

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการทดลอง

#### 3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างฟัาทะเลายโจร

ส่วนเหนือดินฟัาทะเลายโจรตากแห้งเก็บขณะออกดอก ณ ตำบลดงขี้เหล็ก อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี

#### 3.2 สัตว์ที่ใช้ในการทดสอบ

1. ยุงรำคาญ (*Culex* sp.)
2. ยุงลายเสือ (*Mansonia* sp.)

#### 3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. UV-Vis spectrophotometer รุ่น GENESYS 10 Series
2. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscop, SEM)
3. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscop, TEM)
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง sartorius รุ่น CPA3245
5. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง sartorius รุ่น CP32025
6. ปีกเกอร์ (Beaker)
7. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)
8. ปิเปต (Pipette)
9. แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
10. กระบอกตวง (Cylinder)
11. แก้วใส (Clear glass)
12. กรวยกรองบุชเนอร์ (buchner funnel)
13. เตาให้ความร้อน (Hot plate)
14. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
15. ลูกยางปิเปต (Piipet Bulb)
16. กระดาษกรอง เบอร์ 1 (Filter paper No.1)
17. ช้อนตักสารพลาสติก เบอร์ 1 (spatula No.1)
18. หลอดหยดพลาสติก (plastic dropper)

### 3.4 สารเคมี

1. Silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) (AR grade) Quality Reagent Chemical Product
2. Hydrochloric acid (HCl) (AR grade) Ajex Finechem Pty Ltd.
3. Nitric acid ( $\text{HNO}_3$ ) (AR grade) Ajex Finechem Pty Ltd.
4. Ammonium Hydroxide ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) (COM grade) Asia Pacific Chemical Ltd.

### 3.5 วิธีการทดลอง

#### 3.5.1 การเตรียมสารสกัดฟ้าทะลายโจร

นำใบของฟ้าทะลายโจรแห้งซึ่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง 10.00 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในเย็นที่อุณหภูมิห้อง ทำการกรองด้วยชุดกรองลดความดัน จะได้สารสกัดฟ้าทะลายโจร ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ยูวี วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 300-600 นาโนเมตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง

#### 3.5.2 การเตรียมสารซิลเวอร์ไนเตรต (Silver nitrate : $\text{AgNO}_3$ ) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ชั่งสารซิลเวอร์ไนเตรต ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง 0.0169 กรัม แล้วใส่ในบีกเกอร์ ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิโมลาร์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต (Silver nitrate :  $\text{AgNO}_3$ ) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

#### 3.5.3 การเตรียมอนุภาคนาโนซิลเวอร์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจร

นำสารสกัดฟ้าทะลายโจรปริมาตร 12 มิลลิลิตร ต่อ สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 88 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองใสเป็นสีเหลืองแกมน้ำตาล จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ยูวี วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 300-600 นาโนเมตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อส่งไปพิสูจน์เอกลักษณ์ และทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง

#### 3.5.4 การทดสอบหาซิลเวอร์ไอออน ( $\text{Ag}^+$ )

นำสารละลายอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่เตรียมจากข้อ 3.5.3 จำนวน 10 หยด จากนั้นหยดสารละลาย HCl เข้มข้น 6 โมลาร์ จำนวน 1 หยด ทำการเขย่า ถ้าไม่เกิดตะกอนให้หยดสารละลาย  $\text{NH}_4\text{OH}$  เข้มข้น 6 โมลาร์ ทำการเขย่าและตั้งทิ้งไว้ ถ้าไม่เกิดตะกอนให้หยดสารละลาย  $\text{HNO}_3$  เข้มข้น 6 โมลาร์ จนเป็นกรด โดยกระดาษลิตมัสจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีแดง หากไม่เกิดตะกอนสีขาว แสดงว่า ไม่มี  $\text{Ag}^+$  อยู่ในสารละลายอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่เตรียมขึ้น

#### 3.5.5 การเพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง

นำกะละมังขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50-75 เซนติเมตร ใส่น้ำประมาณครึ่งกะละมัง จากนั้นใช้ใบไม้แห้ง หย้าแห้ง กิ่งไม้ ใส่ลงไปหมักเพื่อให้เกิดกลิ่นเหม็นล่อให้ยุงมาวางไข่ หมักไว้ 1 สัปดาห์ เนื่องจากยุงรำคาญ และยุงเสื่อจะวางไข่ในน้ำที่มีกลิ่นเหม็น สังเกตที่ผิวน้ำบริเวณหย้า หรือใบไม้ สำหรับยุงรำคาญจะเห็นไข่ยุงเป็นแพสีดำนูนรูปร่างเล็ก มีความกว้างประมาณ 1 มิลลิเมตร

ยาวประมาณ 3–5 มิลลิเมตร และสำหรับยุงเสื่อจะเห็นไข่เป็นแพสดำรูปวงกลมขนาดเล็ก จะต้องเก็บไข่ยุงตอนเช้าจะได้ไข่ยุงที่มีความสมบูรณ์ คือยุงที่เริ่มวางไข่ตอนใกล้รุ่ง ถ้าเกินเที่ยงไปจะได้ไข่เปล่าเนื่องจากยุงฟักตัวออกจากไข่แล้ว นำไข่ยุงใส่ขวดแก้วและใส่น้ำที่มีการพักไว้เป็นเวลา 1 คืนแล้ว จากนั้นใช้ผ้าขาวบางปิดปากขวดไว้ ใช้เวลาในการฟัก 1-2 วัน ดูดลูกน้ำยุงใส่ในกะละมังพร้อมใส่น้ำที่มีการพักไว้เป็นเวลา 1 คืนแล้ว จากนั้นใส่อาหารหมูปด ใช้เวลา 4-5 วัน จะได้ลูกน้ำยุงระยะที่ 3 เหมาะสมกับการทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง

3.5.6 การเตรียมสารละลายอนุภาคนาโนซิลเวอร์ และสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ความเข้มข้น 2500 มิลลิกรัมต่อลิตร (Stock solution)

1. ปิเปตสารละลายอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่เตรียมจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร ปริมาตร 0.25 มิลลิเมตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิเมตร ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 2500 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ปิเปตสารสกัดฟ้าทะลายโจรเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิเมตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิเมตร ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 2500 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.5.7 การทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง

1. การทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงด้วยชุดควบคุม โดยใช้หลอดหยดพลาสติก ดูดลูกน้ำยุงใส่ในกระบอกตวงปริมาตร 100 มิลลิเมตร จากนั้นใส่ลงในแก้วใสจำนวน 4 ใบ ใบละ 25 ตัว จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมสุดท้ายในแก้วแต่ละใบเท่ากับ 250 มิลลิเมตร โดยทำการ ทดการทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงด้วยชุดควบคุมทุกความเข้มข้น

2. การทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงด้วยสารสกัดฟ้าทะลายโจรความเข้มข้น 2500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้หลอดหยดพลาสติก ดูดลูกน้ำยุงใส่ในกระบอกตวงปริมาตร 100 มิลลิเมตร จากนั้นใส่ลงในแก้วใสจำนวน 4 ใบ ใบละ 25 ตัว จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นตามความเข้มข้น ดังต่อไปนี้ คือ 200, 100, 50, 25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยกำหนดให้ปริมาตรรวมสุดท้ายในแก้วแต่ละใบเท่ากับ 250 มิลลิเมตร ซึ่งการทดสอบมีดังนี้ เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้ปริมาตรเริ่มต้นของน้ำกลั่นต่อลูกน้ำยุง คือ 230 มิลลิเมตร จากนั้นปิเปตสารละลายปริมาตร 20 มิลลิเมตร ใส่ลงในแก้วใสจำนวน 4 ใบ และการทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงสารสกัดฟ้าทะลายโจรความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 3.1 จากนั้นทำการทดลองซ้ำความเข้มข้นละ 2 ครั้ง

**ตารางที่ 3.1** อัตราส่วนของสารสกัดฟ้าทะลายโจรในการทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่นต่อลูกน้ำยุง (มิลลิเมตร)	ปริมาตรของสารสกัดฟ้าทะลายโจร (มิลลิเมตร)	ปริมาตรรวมสุดท้าย (มิลลิเมตร)
100	240.0	10.00	250
50	245.0	5.00	250
25	247.5	2.50	250
12.5	248.5	1.25	250

3. การทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงด้วยอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่เตรียมจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร ความเข้มข้น 2500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้หลอดหยดพลาสติก ดูดลูกน้ำยุงใส่ในกระบอกตวงปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ลงในแก้วใสจำนวน 4 ใบ ใบละ 25 ตัว จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นตามความเข้มข้น ดังต่อไปนี้ คือ 200, 100, 50, 25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยกำหนดให้ปริมาตรรวมสุดท้ายในแก้วแต่ละใบเท่ากับ 250 มิลลิลิตร ซึ่งการทดสอบมีดังนี้ เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้ปริมาตรเริ่มต้นของน้ำกลั่นต่อลูกน้ำยุง คือ 230 มิลลิลิตร จากนั้นเปิดสารละลายปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในแก้วใสจำนวน 4 ใบ และการทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ที่เตรียมจากสารสกัดฟ้าทะลายโจร ความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 3.2 จากนั้นทำการทดลองซ้ำอีกความเข้มข้นละ 2 ครั้ง

**ตารางที่ 3.2** อัตราส่วนของสารสารละลายอนุภาคนาโนซิลเวอร์ในการทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่นต่อ ลูกน้ำยุง (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของสารสารละลาย อนุภาคนาโนซิลเวอร์ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรรวมสุดท้าย (มิลลิลิตร)
100	240.0	10.00	250
50	245.0	5.00	250
25	247.5	2.50	250
12.5	248.5	1.25	250

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี