บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1.1 สัตว์ทดลอง

- ยุง *Cx. quinquefasciatus* : เพศเมียที่พร้อมจะวางไข่ หลังจากเลี้ยงด้วยเลือดประมาณ 5 วัน (หลังจากออกจากดักแด้)
- หนูแฮมสเตอร์ (Hamster) จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารฝ่ายสหรัฐ สำหรับให้เลือดเป็นอาหารของยุงตัวเต็มวัย

1.2 อาหารสัตว์ทดลอง

- อาหารปลาบดละเอียดที่ผสมน้ำเล็กน้อยสำหรับเลี้ยงลูกน้ำยุงทั้ง 4 ระยะ
- น้ำเชื่อมเข้มข้น 10% (น้ำตาลทราย 100 กรัม : น้ำ 900 ม.ล.) ใช้เป็นอาหารสำหรับยุงตัวเต็มวัย

1.3 หญ้าขน, หญ้าซันอากาศ, หญ้ารังนก, หญ้าปากควาย, หญ้าแพรก และหญ้าเนเปีย

- ใช้หญ้าสดและหญ้าแห้งในปริมาณที่เพียงพอต่อการทดลอง

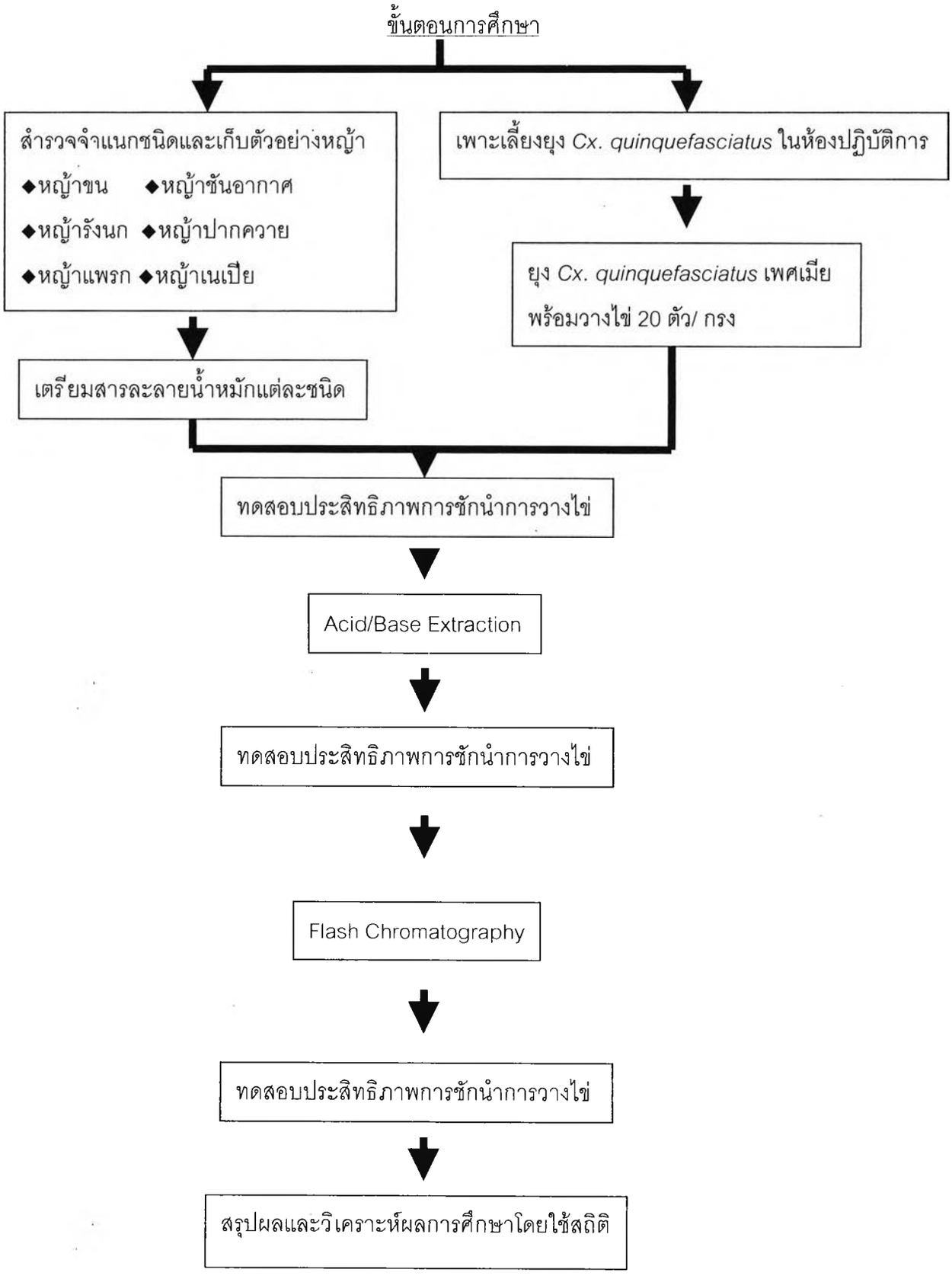
1.4 สารเคมี

- brewer's yeast
- lactoalbumen hydrolysate
- Ether
- 5 %aq $NaHCO_3$
- NaOH
- 1 M HCl

1.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- ถ้วยพลาสติกขนาด 150 ml
- ถาดพลาสติก ขนาด 20 X 30 X 4 cm^3
- หลอดดูด (dropper)
- กรงเลี้ยงยุง ขนาด 23 X 23 X 30.5 cm^3
- กระดาษฟาง
- ปิเปต
- Thermometer
- pH Pocket Tester
- Do meter
- Conductivity Pocket Tester

ตารางที่ 1 : แบบแผนการทดสอบเปรียบเทียบสารละลายน้ำหมักจากหญ้าพันธุ์ท้องถิ่นในการชักนำการวางไข่ของยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus*



2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

การเพาะเลี้ยงยุง

นำแพไข่ยุง *Cx. quinquefasciatus* ซึ่งเพิ่งถูกวางไข่ใหม่ ๆ มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่มีอุณหภูมิ 27-28^0 C ไข่ของยุงจะมีลักษณะเป็นแพขนาดประมาณ 3-4 X 2-3 ม.ม. ไข่จะถูกเรียงตัวในแนวตั้งฉากกับผิวน้ำ หัวของตัวอ่อนที่อยู่ภายในจะห้อยลงโดยนำไปใส่ในถาดพลาสติกขนาด 20 X 30 X 4 ซ.ม.^{3} แต่ละถาดมีน้ำซึ่งปราศจากคลอรีน (น้ำกลั่นหรือน้ำประปาที่สัมผัสอากาศในภาชนะตื้น ๆ นาน 24 ชั่วโมง) ปริมาตร 3,000 ม.ล./ถาด ใส่แพไข่ยุงถาดละ 2-4 แพ เนื่องจากต้องคำนึงถึงความหนาแน่นของลูกน้ำด้วย ไม่ควรมีความหนาแน่นมากเกินไปเพราะจะเป็นสาเหตุให้ลูกน้ำตายได้ จนฟักออกเป็นลูกน้ำ ในระยะนี้ต้องให้อาหาร โดยนำอาหารปลาชนิดเม็ดมาบดให้ละเอียดแล้วผสมน้ำเล็กน้อยให้ในปริมาณ 0.5 กรัม (1/3ช้อนชา) ต่อถาด หมั่นดูแลถ้าอาหารหมดก็คอยเติม เลี้ยงลูกน้ำโดยไม่มีการเปลี่ยนน้ำ ถ้ามีฝ้าขาวเป็นเมือกให้ใช้กระดาษฟางปาดผิวหน้าออกช่วยให้ไม่ต้องเปลี่ยนน้ำเพราะเป็นการรบกวนลูกน้ำและช่วยให้ลูกน้ำหายใจได้สะดวก เนื่องจากฝ้าขาวจะทำให้ท่อหายใจของลูกน้ำไม่สามารถสัมผัสอากาศบริเวณผิวน้ำได้ ลูกน้ำมี 4 ระยะ การเปลี่ยนแปลงจากระยะหนึ่งไปอีกระยะหนึ่งจะมีการลอกคราบทุกครั้ง เมื่อลูกน้ำยุงลอกคราบครั้งสุดท้ายจะกลายเป็นตัวโม่งหรือดักแด้ (pupa) ซึ่งไม่กินอาหารจึงไม่จำเป็นต้องให้อาหารในระยะนี้ จากนั้นใช้หลอดดูดตัวโม่งออกจากถาดใส่ถ้วยพลาสติก นำไปใส่ไว้ในกรงยุงขนาด 23 X 23 X 30.5 ซ.ม.^{3} นำไม้พันสำลีชุบน้ำเชื่อมเข้มข้น 10 % ใส่ในถ้วยปากแคบ (flask) ตั้งไว้ในกรงเพื่อเป็นอาหารยุง เมื่อตัวเต็มวัยลอกคราบออกจากดักแด้ได้ประมาณ 2 วัน จะเริ่มผสมพันธุ์กัน (self mating) ในกรง ส่วนยุงตัวเมียต้องกินเลือดเพื่อนำไปช่วยการเจริญของรังไข่ ดังนั้นหลังจากเป็นยุงตัวเต็มวัยแล้ว 3-4 วัน ให้ยุงกินเลือดหนูแฮมเตอร์ โดยฉีดยาสลบบริเวณข้างท้องด้านล่างด้วย Nembutal 40 % ขนาด 0.1 - 0.3 ม.ล. ต่อน้ำหนักตัวหนู 100 กรัม เพื่อไม่ให้หนูดิ้น และไม่เป็นการทรมานหนู นำไปวางในกรงยุง ประมาณ 1-2 ชั่วโมง เมื่อยุงกินเลือดหนูแล้วนำหนูออก จากนั้น 5 วันแยกยุงเพศเมียที่พร้อมวางไข่มาใช้ในการทดลองและนำถ้วยขนาด 250 ม.ล. ใส่น้ำประมาณ 1/2 ถ้วย วางไว้ในกรงเพื่อให้ยุงมาวางไข่ เมื่อยุงส่วนที่เหลือมาวางไข่นำแพไข่ของยุงไปเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนต่อไป

I 2012465X

3.ขั้นตอนในการเตรียมสารละลายน้ำหมักหญ้า

3.1 สำรวจ จำแนกชนิดและเก็บตัวอย่างทุกส่วน (ดอก, ใบ, ลำต้น และราก) ของหญ้าทั้ง 6 ชนิด คือหญ้าขน, หญ้าซันอากาศ, หญ้ารังนก, หญ้าปากควาย, หญ้าแพรก และหญ้าเนเปีย

3.2 การเตรียมสารละลายน้ำหมักหญ้า

หญ้าสด/แห้ง(น้ำหนักสด)ชนิดละ	90	กรัม
brewer's yeast	1	กรัม
lactoalbumin hydrolysate	4	กรัม
น้ำกลั่น	15	ลิตร

หมักที่อุณหภูมิห้อง 12 วัน จากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบาง เก็บในขวดนำไปเก็บในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20^{0}c

3.3 การเตรียมสารละลายน้ำหมักbrewer's yeast กับ lactoalbumin hydrolysate (BY+LH)

Brewer's yeast	1	กรัม
Lactoalbumin hydrolysate	4	กรัม
น้ำกลั่น	15	ลิตร

หมักที่อุณหภูมิห้อง 12 วัน จากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบาง เก็บในขวดนำไปเก็บในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20^{0}c

3.4 ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำหมัก โดยวัด pH, DO, Conductivity และอุณหภูมิ โดยบันทึกผลทุกวันตั้งแต่เริ่มหมักจนครบ 1 เดือน

4.ทดลองเปรียบเทียบผลของการชักนำการวางไข่ของสารละลายน้ำหมักที่ได้จากการหมักหญ้าขน, หญ้าซันอากาศ, หญ้ารังนก, หญ้าปากควาย, หญ้าแพรกและหญ้าเนเปีย ระหว่างหญ้าสด กับหญ้าแห้ง

ตอนที่ 1

ก. นำถ้วยกระดาษใส่สารละลายน้ำหมักหญ้าสด (ในข้อ 3.2) 100 ม.ล. จำนวน 1 ถ้วย, สารละลายน้ำหมักหญ้าแห้ง (ในข้อ 3.2) 100 ม.ล. 1 ถ้วย, สารละลายน้ำหมัก BY+LH 100 ม.ล. 1 ถ้วย, น้ำกลั่น 100 ม.ล. 1 ถ้วย

ข. นำถ้วยที่มีสารละลายในข้อ ก. วางกระจายในกรงทดลองขนาด 23 X 23 X 30.5 ซ.ม.^{3} ซึ่งมียุง *Cx. quinquefasciatus* ตัวเมียที่พร้อมวางไข่ (หลังจากเลี้ยงด้วยเลือดแล้วประมาณ 5 วัน) จำนวน 20 ตัว ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (27-34^0 C) ความชื้นประมาณ 40-60 %

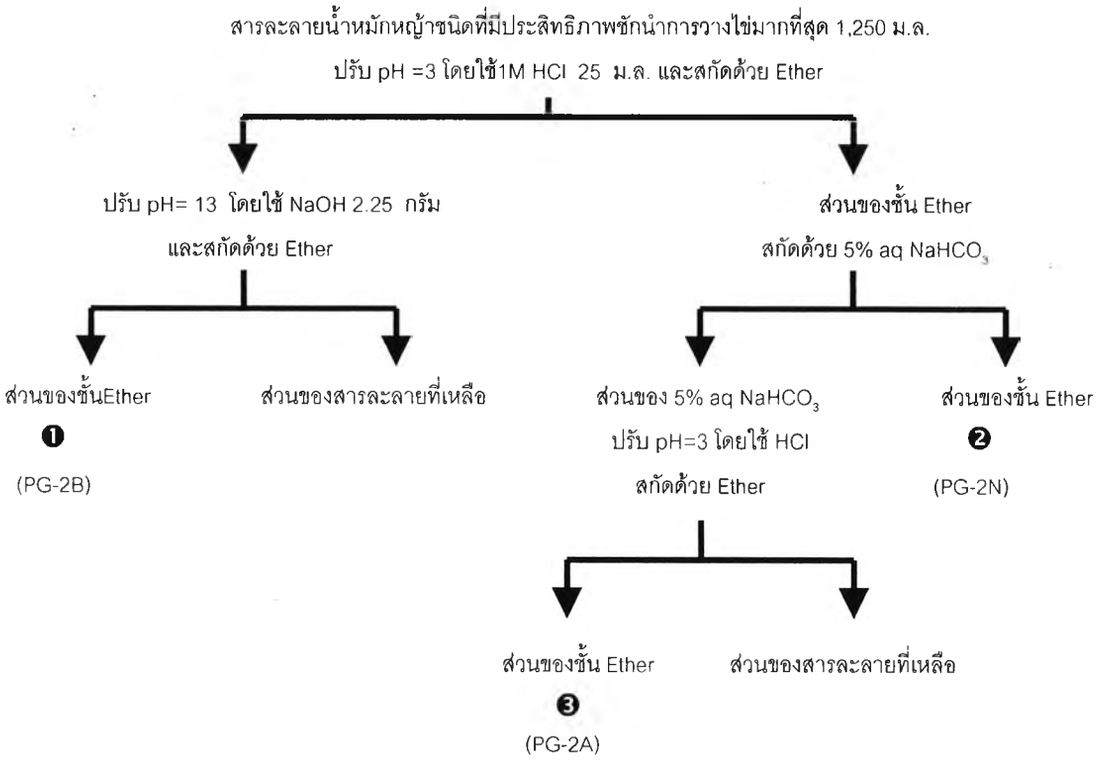
ค. หลังจากครบ 24 ชั่วโมง นับและบันทึกผลจำนวนแพไข่ของยุงในถ้วยสารละลายแต่ละถ้วย (Millar, Cheney and Mulla, 1992)

ง. ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 6 ซ้ำ ต่อสารละลายหญ้าหมัก 1 ชนิด

จ. นำข้อมูลทั้งหมดที่ได้ของหญ้าแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบโดยเขียนกราฟและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ ANOVA และ Tukey HSD

5. การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารละลายน้ำหมักหญ้า

ก. นำสารละลายที่ได้จากตอนที่ 1 (ซึ่งมีคุณสมบัติในการชักนำการวางไข่ต่อยุง *Cx. quinquefasciatus* ได้ดีที่สุด) มาสกัดโดยวิธี Acid/Base Extraction (Millar, Cheney and Mulla,1992)



ข. นำสารละลายที่ได้ในแต่ละส่วน คือ ❶❷❸ มาทำการทดสอบตามวิธีการตอนที่ 1 แต่ภายใน 1 กรง จะประกอบด้วย 2 ถ้วย คือ สารละลายที่สกัดได้แต่ละส่วนคือ ❶,❷,❸ ปริมาณ 100 µl ใน

น้ำกลั่น 100 ม.ล. 1 ถ้วย และ Ether 100 µl ในน้ำกลั่น 100 ม.ล. 1 ถ้วย เพื่อเปรียบเทียบและหาคุณสมบัติการชักนำการวางไข่ของสารสกัดแต่ละส่วนที่มีต่อยุง *Cx. quinquefasciatus*

ค. นำสารสกัดในส่วนที่มีประสิทธิภาพในการชักนำการวางไข่ต่อยุง *Cx. quinquefasciatus* ได้ดีที่สุด มาแยกองค์ประกอบโดยใช้ Flash Chromatography

ง. นำสารประกอบต่างๆ ซึ่งแยกได้จาก Flash Chromatography มาทำการทดสอบตามวิธีการในตอนที่ 1 เพื่อเปรียบเทียบและหาคุณสมบัติการชักนำการวางไข่ของสารประกอบที่มีต่อยุง *Cx. quinquefasciatus*

6. สรุปวิเคราะห์ผล วิจารณ์ และเขียนรายงาน

Acid/Base Extraction

- นำน้ำหมักปริมาตร 1,250 ม.ล. เติม 1M HCl จนมี pH = 3
- สกัดด้วย Ether (200 ม.ล. 3 ครั้ง) โดยใช้กรวยแยก ขนาด 500 ม.ล.
- แยกชั้น Ether (600 ม.ล.) และชั้นน้ำหมักส่วนที่เหลือ (1,250 ม.ล.)
- นำชั้นน้ำหมักส่วนที่เหลือมาปรับ pH = 13 โดยเติม NaOH สกัดซ้ำด้วย Ether (200 ม.ล. 3 ครั้ง) โดยใช้กรวยแยก
- แยกชั้น Ether (❶ : PG-2B) และชั้นน้ำหมักส่วนที่เหลือ
- นำชั้น Ether มาสกัดด้วย 5% Aq. $NaHCO_3$ (100 ม.ล. 3 ครั้ง) โดยใช้กรวยแยก ขนาด 500 ม.ล.
- แยกชั้น Ether (❷ : PG-2N) และชั้น 5% Aq. $NaHCO_3$
- นำชั้น 5% Aq. $NaHCO_3$ มาปรับ pH = 3 โดยเติม 1M HCl จากนั้นนำไปสกัดด้วย Ether (200 ม.ล. 3 ครั้ง) โดยใช้กรวยแยก
- แยกชั้น Ether (❸ : PG-2A) และชั้น 5% Aq. $NaHCO_3$
- เก็บชั้น Ether ทั้ง 3 ส่วน (❶ : PG-2B, ❷ : PG-2N, ❸ : PG-2A) นำไปทดสอบประสิทธิภาพการชักนำการวางไข่ต่อยุง *Cx. quinquefasciatus*

Flash Chromatography

- นำสารสกัดส่วนที่มีประสิทธิภาพในการชักนำการวางไข่ต่อยุง *Cx. quinquefasciatus* มากที่สุด (❷ : PG-2N) มาระเหย Ether ออก จนเหลือปริมาตร 0.1 ม.ล.
- บรรจุ silicagel (230-400 mesh) 14.3 กรัม ใน column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซ.ม.

- ชะด้วยสารละลาย ดังนี้ คือ Hexane, สารละลายผสมระหว่าง Hexane กับ Ether (5%, 10%, 25%, 50% และ 100% Ether) และ acetone ตามลำดับ ซึ่งจะได้สารสกัดส่วนต่าง ๆ ดังนี้ คือ

  PG-2N-1 : สารสกัดส่วนที่ชะด้วย Hexane

  PG-2N-2 : สารสกัดส่วนที่ชะด้วย Ether 5%

  PG-2N-3 : สารสกัดส่วนที่ชะด้วย Ether 10%

  PG-2N-4 : สารสกัดส่วนที่ชะด้วย Ehter 25%

  PG-2N-5 : สารสกัดส่วนที่ชะด้วย Ether 50%

  PG-2N-6 : สารสกัดส่วนที่ชะด้วย Ether 100%

  PG-2N-7 : สารสกัดส่วนที่ชะด้วย Acetone

- นำสารสกัดแต่ละส่วนที่ได้มา ทดสอบประสิทธิภาพการชักนำการวางไข่ต่อยุง *Cx. quinquefasciatus*