บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

เมล็ดพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง

เมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 จากแปลงนาของเกษตรกร ตำบลสันป่าเปา อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดลอง

น้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร 2 ชนิดได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากกานพลู (clove) และโป๊ยกั๊ก (anise) ความเข้มข้น 100% จากบริษัทยูไนเต็ด เคมีคอล แอนด์ เทรดดิ้ง จำกัด อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

สารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง

สารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร 2 ชนิด ได้แก่ กานพลู และโป๊ยกั๊ก

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. Rotary Evaporator รุ่น R-205/ V Advance
2. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo) บริษัท Olympus
3. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope) บริษัท Olympus
4. ตู้อบลมร้อน (Hot-Air Oven)
5. ตู้ถ่ายเชื้อ
6. ตู้เพาะเมล็ด (seed germinator)
7. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
8. เครื่องชั่งขนาด 1,000 กรัม
9. เครื่องชั่งดิจิตอล 0.0001-220 กรัม รุ่น AB204-S ยี่ห้อ Mettler-Toledo
10. เครื่องชั่งดิจิตอล 0.01-1510 กรัม รุ่น AB1502-S ยี่ห้อ Mettler-Toledo

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

11. เครื่องบดตัวอย่าง (sample mill) ยี่ห้อ PERTEN รุ่น 3303
12. ตลับอลูมิเนียมสำหรับใส่ตัวอย่างอบหาความชื้น
13. ปิเปต (pipette)
14. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด P 20
15. ตะเกียงแอลกอฮอล์
16. สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์
17. กระดาษกรอง Whatman No.1
18. กระดาษฟาง
19. กระดาษเพาะเมล็ด
20. ถุงกระดาษสีน้ำตาล เบอร์ 2
21. คีมคีบ (forcep)
22. บีกเกอร์ (beaker)
23. ขวดรูปชมพู่ (flask)
24. ขวดสีชา
25. ขวดดูแรน
26. กระบอกตวง (cylinder)
27. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
28. แท่งแก้วคนสาร
29. ช้อนสแตนเลสตักสาร
30. หลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร
31. ถุงพลาสติกขนาด 6 x 9 นิ้ว
32. กรวยแก้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารที่ใช้ในการทดลอง

1. Ethanol 95%
2. 1% Sodium hypochlorite; NaClO3 ชื่อทางการค้า Clorox 10%
3. Agar
4. Lactic Acid
5. Tween 80
6. แคปแทน

7. Non – ionic polyacrylamide (PAM)

การเตรียมสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร

1. นำส่วนของพืชสมุนไพรแห้งที่จะสกัด (ในที่นี้คือ ดอกกานพลู และโป๊ยกั๊ก) มาคัดเอาสิ่งเจือปนออก
2. นำส่วนของพืชสมุนไพรแห้งที่จะสกัด ไปบดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง (sample mill)
3. นำตัวอย่างพืชที่บดแล้วอบเพื่อทำให้แห้งสนิทด้วย hot air oven ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่ใช้อบทั่วไปคือ 40-60 องศาเซลเซียส) จนกว่าน้ำหนักแห้งของพืชตัวอย่างจะคงที่ โดยนำพืชตัวอย่างที่อบออกมาชั่งทุกๆ 1-2 ชั่วโมง
4. นำพืชตัวอย่างที่ต้องการสกัด หลังผ่านการอบลดความชื้นแล้ว มาเติมตัวทำละลาย ethanol 95% โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง พืชตัวอย่าง : ตัวทำละลาย = 1:2 แช่ทิ้งไว้ 2-3 วัน
5. กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 จะได้สารละลายสีน้ำตาลเข้ม พร้อมที่จะนำไประเหยตัวทำละลายต่อไป
6. นำสารละลายที่กรองได้ ไประเหยตัวทำละลาย ด้วยเครื่อง rotary evaporator โดยใช้ความดันประมาณ 145-175 มิลลิบาร์ และอุณหภูมิน้ำประมาณ 50 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

วิธีการทดลอง

1. การตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105

นำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่จะนำมาทดลอง มาตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ด เพื่อตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าว ตามมาตรฐานสากลของ International Seed Testing Association (ISTA, 1999) โดยวิธีการดังนี้

วิธีเพาะเมล็ดบนกระดาษชื้น (blotter method)

สุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 มาจำนวนหนึ่ง นำไปเพาะบนกระดาษชื้น โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จำนวน 1 แผ่น วางบนกระดาษฟางขนาดเท่ากันจำนวน 3 แผ่น นำไปจุ่มน้ำกลั่นให้ชุ่ม แล้ววางบนจานเลี้ยงเชื้อ (petri-dish) (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร) นำเมล็ดข้าววางในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ จำนวน 20 เมล็ด/ 1 จานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 100

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เมล็ด นำเมล็ดที่เพาะนี้ไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่เจริญบนเมล็ดภายใต้กล้อง stereo microscope ทำการจำแนกชนิดเชื้อราแต่ละชนิดภายใต้กล้อง compound microscope

2. การทดสอบเพื่อหาปริมาตรและความเข้มข้นของสารเคลือบที่เหมาะสมในการใช้เคลือบเมล็ดพันธุ์ข้าว

สารเคลือบที่ใช้คือ non-ionic polyacrylamide โดยละลายสารเคลือบกับน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1% 5% และ 10% (มวล/ปริมาตร) ปริมาตร 3 ระดับ คือ 2, 4 และ 6 มิลลิลิตร/เมล็ดข้าว 25 กรัม จากนั้นนำสารเคลือบแต่ละความเข้มข้นมาคลุกกับเมล็ดพันธุ์ข้าว 25 กรัม โดยเขย่าในถุงพลาสติกใสให้สารเคลือบเมล็ดทั่วถึงทั้งหมด ทำให้แห้งโดยการนำเข้าตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำเมล็ดที่เคลือบแล้วไปทดสอบความงอก และความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีการหาความเร็วในการงอก โดยการเพาะบนกระดาษเพาะ ทำการตรวจสอบผลความเร็วในการงอกทุกวันเป็นเวลา 12 วันหลังเพาะ นำผลการตรวจนับมาคำนวณหาความเร็วในการงอกดังนี้

$$\text{Speed of germination} = \frac{\text{no. of normal seedling}}{\text{days of first count}} + \ldots + \frac{\text{no. of normal seedling}}{\text{days of final count}}$$

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) จำนวน 3 ซ้ำ มี 3x3 กรรมวิธี (ความเข้มข้น x ปริมาตร) ประกอบด้วย 2 ปัจจัยคือ

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของสารเคลือบ (3 ความเข้มข้น)

ปัจจัยที่ 2 ปริมาตร (3 ระดับ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรร่วมกับสารเคลือบในการควบคุมเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าว

เตรียมน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร 2 ชนิด ได้แก่ กานพลู และโป๊ยกั๊ก ในแต่ละความเข้มข้น คือ 0.01, 0.03 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับสารเคลือบ PAM ในความเข้มข้นและปริมาตรที่ได้จากผลการทดลองที่ 2 ให้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ได้เป็นความเข้มข้นที่กำหนด นำสารผสมที่ได้

คลุกกับเมล็ดพันธุ์ข้าว เปรียบเทียบกับการเคลือบด้วยแคปแทน ผสมกับสารเคลือบ PAM ในความเข้มข้นและปริมาตรที่ได้จากผลการทดลองที่ 3 ในอัตราส่วน แคปแทน 4 กรัม ต่อเมล็ดพันธุ์ข้าว 1 กิโลกรัม แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 100 กรัม ทำการเคลือบภายในถุงพลาสติกใสเขย่าด้วยมือให้สารผสมเคลือบเมล็ดข้าวทั่วถึงทั้งหมด นำไปอบในตู้อบชนิดลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนเมล็ดแห้งสนิท จากนั้นทำการสุ่มเมล็ดข้าวในแต่ละกรรมวิธีมาทำการตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อรา เปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ได้เคลือบ (ชุดควบคุม) และทำการทดสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ตามมาตรฐานสากลของ ISTA (1999) ดังต่อไปนี้

3.1 Seed Health Testing โดยวิธีเพาะเมล็ดบนกระดาษชื้น Blotter method

ทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์ในทุกชุดการทดลอง มาวางเพาะบนกระดาษชื้นในจานอาหาร โดยทำการวางเมล็ดชุดการทดลองละ 400 เมล็ด จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด นำเมล็ดที่เพาะนี้ไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่เจริญบนเมล็ดภายใต้กล้อง stereo microscope ทำการจำแนกชนิดเชื้อราแต่ละชนิดภายใต้กล้อง compound microscope

3.2 Seed Vigour โดยวิธี

3.2.1 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า (seedling growth rate test, SGR)

ทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์ในทุกชุดการทดลอง มาวางเพาะบนกระดาษเพาะชื้น 2 ชั้น ขนาด ประมาณ 14 x 24.8 นิ้ว โดยจัดวางเมล็ดพันธุ์แถวละ 25 เมล็ด เป็นแนวตามความยาวของกระดาษ ให้ส่วนปลายของรากอ่อนอยู่ด้านล่างของกระดาษ เพื่อให้ส่วนของรากแก้วงอกลงสู่ขอบล่างของกระดาษ จากนั้นปิดทับด้วยกระดาษเพาะอีกชั้นหนึ่ง แล้วม้วนกระดาษให้เป็นม้วนกลมใส่ไว้ในถุงพลาสติก นำไปไว้ในตู้เพาะมืดอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนด 7 วัน นำเมล็ดออกมาตรวจนับความงอก นำต้นกล้าที่งอกปกติ มาตัดเฉพาะส่วนของยอดอ่อนและรากอ่อน โดยตัดส่วนของ mesocotyl ทิ้ง จากนั้นบรรจุใส่ถุงกระดาษ นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและรากอ่อน แล้วคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าจากสูตรต่อไปนี้

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า (SGR)} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและรากอ่อน}}{\text{จำนวนต้นกล้าปกติ}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2 การหาอัตราเร็วในการงอก (Speed of Germination)

ทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์ในทุกชุดการทดลอง มาวางบนกระดาษเพาะชื้น เช่นเดียว กับการเพาะความงอก ทำการตรวจสอบผลทุกวันเป็นเวลา 12 วันหลังเพาะ นำผลการตรวจนับมาคำนวณหาความเร็วในการงอกดังนี้

$$\text{Speed of germination} = \frac{\text{no. of normal seedling}}{\text{days of first count}} + \ldots + \frac{\text{no. of normal seedling}}{\text{days of final count}}$$

3.3 การทดสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์ (Germination Test)

ทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์ในทุกชุดการทดลอง มาวางบนกระดาษเพาะชื้น 2 ชั้น จำนวน 100 เมล็ด (1 ซ้ำ) แบ่งเป็น 4 แถวๆ ละ 25 เมล็ด ปิดทับด้วยกระดาษเพาะอีกชั้นหนึ่ง แล้วม้วนกระดาษให้เป็นม้วนกลม นำไปไว้ในตู้เพาะอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ทำการตรวจนับความงอก ทุกวันที่ 5 และ 14 วันหลังเพาะ

3.4 การทดสอบความชื้นของเมล็ดพันธุ์ (Seed Moisture Test)

ทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์ในทุกชุดการทดลอง มาชั่งตัวอย่างละ 5 กรัม จำนวนไม่ต่ำกว่า 2 ซ้ำ ใส่ในตลับอลูมิเนียม แล้วนำไปใส่ไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำออกมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง โดยนิยมรายงานเป็นร้อยละของน้ำหนักสดซึ่งคำนวณตามสูตร

$$\frac{\text{น้ำหนักสดของเมล็ดพันธุ์} - \text{น้ำหนักแห้งของเมล็ดพันธุ์}}{\text{น้ำหนักสดของเมล็ดพันธุ์}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ทำการเปรียบเทียบกันดังนี้

1. ชุดที่ไม่ได้เคลือบ (ชุดควบคุม)
2. ชุดที่เคลือบด้วยแคปแทน ในอัตราส่วน 4 กรัม ต่อเมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม ร่วมกับ สารเคลือบ PAM

3. ชุดที่เคลือบด้วยน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูในแต่ละความเข้มข้น คือ 0.01, 0.03 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ สารเคลือบ PAM
4. ชุดที่เคลือบด้วยน้ำมันหอมระเหยจากโป๊ยกั๊กในแต่ละความเข้มข้น คือ 0.01, 0.03 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ สารเคลือบ PAM

4. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรร่วมกับสารเคลือบในการควบคุมเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าว

เตรียมสารสกัดหยาบจากสมุนไพร 2 ชนิดได้แก่ กานพลู และโป๊ยกั๊ก ในแต่ละความเข้มข้น 0.01, 0.03 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับสารเคลือบในความเข้มข้นและปริมาตรที่ได้จากผลการทดลองที่ 3 ให้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ได้เป็นความเข้มข้นที่กำหนด นำสารผสมที่ได้คลุกกับเมล็ดพันธุ์ข้าว เปรียบเทียบกับการเคลือบด้วย แคปแทน ผสมกับสารเคลือบในความเข้มข้นและปริมาตรที่ได้จากผลการทดลองที่ 3 ในอัตราส่วน แคปแทน 4 กรัม ต่อเมล็ดพันธุ์ข้าว 1 กิโลกรัม แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 100 กรัม ทำการเคลือบภายในถุงพลาสติกใสเขย่าด้วยมือให้สารผสมเคลือบเมล็ดข้าวทั่วถึงทั้งหมด นำไปอบในตู้อบชนิดลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนเมล็ดแห้งสนิท จากนั้นทำการสุ่มเมล็ดข้าวในแต่ละกรรมวิธีมาทำการตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อรา เปรียบเทียบกับชุดควบคุม และทำการทดสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ตามมาตรฐานสากลของ ISTA (1999) ดังต่อไปนี้

1. Seed Health Testing โดยวิธี Blotter method
2. Seed Vigour โดยวิธี Seedling Growth Rate และ Speed of Germination
3. การทดสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์
4. การทดสอบความชื้นเมล็ดพันธุ์

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ทำการเปรียบเทียบกันดังนี้

1. ชุดที่ไม่ได้เคลือบ (ชุดควบคุม)
2. ชุดที่เคลือบด้วยแคปแทน ในอัตราส่วน 4 กรัม ต่อเมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม ร่วมกับ สารเคลือบ PAM
3. ชุดที่เคลือบด้วยสารสกัดหยาบจากกานพลูในแต่ละความเข้มข้น คือ 0.01, 0.03 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ สารเคลือบ PAM

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ชุดที่เคลือบด้วยสารสกัดหยาบจากโป๊ยกั๊กในแต่ละความเข้มข้น คือ 0.01, 0.03 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ สารเคลือบ PAM

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved