนถึงวันที่ 4 ของการทดลองจึงลดปริมาณการให้อาหารในแต่ละครั้งลง บันทึกผลเปอร์เซ็นต์ การรอดของหนอน เปอร์เซ็นต์การออกเป็นตัวเต็มวัย

การทดลองมีทั้งหมด 7 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 50 ตัว ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ผสมน้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ผสมสารสกัดควาเวอหรือข้าวความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 3 ผสมสารสกัดควาเวอหรือข้าวความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 4 ผสมสารสกัดควาเวอหรือข้าวความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 5 ผสมสารสกัดควาเวอหรือข้าวความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 6 ผสมสารสกัดควาเวอหรือข้าวความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 7 ผสมสารสกัดควาเวอหรือข้าวความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้แผนการทดลอง Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ ตัวเลขทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

4. ผลของสารสกัดควาเวอหรือข้าวต่อแมลงวันบ้านลูกผสมรุ่นที่ 1 (F1)

นำตัวเต็มวัยแมลงวันบ้านที่เพิ่งฟักออกจากคอกคักของแต่ละกรรมวิธีในการทดลองที่ 3 มาแยกเพศผู้และเพศเมีย จากนั้นนำแมลงวันบ้านผสมพันธุ์กันในกรรมวิธีเดียวกันในอัตราส่วน 1 : 1 โดยให้อาหารคือ สารละลายน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์ที่มีส่วนผสมของวิตามินรวม และให้คับ หมูสดเป็นแหล่งโปรตีน ศึกษาผลที่เกิดขึ้นหลังจากแมลงวันผสมพันธุ์ ดังนี้

1) จำนวนไข่ ต่อตัวเมีย 1 ตัว ในแต่ละช่วงเวลาของการวางไข่

ในวันที่ 1, 2-15, 16-30, 31-45 และ 46-60 ของการวางไข่ นำภาชนะที่ใส่อาหารที่เตรียมด้วยดับหมูดแห้งเป็นชั้นบาง ๆ อาหารที่มีส่วนผสมของรำข้าวและแกลบ นำไปวางในกรงเลี้ยงแมลงวันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำภาชนะดังกล่าวออกจากกรง ใช้ฟู่กันเขี่ยไข่ออกจากอาหารและนับจำนวนไข่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2) จำนวนไข่ทั้งหมดต่อตัวเมีย 1 ตัว

นำภาชนะที่ใส่อาหารที่เตรียมด้วยดับหมูดแห้งเป็นชั้นบาง ๆ อาหารที่มีส่วนผสมของรำข้าวและแกลบ นำไปวางในกรงเลี้ยงแมลงวันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำภาชนะที่บรรจุอาหารดังกล่าวออกจากกรง ใช้ฟู่กันเขี่ยไข่ออกจากอาหาร นับจำนวนไข่ใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการบันทึกจำนวนไข่แต่ละครั้งที่เก็บจนกระทั่งแมลงวันบ้านเพศเมียในแต่ละกรงจะตายหมด

3) เปอร์เซ็นต์การฟักของไข่ที่วางในวันที่ 1, 15, 30 และ 45 ของการวางไข่

นำภาชนะที่แมลงวันบ้านไข่ลงในอาหารแล้วเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เขี่ยไข่ออกจากอาหารอย่างระมัดระวังแล้ววางบนดับหมูดแห้งเป็นชั้นบาง ๆ ในกล่องเลี้ยงแมลงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร สูง 4.5 เซนติเมตร ภายในบรรจุอาหารที่มีส่วนผสมของรำข้าว ดับหมูด และแกลบ ในอัตราส่วน 2 : 1 : 1 โดยน้ำหนัก ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave และผสมน้ำกลั่นในปริมาตร 1/3 ของน้ำหนักรอาหาร โดยวางอยู่ข้าง ๆ ดับหมูด หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนไข่ที่ไม่ฟักภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4) เปอร์เซ็นต์การรอดของหนอนที่เลี้ยงจากไข่ในวันที่ 1, 15, 30 และ 45 ของการวางไข่

เมื่อตรวจเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่เสร็จแล้ว บรรจุอาหาร (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave และผสมน้ำกลั่นแล้ว) ลงในกล่องเลี้ยงแมลง โดยให้อาหารในวันแรกในปริมาณน้อย และเพิ่มปริมาณขึ้นจนถึงวันที่ 4 ของการทดลองจึงลดปริมาณการให้อาหารในแต่ละครั้งลง เมื่อหนอนเจริญเข้าสู่ระยะดักแด้ เก็บดักแด้ออกจากกล่องเลี้ยงแมลง นับจำนวนหนอนที่เข้าดักแด้ และย้ายดักแด้ใส่ในกรง บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดของหนอนที่เข้าดักแด้

5) เปอร์เซ็นต์การออกเป็นตัวเต็มวัยของดักแด้แมลงวันบ้านที่เลี้ยงจากวันที่ 1, 15, 30 และ 45 ของการวางไข่

นับจำนวนตัวเต็มวัยที่ออกจากดักแด้ จำนวนเปอร์เซ็นต์การออกเป็นตัวเต็มวัย

ทุกกรรมวิธีทำการทดลองรวม 4 ซ้ำ ซ้ำละ 8 ตัว (เพศละ 4 ตัว) นำไปวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้แผนการทดลอง Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ตัวเลขทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)