บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืช

กิ่งและผลมังคุดด้อยคุณภาพ จากพื้นที่จังหวัดจันทบุรีและตราดเก็บในช่วงเดือนกรกฎาคม

3.2 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 เครื่องมือ

1. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporation) (BÜCHI R-124)
2. เครื่องยูวี (UV cabinet) (Camag)
3. เครื่องชั่งสารทศนิยม 2 ตำแหน่ง (2-decimal balance) (Precisa 1620 C)
4. เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง (4-decimal balance) (Sartorius BP 210 S)
5. เครื่องอัลตราโซนิค (Ultrasonic) (Crest)
6. เครื่องมือวัด pH (pH meter) (Hanna Hi 9321)
7. เตาแม่เหล็กไฟฟ้า (Hot plate)
8. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (IsscoThai BV 124)
9. หม้อนึ่งอัดไอน้ำ (Autorclave) (Hirayama HA-300MII)
10. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Memmert)

3.2.2 อุปกรณ์และเครื่องแก้ว

1. กรวยแยก (Separatory funnel)
2. หลอดทดลอง (Test tube)
3. กระบอกตวง (Graduated cylinder)
4. บีกเกอร์ (Beaker)
5. แท่งแก้วคนสาร (Stirrer)
6. ปิเปต (Pipette)
7. ขวดรูปชมพู่ (Flask)
8. หลอดหยดสาร (Dropper)
9. หลอดแคปิลารี่ปลายปิด (Capillary tube)
10. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
11. พิคโนมิเตอร์ (Pycnometer)
12. ช้อนตักสาร (Spatula)
13. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman NO.1)
14. เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
15. คอร์กโบเรอ (Cork borer)
16. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

17. กระบอกพ่น (Foggy sprayer)
18. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

3.2.3 สารเคมี

1. Hexane (Analytical grade, Merck, USA)
2. Dichloromethane (Analytical, Fisher Scientific)
3. Ethyl acetate(Analytical, Fisher Scientific)
4. Hydrochloric acid (Analytical, Ajax Finechem)
5. Sodium Chloride (Analytical Reagent grade, Univar, Australia)
6. Petoleum ether (Analytical grade, Merck, USA)
7. Ethanol (ACS Sigma-Aldrich)
8. Iodine (ACS certified grade, Merck)
9. Ferric Chloride (Pro analytical grade, Univar, Australia)
10. Potassium Iodine (Pro analytical grade)
11. N-butanol (ACS Sigma-Aldrich)
12. Vanilin (Analytical Reagent grade, FlukaChemie, Switzerland)
13. Silica gel 60 F_{254} (Merck, Germany)
14. Jelatin (McGarrett)
15. Magnesium ribbon
16. Parafin oil
17. Agar (พัฒนาสินเอ็นเตอร์ไพรส์)
18. Dextrose (Anhydrous AR Himedia)
19. Carbendazim 50% WP (แก๊พ อินดรัสตรีส์ จำกัด)
20. Metalaxyl 25% WP (เอราวัณเคมีเกษตร จำกัด)

3.3 การเผาและการเก็บน้ำส้มควันไม้

การเผาและการเก็บน้ำส้มควันไม้ ได้รับความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่จากศูนย์กสิกรรมโป่งแรด (ตำบลพลับพลา อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี) ทำการเผาผลมังคุดและกิ่งมังคุดแยกกันโดยมีขั้นตอนการเผาและการเก็บน้ำส้มควันไม้ ดังนี้

3.3.1 เตาที่ 1 เผาเพื่อเก็บน้ำส้มควันไม้จากผลมังคุดด้อยคุณภาพ

เตรียมผลมังคุดด้อยคุณภาพ จากนั้นนำกิ่งมังคุดความยาว 30 เซนติเมตร ปริมาณเล็กน้อยเรียงไม้มังคุด บรรจุเข้าไปภายในถังบริเวณที่ติดกับหน้าเตาเพื่อป้องกันไม่ให้ผลมังคุดไหลเข้าไปในช่องหน้าเตา โดยด้านล่างจะต้องมีไม้หมอนรองหัว-ท้ายเตา นำผลมังคุดด้อยคุณภาพบรรจุต่อจากไม้มังคุด โดยบรรจุผลมังคุดด้อยคุณภาพจนเต็มถังถึงด้านบนเตา ปิดฝาเตา และเตรียมไม้สำหรับจุดไฟหน้าเตา ก่อไฟล่อหน้าเตาประมาณ 30 นาที จึงปิดปากเตาให้ความร้อนผ่านตรงช่องปล่อง เริ่มเก็บน้ำส้มควันไม้ โดยแบ่งการเก็บเป็น 2 ช่วง โดยช่วงที่ 1 ไล่ความชื้น ช่วงนี้ควันที่ออกมาจากปากปล่องจะมีสีเทา-ดำ และช่วงที่ 2 เป็นช่วงที่ไม้กลายเป็นถ่าน ในช่วงนี้ควันที่ออกมาจากปากปล่องจะ

พุ่งแรง และมีสีเหลืองปนเทาหนา เริ่มหยุดเก็บน้ำส้มควันไม้เมื่อควันบริเวณปากปล่องมีสีขาวเทาออกน้ำเงินอุณหภูมิปากปล่องประมาณ 80 องศาเซลเซียสและปิดฝาเตาให้สนิทเมื่อน้ำส้มควันไม้หยุดไหล

3.3.2 เตาที่ 2 เผาเพื่อเก็บน้ำส้มควันไม้จากกิ่งมังคุด

เตรียมกิ่งมังคุดความยาว 80 เซนติเมตรโดยไม่จำกัดขนาด แล้วนำกิ่งมังคุดบรรจุเข้าไปภายในถังโดยให้โคนหันมาทางหน้าเตา และเรียงไม้ขนาดเล็กไว้ด้านล่างสุดแล้วตามด้วยขนาดกลางและขนาดใหญ่ โดยด้านล่างจะต้องมีไม้หมอนรองหัว–ท้ายเตา จากนั้นปิดฝาเตา และเตรียมไม้สำหรับจุดไฟหน้าเตา ก่อไฟล่อหน้าเตาประมาณ 30 นาที จึงปิดปากเตา ให้ความร้อนผ่านตรงช่องปล่อง เริ่มเก็บน้ำส้มควันไม้ โดยแบ่งการเก็บเป็น 2 ช่วง เช่นเดียวกับเตาที่ 1

3.4 การศึกษาสมบัติของน้ำส้มควันไม้

3.4.1 การวัดค่า pH โดยใช้ pH meter

นำสารตัวอย่างปริมาตร 20 มิลลิลิตรใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วทำการวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter จำนวน 3 ครั้งแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.4.2 การหาจุดเดือดด้วยวิธีเซมิโคร

นำสารตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง คว่ำหลอดแคปิลลารีที่หลอมปลายปิดด้านหนึ่งลงไปในหลอดทดลอง โดยให้ปลายเปิดจุ่มอยู่ในสารตัวอย่าง ส่วนปลายปิดอยู่ด้านบน จากนั้นผูกหลอดทดลองดังกล่าวให้ติดกับเทอร์โมมิเตอร์โดยให้กระเปาะอยู่ติดกับหลอดทดลองตรงระดับที่มีของเหลวอยู่แล้วนำไปให้ความร้อนในบีกเกอร์ที่บรรจุน้ำมันพาราฟินโดยพยายามคนให้ความร้อนกระจายทั่วถึงอย่างสม่ำเสมอภายในบีกเกอร์บรรจุน้ำมัน เมื่อได้รับความร้อนอากาศที่อยู่ในหลอดแคปิลลารีที่คว่ำอยู่จะขยายตัวกลายเป็นฟองอากาศปุดออกมาเป็นสายจากปลายเปิดของหลอดที่จุ่มอยู่ในของเหลวเมื่อเห็นดังนี้ให้หยุดให้ความร้อนแล้วปล่อยให้ระบบเย็นลง รอจนสังเกตเห็นฟองอากาศปุดสุดท้ายและของเหลวกำลังจะถูกดูดเข้าสู่หลอดแคปิลลารี บันทึกอุณหภูมิ ณ จุดนี้ ทำการทดลองซ้ำ จนครบ 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย

3.4.3 การหาความหนาแน่นโดยใช้พิคโนมิเตอร์

ขั้นตอนที่ 1 การหาปริมาตรที่แน่นอนของพิคโนมิเตอร์ มีวิธีการดังนี้

1. นำขวดพิคโนมิเตอร์มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นและอาซิโตน นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส

2. นำขวดพิคโนมิเตอร์ที่ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้องไปชั่งน้ำหนักพร้อมฝาด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3. เติมน้ำกลั่นที่ทราบอุณหภูมิลงในขวดพิคโนมิเตอร์จนเต็ม ปิดฝาให้น้ำกลั่นล้นออกมาและเช็ดภายนอกขวดให้แห้ง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

4. ปริมาตรที่ละเอียดของขวดพิคโนมิเตอร์ สามารถคำนวณได้จาก

$$V = \frac{M_w - m}{D}$$

เมื่อ V = ปริมาตรโดยละเอียดของพิคโนมิเตอร์ (ลูกบาศก์เซนติเมตร)

M_w = น้ำหนักขวดพิคโนมิเตอร์รวมกับน้ำหนักน้ำกลั่น (กรัม)

m = น้ำหนักขวดพิคโนมิเตอร์เปล่า (กรัม)

D = ความหนาแน่นของน้ำกลั่นที่อุณหภูมิทำการทดลอง

คำนวณได้จาก D = -0.0002T + 1.0023

ดังนั้นเมื่อแทนค่า T เป็นอุณหภูมิของน้ำกลั่น (องศาเซลเซียส) สามารถคำนวณความหนาแน่นของน้ำ D (กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) ได้

ขั้นตอนที่ 2 การหาความหนาแน่นของสารโดยใช้พิคโนเตอร์ มีวิธีการดังนี้

1. หลังจากทราบปริมาตรที่แน่นอนของพิคโนมิเตอร์แล้ว กลั้วพิคโนมิเตอร์ด้วยสารตัวอย่าง 2-3 ครั้ง จากนั้นเติมสารตัวอย่างจนเต็ม ปิดฝาให้สารล้นออกมาเช็ดภายนอกขวดพิคโนมิเตอร์ให้แห้ง และนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

2. หาความหนาแน่นของสารได้โดย

$$D = \frac{M_s - m}{V}$$

เมื่อ D = ความหนานแน่นของสาร (กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)

M_S = น้ำหนักขวดพิคโนมิเตอร์รวมกับน้ำหนักสารละลาย (กรัม)

m = น้ำหนักขวดพิคโนมิเตอร์เปล่า (กรัม)

V = ปริมาตรโดยละเอียดของขวดพิคโนมิเตอร์ (ลูกบาศก์เซนติเมตร)

3. ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.5 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบหากลุ่มสารที่เป็นองค์ประกอบเบื้องต้นในน้ำส้มควันไม้ทำโดยการนำวิธีการของ Farnsworth และพรรณี เด่นรุ่งเรือง มาปรับปรุง โดยกลุ่มสารเบื้องต้นที่ทำการตรวจสอบ ได้แก่ อัลคาลอยด์ (Alkaloids), แทนนิน (Tannins), สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compounds), ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids), และวิธีการตรวจสอบมีดังนี้ (Farnsworth, 1966; พรรณี เด่นรุ่งเรือง, 2550)

3.5.1 อัลคาลอยด์ (Alkaloids)

นำสารตัวอย่าง 0.5 กรัมเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร 5 มิลลิลิตรนำไปอุ่น 15 นาที จากนั้นนำไปกรอง นำส่วนสารละลายมาทดสอบกับ Wagner’s test หากปรากฏตะกอนสีน้ำตาล แสดงว่าพบ Alkaloids

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.5.2 แทนนิน (Tannins)

นำสารตัวอย่าง 0.5 กรัมละลายในน้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตรอุ่น 15 นาที ถ้าขุ่นให้หยดโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร 4-5 หยด จากนั้นนำไปกรอง นำสารละลายที่ได้จากการกรองมาทดสอบกับเจลาตินเข้มข้นร้อยละ1 โดยปริมาตรหากปรากฏตะกอนสีขาวขุ่น แสดงว่าพบ Tannins

3.5.3 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds)

นำสารตัวอย่าง 0.5 กรัมละลายในน้ำปริมาตร 5 มิลลิตรอุ่น 15 นาที ถ้าขุ่นให้หยดโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร 4-5 หยด จากนั้นนำไปกรอง นำสารละลายที่ได้จากการกรองมาทดสอบกับเฟอร์ริคคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร หากปรากฏสีเขียวแกมน้ำตาลขุ่น แสดงว่าพบ Phenolic compounds

3.5.4 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

นำสารตัวอย่าง 0.5 กรัมละลายในปิโตรเลียมอีเทอร์ 4 มิลลิตรนำไปกรอง แล้วนำส่วนที่ไม่ละลายไปละลายในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 โดยปริมาตร 8 มิลลิลิตรนำมาทดสอบ Cyadinin test โดยนำลวดแมกนีเซียมมาใส่ในหลอดทดลอง 3-4 ชิ้น แล้วค่อยหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Conc. HCl) 3 หยด สังเกตฟองที่เกิด ทิ้งไว้ให้ละลายจนหมด จากนั้นเติมน้ำ 1 มิลลิลิตรและ n-butanol 1 มิลลิลิตรสังเกตสีในชั้นของ n-butanol หากปรากฏสีแดง ส้ม เลือดหมู ม่วง หรือสีน้ำเงิน แสดงว่าพบ Flavonoids

3.5.5 ซาโปนิน (Saponins)

ใช้การทดสอบฟองโดยนำสารตัวอย่าง 0.5 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร5 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด จากนั้นนำไปกรอง และนำของเหลวผลกรอง (Filtrate) มาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 2–3 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง หากมีฟองเกิดขึ้นแสดงว่าพบ Saponins

3.5.6 เทอร์พีนอยด์ (Terpenoids)

ใช้การทดสอบซาลโควสกี (Salkowskitest) ชั่งสารตัวอย่าง 0.5 กรัม สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ครั้งละ 3-5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 2 มิลลิลิตรจากนั้นเขย่าและค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) หากเกิดสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อของสารละลายแสดงว่าพบ Terpenoids

3.5.7 แอนทราควิโนน (Anthraquinones)

นำสารตัวอย่าง 0.5 กรัม เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร 5 มิลลิลิตรนำไปอุ่น 5 นาทีกรองแล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม เติมสารละลายแอมโมเนียเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร 2- 3 หยด สังเกตสีชมพูแดงที่เกิดขึ้นแสดงว่าพบ Anthraquinones

3.6 การสกัดน้ำส้มควันไม้ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

การสกัดน้ำส้มควันไม้ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ทำการสกัดน้ำส้มควันไม้จากกิ่งและผลมังคุดด้อยคุณภาพทั้งช่วงที่ 1 และ 2 โดยใช้วิธีการสกัดดังรูปที่ 3.1 ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

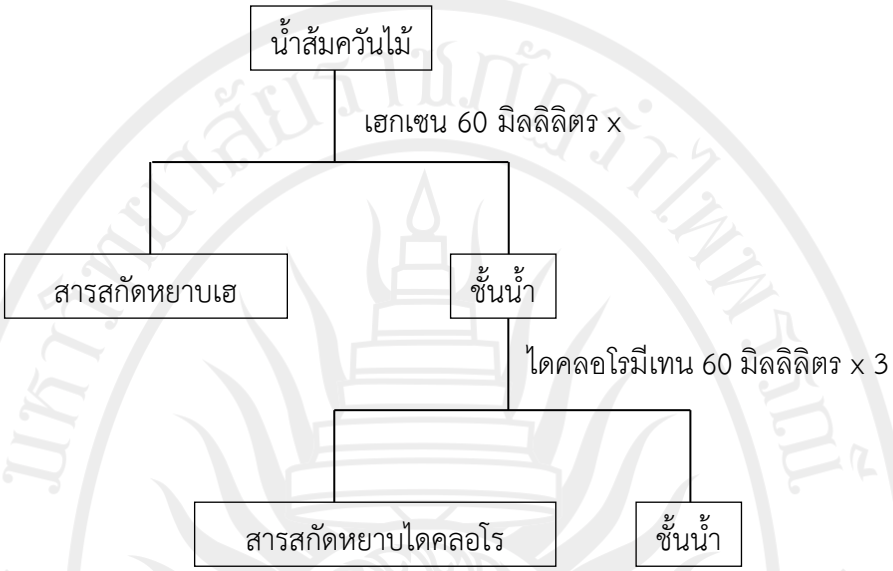
1. นำสารตัวอย่าง 100 มิลลิลิตรใส่กรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร

2. สกัดสารตัวอย่างด้วยเฮกเซน 3 ครั้ง ๆ ละ 60 มิลลิลิตรเก็บสารละลายของชั้นเฮกเซนทั้ง 3 ครั้งรวมกัน จากนั้นนำสารละลายของชั้นน้ำมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนอีก 3 ครั้ง ๆ ละ 60 มิลลิลิตรและเก็บสารละลายของชั้นไดคลอโรมีเทนทั้ง 3 ครั้งรวมกัน

3. ทำการสกัดสารตัวอย่างจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

4. นำสารละลายของชั้นเฮกเซนและชั้นไดคลอโรมีเทนมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นเก็บตัวอย่างใส่ขวด และชั่งน้ำหนักของสารที่สกัดได้



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการสกัดน้ำส้มควันไม้ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

3.7 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นหลังการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

นำสารสกัดหยาบน้ำส้มควันไม้ของผลและกิ่งมังคุด ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2, 3 และ 4 เดือน ทั้ง 24 ตัวอย่าง มาตรวจสอบหากลุ่มสารเบื้องต้น ได้แก่ อัลคาลอยด์ แทนนินสารประกอบฟีนอลิกฟลาโวนอยด์ซาโปนินเทอร์พีนอยด์ และแอนทราควิโนน โดยใช้วิธีการทดสอบ และสังเกตผลการทดสอบเช่นเดียวกันกับการทดสอบกลุ่มสารเบื้องต้นก่อนการสกัด

3.8 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช

3.8.1 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum capsici*

ทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum capsici* ของน้ำส้มควันไม้ทั้ง 8 ตัวอย่าง คือน้ำส้มควันไม้ช่วงที่ 1 และ 2 ที่เก็บเป็นระยะเวลา 2, 3, 4 และ 6 เดือน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับยาคาร์เบนดาซิม (Carbendazim) (Bussaman, P. et. al., 2012 : pp. 1-6) โดยใช้วิธี Poisoned food technique (วัชรี ชัยชมพู และกัลทิมา พิชัย, 2553 : หน้า 18-25) ทำการทดสอบโดยแบ่งชุดการทดสอบออกเป็น 3 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 ชุดควบคุม

ชุดควบคุมประกอบด้วยอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เพียงอย่างเดียว มีวิธีการเตรียมโดยเริ่มต้นจากการล้างมันฝรั่ง ปอกเปลือกและหั่นเนื้อมันฝรั่งเป็นชิ้นขนาดลูกเต๋า นำไปต้มในน้ำกลั่นที่อัตราส่วนเนื้อมันฝรั่ง 200 กรัมต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตรจนชิ้นมันฝรั่งนิ่ม จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง แยกเอาส่วนน้ำออกมา ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เติมกลูโคส 20 กรัมและวุ้น (Agar) 15 กรัมลงในน้ำต้มมันฝรั่ง นำไปต้มและคนให้ละลาย ตวงใส่ขวดรูป

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ชมพู่แล้วนำไปฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำมาเทใส่จานเลี้ยงเชื้อ จานละ 20 มิลลิลิตร

ชุดที่ 2 อาหาร PDA ผสมกับน้ำส้มควันไม้

ชุดทดสอบประกอบด้วยอาหาร PDA ผสมกับน้ำส้มควันไม้ทั้ง 2 ตัวอย่าง ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2, 3, 4 และ 6 เดือน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การเตรียมอาหาร PDA ผสมกับน้ำส้มควันไม้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ช่วง	ระยะเวลาเก็บรักษา	ความเข้มข้น (%w/v)
ช่วงที่ 1 ไล่ความชื้น	2 เดือน	10, 12, 14
	3 เดือน	12, 14, 16, 18
	4 เดือน	12, 14, 16, 17, 18
	6 เดือน	12, 14, 16, 16.5, 17
ช่วงที่ 2 ไม้กลายเป็นถ่าน	2 เดือน	6, 8, 10
	3 เดือน	6, 8, 10, 12
	4 เดือน	6, 8, 9, 10
	6 เดือน	6, 8, 9, 9.5, 10

ตัวอย่าง การเตรียมอาหาร PDA ผสมกับน้ำส้มควันไม้ช่วงที่ 1 ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในอาหาร 100 มิลลิลิตร สามารถเตรียมได้โดยเตรียมอาหาร PDA ปริมาตร 90 มิลลิลิตรใส่ขวดรูปชมพู่ นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งอัดไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำอาหาร PDA มาผสมสารตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ช่วงที่ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำอาหารที่ได้มาเทใส่จานเลี้ยงเชื้อ จานละ 20 มิลลิลิตร

ชุดที่ 3 อาหาร PDA ผสมกับยาคาร์เบนดาซิม

ชุดเปรียบเทียบประกอบไปด้วยอาหาร PDA ผสมกับยาคาร์เบนดาซิมที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2, 3, 4 และ 6 เดือน ที่ความเข้มข้นร้อยละ0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตัวอย่างวิธีการเตรียมอย่างเช่น การเตรียมอาหาร PDA ผสมกับยาคาร์เบนดาซิมที่ความเข้มข้นร้อยละ0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในอาหาร 100 มิลลิลิตร ทำได้โดยเตรียมอาหาร PDA ปริมาตร 92 มิลลิลิตรใส่ขวดรูปชมพู่แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นนำอาหาร PDA มาผสม Stock ยาคาร์เบนดาซิมความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 8 มิลลิลิตร นำอาหารที่ได้เทใส่จานเลี้ยงเชื้อ จานละ 20 มิลลิลิตร

เมื่อผิวหน้าอาหารที่เตรียมไว้ทั้ง 3 ชุด แห้งสนิทแล้ว นำเชื้อ *Colletotrichum capsici* มาเลี้ยงในอาหาร PDA ทั้ง 3 ชุด เพื่อดูฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum capsici* โดยมีวิธีการโดยเริ่มต้นจากใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตรเจาะรอบนอกเส้นใยโคโลนีเชื้อราที่มีอายุไม่เกิน 10 วัน จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่เจาะได้วางบนผิวหน้าอาหารที่เตรียมไว้ทั้ง 3 ชุด โดยวางบริเวณกึ่งกลางจานเลี้ยงเชื้อ นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้องทำการทดลอง 5 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

3.9.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Phytophthora* sp.

ทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Phytophthora* sp. โดยใช้น้ำส้มควันไม้ทั้ง 8 ตัวอย่าง คือ น้ำส้มควันไม้ช่วงที่ 1 และ 2 ที่เก็บเป็นระยะเวลา 2, 3, 4 และ 6 เดือน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับยาเมทาแลกซิล (Metalaxyl) โดยใช้วิธีเดียวกับการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum capsici* ทำได้โดยการแบ่งชุดการทดสอบออกเป็น 3 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 ชุดควบคุม

ชุดควบคุมประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Carrot agar (CA) เพียงอย่างเดียว มีวิธีการเตรียมเริ่มต้นจากล้างแครอท ปอกเปลือกและหั่นเนื้อแครอท 200 กรัมจากนั้นนำไปปั่น กรองด้วยผ้าขาวบาง แยกเอาส่วนน้ำออกมา ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000มิลลิลิตร จากนั้นเติมผงวุ้น (Agar) 12 กรัมลงไป นำไปต้มและคนให้ละลาย ตวงใส่ขวดรูปชมพู่แล้วนำไปฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เมื่อฆ่าเชื้อเสร็จแล้วจึงเทใส่จานเลี้ยงเชื้อ จานละ 20 มิลลิลิตร

ชุดที่ 2 อาหาร PDA ผสมกับน้ำส้มควันไม้

ชุดทดสอบประกอบด้วยอาหาร CA ผสมกับน้ำส้มควันไม้ทั้ง 2 ตัวอย่าง ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 3, 4 และ 6 เดือน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.2

ตาราง 3.2 การเตรียมอาหาร CA ผสมกับน้ำส้มควันไม้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ช่วง	ระยะเวลาเก็บรักษา	ความเข้มข้น (%w/v)
ช่วงที่ 1 ไล่ความชื้น	3 เดือน	12, 14, 16, 18
	4 เดือน	4, 6, 8, 10, 12
	6 เดือน	8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 12.0
ช่วงที่ 2 ไม้กลายเป็นถ่าน	3 เดือน	6, 8, 10, 12
	4 เดือน	4, 6, 7, 8
	6 เดือน	3, 4, 5, 6, 7, 8

ตัวอย่างการเตรียมอาหาร CA ผสมกับน้ำส้มควันไม้ เช่น การเตรียมช่วงที่ 1 ความเข้มข้นร้อยละ 12 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในอาหาร 100 มิลลิลิตร ทำได้โดยเตรียมอาหาร CA ปริมาตร 88 มิลลิลิตรใส่ขวดรูปชมพู่ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งอัดไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำอาหาร CA มาผสมสารตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ช่วงที่ 1 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร นำอาหารที่ได้มาเทใส่จานเลี้ยงเชื้อ จานละ 20 มิลลิลิตร

ชุดที่ 3 อาหาร CA ผสมกับยาเมทาแลกซิล

ชุดเปรียบเทียบประกอบไปด้วยอาหาร CA ผสมกับเมทาแลกซิล ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 3, 4 และ 6 เดือน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.0001, 0.0005, 0.0010, 0.0100, 0.0125 และ 0.0150 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร วิธีการเตรียมอย่างเช่น การเตรียมอาหาร CA ผสมกับเมทาแลกซิลที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.0001 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในอาหาร 100 มิลลิลิตร ทำได้โดยเตรียมอาหาร CA ปริมาตร 99 มิลลิลิตรใส่ขวดรูปชมพู่จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งไอน้ำ ที่อุณหภูมิ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำอาหาร CA มาผสม Stock ยาเมทาแลกซิลความเข้มข้นร้อยละ0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำอาหารที่ได้เทใส่จานเลี้ยงเชื้อ จานละ 20 มิลลิลิตร

เมื่อผิวหน้าอาหารที่เตรียมไว้ทั้ง 3 ชุด แห้งสนิทแล้ว นำเชื้อ *Phytophthora* sp. มาเลี้ยงในอาหาร CA ทั้ง 3 ชุด เพื่อดูฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Phytophthora* sp. โดย ใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตรเจาะรอบนอกเส้นใยโคโลนีเชื้อราที่มีอายุไม่เกิน 5 วัน จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่เจาะได้วางบนผิวหน้าอาหารที่เตรียมไว้ทั้ง 3 ชุด โดยวางบริเวณกึ่งกลางจานเลี้ยงเชื้อ แล้วนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้องทำการทดลอง 5 ซ้ำ

การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum capsici* และ *Phytophthora* sp. สามารถตรวจผลการทดลองโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเชื้อราทุก ๆ 24 ชั่วโมง ดังรูปที่ 3.2 โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (อาหาร PDA ปกติที่ไม่ได้เติมสารทดสอบ) เต็มจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยความยาวรัศมีของโคโลนีในแต่ละจานเลี้ยงเชื้อแล้วนำมาคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญ (PIRG) โดยใช้สูตรต่อไปนี้

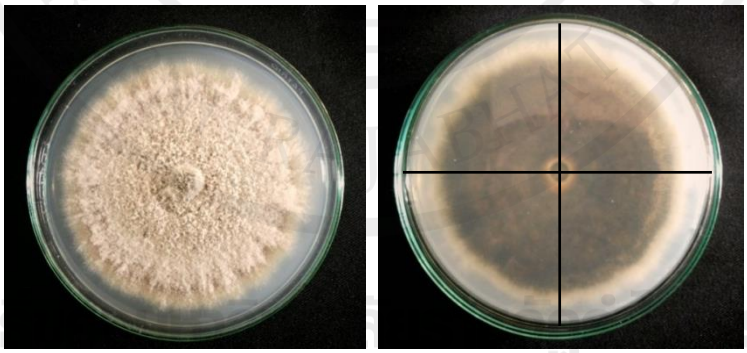
ร้อยละการยับยั้งการเจริญ (Percentinhibition of radial growth-PIRG) คำนวณได้ดังนี้

$$PIRG = \frac{R1-R2}{R1} \times 100$$

เมื่อ R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อในจานควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อในจานทดสอบ

ในการรายงานค่าจะรายงานเป็น IC_{50} ซึ่งได้จากการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งการเจริญกับความเข้มข้นของน้ำส้มควันไม้ ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ 50% จะมีค่าเป็น IC_{50} ซึ่งทำได้โดยการใช้โปรแกรม Excelสร้างกราฟเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของน้ำส้มควันไม้ (แกนx) กับร้อยละการยับยั้งการเจริญ (แกน y) คำนวณโดยแทนค่า y = 50 ลงในสมการกราฟเส้นตรง จะได้ค่า x เป็นค่า IC_{50}



รูปที่ 3.2 วิธีวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย

3.10 ศึกษาสารที่เป็นองค์ประกอบของน้ำส้มควันไม้ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

ทำการศึกษาสารที่เป็นองค์ประกอบของน้ำส้มควันไม้ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin layer chromatography, TLC) โดยเริ่มต้นจากชั่งสารตัวอย่างที่ได้จากการสกัด 0.2 กรัม เติมตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างจุดบนแผ่น TLC แล้วนำไปใส่ในถัง TLC ที่อิ่มตัวด้วยตัวทำลายเฮกเซน:เอทิลอะซิเตท (70:30) เมื่อสารเดินทางได้ระยะหนึ่งจึงนำแผ่น TLC ออกมาตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรและพ่นน้ำยาวานิลลิน (Vanilin solution) สังเกตแถบสีและบันทึกผล

3.11 แยกองค์ประกอบทางเคมีของน้ำส้มควันไม้ด้วยวิธีพรีพาราทีฟทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

การแยกองค์ประกอบทางเคมีของน้ำส้มควันไม้ด้วยวิธีพรีพาราทีฟทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Preparative Thin layer chromatography, PLC) ทำโดยเตรียมแผ่น PLC โดยชั่งซิลิกาเจล 60 F_{253} น้ำหนัก 94 กรัมลงในขวดรูปกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปิดฝาและเขย่าจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (Slurry) จากนั้นนำซิลิกาเจลที่เตรียมเปนสเลอรรีมาใส่ใน Hopper ดังรูปที่ 3.3

รูปที่ 3.3 Hopper สำหรับเตรียมแผ่น PLC

เมื่อลาก Hopper ที่บรรจุสเลอรรีไปบนแผนกระจกซิลิกาเจลจะเคลือบบนแผ่นกระจกนำแผ่นกระจกที่เคลือบซิลิกาเจลแล้วไปเข้าตูอบ อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เปนเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อเตรียมแผ่น PLC เรียบร้อยแล้วจะทำการการแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วย PLC โดยชั่งสารตัวอย่าง 0.4 กรัม เติมไดคลอโรมีเทน 1 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายตัวอย่างจุดบนแผ่น PLC โดยจุดให้ติดกันเป็นเส้น แล้วนำไปใส่ในถัง TLC ที่อิ่มตัวด้วยไดคลอโรมีเทน:เอทิลอะซิเตท (90:10) เมื่อสารเดินทางได้ระยะหนึ่งจึงนำแผ่น PLC ออกมาตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ทำเครื่องหมายบริเวณแถบเหล่านี้ จากนั้นขูดซิลิกาเจลของแตละแถบออกนำไปสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และนำสารละลายของชั้นเอทิลอะซิเตทมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เก็บตัวอย่างใส่ขวดไวแอล ชั่งน้ำหนักของสารที่สกัดได้ ตรวจสอบสารด้วย TLC อีกครั้งนำ Fraction ที่เหมือนกันมารวมกัน