

บทที่ 3



อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์ในการทดลอง

1. สารสกัดจากเมล็ดสะเดา
 - 1.1 สารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทยจากบริษัทพืชพันธุ์ธรรมชาติ จำกัด Neemix®
 - 1.2 สารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทยซึ่งสกัดโดยวิธี neem seed crude extract (Boonthai, 1994)

2. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง
 - 2.1 หนอนผีเสื้อกินใบไม้ขนาดใหญ่ (*Galleria mellonella* Linn.)
 - 2.2 หนอนผีเสื้อกินใบไม้ขนาดเล็ก (*Achroia grisella* Fabr.)

3. อาหารสำหรับสัตว์ทดลอง

อาหารสำหรับเลี้ยงหนอนผีเสื้อกินใบไม้ทั้งสองชนิด ใช้อาหารเทียมสูตร Haydak ' s medium (Duxty, 1982; USDA, 1970) ซึ่งประกอบด้วย

 - 3.1 อาหารเสริมสำหรับเด็กอายุ 6 เดือน ถึง 3 ปี
 - 3.2 นมผง
 - 3.3 กลีเซอริน
 - 3.4 น้ำผึ้ง
 - 3.5 น้ำกลั่น
 - 3.6 วิตามินรวม
 - 3.7 คลอรีนคลอไรด์

4. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

- 4.1 บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250 และ 1000 มล.
- 4.2 กระจกตวง (measuring cylinder) ขนาด 10, 50 และ 100 มล.
- 4.3 ขวดลูกชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 และ 500 มล.
- 4.4 กรวยกรอง (funnel)
- 4.5 ปิเปตต์ (pipette) ขนาด 1, 5 และ 10 มล.
- 4.6 เครื่องหยดสารเคมีวิเคราะห์ (microapplicator)
- 4.7 เครื่องกวนด้วยแท่งแม่เหล็กไฟฟ้า (stirrer)
- 4.8 เครื่องบดไฟฟ้า (blender)
- 4.9 เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์ (hygrometer)
- 4.10 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า
- 4.11 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Stereomicroscope Bausch and Lomb)

และเครื่องฉายแสง (illuminator)

- 4.12 ออกคิวลาร์ ไมโครมิเตอร์ (ocular micrometer)
- 4.13 เทอร์โมมิเตอร์
- 4.14 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator)
- 4.15 ตู้เย็น
- 4.16 กระจกกรอง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง เท่ากับ 12.5 ซม.
- 4.17 ปากคีบ สำหรับจับตัวหนอน (forcep)
- 4.18 จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง เท่ากับ 9 ซม.
- 4.19 หลอดหยดสาร (dropper)
- 4.20 กระจกฟาง สำหรับผีเสื้อหนอนกินใบฝิ่งวางไข่
- 4.21 ภาชนะพลาสติกทรงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง และ ความสูง เท่ากับ 10 และ 11 ซม. ตามลำดับ สำหรับเลี้ยงหนอนและทำการทดลอง
- 4.22 กล้องพลาสติกสี่เหลี่ยมขนาดความกว้างxยาว เท่ากับ 5x7 ซม.สำหรับ ผีเสื้อกินใบฝิ่งวางไข่
- 4.23 สำลี
- 4.24 พู่กัน เบอร์ 0
- 4.25 เข็มปักแมลง
- 4.26 แผ่นไข่ฝิ่ง
- 4.27 เมทานอล
- 4.28 อัลกอฮอล์ 70 %

- 4.29 น้ำกลั่น
- 4.30 กลีเซอริน
- 4.31 คลอรีน คลอไรด์
- 4.32 น้ำผึ้ง
- 4.33 วิตามินรวม
- 4.34 นมผง
- 4.35 อาหารเสริมสำหรับเด็กอายุ 6 เดือน ถึง 3 ปี

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงหนอนผีเสื้อกินไหม้ขนาดใหญ่ (*Galleria mellonella* Linn.) และหนอนผีเสื้อกินไหม้ขนาดเล็ก (*Achroia grisella* Fabr.)

เก็บตัวอย่างหนอนผีเสื้อกินไหม้จากรังไหม้ในธรรมชาติ บริเวณหน่วยวิจัยชีววิทยาของผึ้งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตำบลบางขันแตก อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม โดยเลือกคอนรวงรังไหม้ที่ถูกหนอนผีเสื้อกินไหม้เข้าทำลาย นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยชีววิทยาของผึ้ง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ได้ตัวเต็มวัย จากนั้นจับตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียจำนวน 5 คู่ เพื่อให้ผสมพันธุ์กัน ใส่ในกล่องพลาสติกที่บุด้วยกระดาษฟางสำหรับวางไข่ นำไข่ที่ได้มาเลี้ยงด้วยอาหารเทียมตามสูตร Haydak 's medium (Duxty et al., 1982; USDA, 1970) ทิ้งไว้ประมาณ 5 - 6 วัน ไข่จะฟักเป็นหนอนระยะที่ 1 หลังจากนั้นอีกประมาณ 23 - 24 (22 - 23) วัน จะได้หนอนระยะที่ 3 เพื่อทำการทดลองหรือทำการเปลี่ยนอาหารและถ่ายตัวหนอนใส่ภาชนะพลาสติกสำหรับเลี้ยง หลังจากนั้นอีกประมาณ 7 - 8 (6 - 7) วัน จะได้หนอนระยะที่ 4 และเมื่อเลี้ยงต่อไปอีก 7 - 8 (5 - 6) วัน จะได้หนอนระยะที่ 5 ควรให้มีตัวหนอน 25 - 30 ตัว ต่อ 1 ภาชนะ ถ้าจำนวนหนอนหนาแน่นเกินไปจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของหนอน

หมายเหตุ ตัวเลขนอกและในวงเล็บเป็นตัวเลขแสดงอายุ (วัน) ของหนอนผีเสื้อกินไหม้ขนาดใหญ่วและหนอนผีเสื้อกินไหม้ขนาดเล็ก ตามลำดับ

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานตั้งต้น (stock solution) ของสารที่จะใช้ในการทดลอง

สารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทยที่ใช้ในการทดลอง มีดังนี้ คือ

2.1 สารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทย จาก บริษัท พีชพันธุ์กรรมชาติ จำกัด เตรียมความเข้มข้นต่าง ๆ ที่จะใช้ในการทดลอง โดยใช้ เมทานอล เป็นตัวทำละลาย

2.2 สารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทย ซึ่งนำเมล็ดสะเดาไทยมาจาก กองวัตถุมีพิษ กรมวิชาการเกษตร โดยเก็บในรูปของเมล็ดหลังจากได้เอาส่วนเนื้อออกหมดแล้ว เก็บ

ไว้ในขวดสีชาในตู้เย็น เตรียมสารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทย โดยวิธี neem seed crude extract (Boonthai, 1994)

วิธีการสกัดเมล็ดสะเดาไทยโดยวิธี neem seed crude extract

ใช้เมล็ดสะเดาไทยที่บดละเอียด น้ำหนัก 100 กรัม ต่อมะทานอล 300 มล. ปั่นในเครื่องกวนด้วยแท่งแม่เหล็กไฟฟ้า (stirrer) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ทิ้งไป ส่วนที่เหลือตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นสำหรับเตรียมความเข้มข้นต่าง ๆ ในการทดลอง โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย

3. วิธีการศึกษาความเป็นพิษ

เป็นวิธีดำเนินการในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทยที่มีต่อหนอนผีเสื้อกินใบไม้ขนาดใหญ่ (*Galleria mellonella* Linn.) และหนอนผีเสื้อกินใบไม้ขนาดเล็ก (*Achroia grisella* Fabr.) ในระยะที่ 3, 4 และ 5 ตามลำดับ โดยใช้วิธีการทดลอง 2 วิธีดังต่อไปนี้

3.1 วิธีหยดสารลงบนลำตัวหนอน (topical application) โดยหยดสารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทยลงบนตัวหนอนผีเสื้อกินใบไม้ขนาดใหญ่และหนอนผีเสื้อกินใบไม้ขนาดเล็ก

วิธีนี้เป็นการทดสอบความเป็นพิษโดยการสัมผัส ด้วยการหาค่า LC_{50} ซึ่งมีวิธีการเป็น ลำดับขั้นดังต่อไปนี้

3.1.1 เตรียมหนอนผีเสื้อกินใบไม้ที่มีขนาดและอายุใกล้เคียงกัน จำนวนครั้งละ 30 ตัว

3.1.2 นำหนอนผีเสื้อกินใบไม้วางบนกระดาษกรอง

3.1.3 ทำการทดลองหยดสารด้วยเครื่องหยดสารเคมีวิเคราะห์

(microapplicator) โดยให้สารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทยหยดลงบนส่วนลำตัวด้านบนของตัวหนอนผีเสื้อกินใบไม้ใน ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ของแต่ละความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดลอง สำหรับหนอนผีเสื้อกินใบไม้ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมนั้นหยดด้วยสารที่เป็นตัวทำละลายของแต่ละความเข้มข้น ได้แก่ เมทานอล ในแต่ละอัตราความเข้มข้นของสารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทยและกลุ่มควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำ มีหนอนผีเสื้อกินใบไม้ทดลองจำนวน 30 ตัว แบ่งใส่ในภาชนะพลาสติก ทรงกลมละ 10 ตัว

3.1.4 หลังจากหยดสารที่ต้องการทดสอบกับหนอนผีเสื้อกินใบฝิ่ง แล้วนำมาใส่ใน ภาชนะพลาสติกทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและความสูง เท่ากับ 10 และ 11 ซม. ตามลำดับ แล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นให้อาหารแก่หนอนผีเสื้อกินใบฝิ่ง โดยให้แผ่นใบฝิ่ง ใสลงไปในภาชนะพลาสติกทรงกลม

3.1.5 หลังจากทำการทดลอง ตรวจสอบบันทึกจำนวนการตายของ หนอนทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาอัตราการตายเฉลี่ยของหนอนผีเสื้อกินใบฝิ่งทั้งสองชนิด

3.2 วิธีการผสมสารให้หนอนกิน (feeding method) โดยผสมสารสกัดจาก เมล็ดสะเดาไทยลงบนแผ่นใบฝิ่ง ให้หนอนผีเสื้อกินใบฝิ่งขนาดใหญ่และหนอนผีเสื้อกินใบฝิ่งขนาดเล็กกิน

วิธีนี้เป็นการทดสอบความเป็นพิษโดยการกิน ด้วยการหาค่า LC_{50} ซึ่งมีวิธีการเป็นลำดับขั้น ดังต่อไปนี้

3.2.1 เตรียมหนอนผีเสื้อกินใบฝิ่งขนาดและอายุใกล้เคียงกันจำนวน ครั้งละ 30 ตัว ใส่ภาชนะพลาสติกทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและความสูง เท่ากับ 10 และ 11 ซม. ตามลำดับ ปล่อยให้หอดอาหารเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลอง

3.2.2 นำแผ่นใบฝิ่งขนาดความกว้างยาว เท่ากับ 1x1 นิ้ว จุ่มลงใน สารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทยที่ใช้ทดสอบเป็นเวลา 1 นาที ในแต่ละอัตราความเข้มข้น จากนั้น ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปใส่ในภาชนะพลาสติกทรงกลมให้หนอนผีเสื้อกินใบฝิ่งกินเป็นอาหาร สำหรับกลุ่มควบคุมนั้นจะใช้แผ่นใบฝิ่งที่จุ่มลงไปในตัวทำละลายในแต่ละอัตราความเข้มข้นของ สารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทยและกลุ่มควบคุมทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำใช้หนอนผีเสื้อกินใบฝิ่งทำการทดลอง 30 ตัว

3.2.3 หลังจากให้อาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบบันทึก จำนวนการตายของหนอนทุกวันเป็นเวลา 10 วัน นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาอัตราการตายเฉลี่ยของ หนอนผีเสื้อกินใบฝิ่งทั้งสองชนิด

4. การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทย

เป็นการทดลองหาความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดลองที่เหมาะสมหรือช่วง ความเข้มข้นที่ทำให้หนอนผีเสื้อกินใบฝิ่งตายตั้งแต่ 1 - 99 % โดยทั้งสองวิธีจะเจือจางด้วยตัวทำ ละลายให้สารละลายมีความเข้มข้น 1, 5, 15, 25, และ 50 % ตามลำดับ แล้วทดลองสาร สกัดจากเมล็ดสะเดาไทยแต่ละความเข้มข้นกับหนอนผีเสื้อกินใบฝิ่งตามวิธีการทดลองทั้งสองวิธี ตรวจสอบผลหลังจากทำการทดลอง 24 ชั่วโมง บันทึกจำนวนการตายของตัวหนอนทุกวันเป็นเวลา

10 วัน คำนวนหาอัตราการตายของหนอน ในช่วงความเข้มข้นที่ทำให้หนอนผีเสื้อกินใบพืชตายตั้งแต่ 1 - 99 % แล้วนำช่วงความเข้มข้นนั้นมาแบ่งย่อยตามความเหมาะสม เพื่อหาค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทยในการทดสอบขั้นสุดท้าย

หมายเหตุ ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้สำหรับหนอนผีเสื้อกินใบพืช ทั้งสองชนิดไม่ จำเป็นต้องเป็นช่วงเดียวกัน และช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมอาจเปลี่ยนแปลงไปจากนี้ได้

5. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

5.1 จากการคำนวณหาอัตราการตายของหนอนในกลุ่มทดลอง โดยอัตราการตายของ กลุ่มควบคุมอยู่ระหว่าง 5 - 20 % ต้องคำนวณอัตราการตายของกลุ่มทดลองที่ถูกต้องจาก Abbott ' s formula (Finney, 1971)

$$P_r = \frac{P_o - P_c}{100 - P_c} \times 100$$

P_r หมายถึง อัตราการตายของกลุ่มทดลองที่ถูกต้อง

P_o หมายถึง อัตราการตายของกลุ่มทดลอง

P_c หมายถึง อัตราการตายของกลุ่มควบคุม

หมายเหตุ - ถ้ามีอัตราการตายของกลุ่มควบคุมน้อยกว่า 5 % ให้ใช้อัตราการตายของกลุ่มทดลองจริงได้

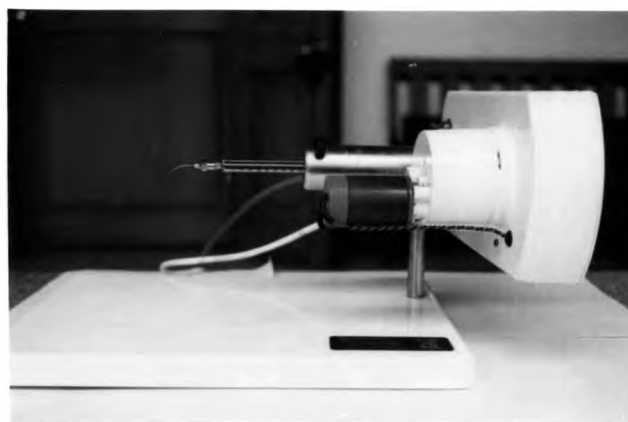
- ถ้ามีอัตราการตายของกลุ่มควบคุมมากกว่า 20 % ให้ทำการทดลองใหม่



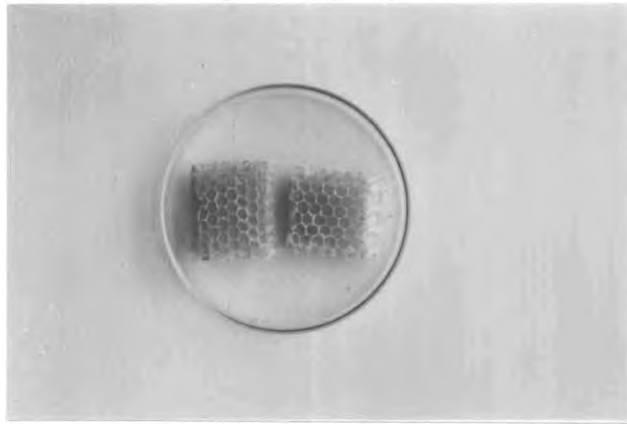
ภาพที่ 3.1 เมล็ดและสารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทย *Azadirachta indica* var. *siamensis* Valetton



ภาพที่ 3.2 สารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทยทางการค้า (Neemix®)



ภาพที่ 3.3 เครื่องหยดสารเคมีวิเคราะห์ (microapplicator)



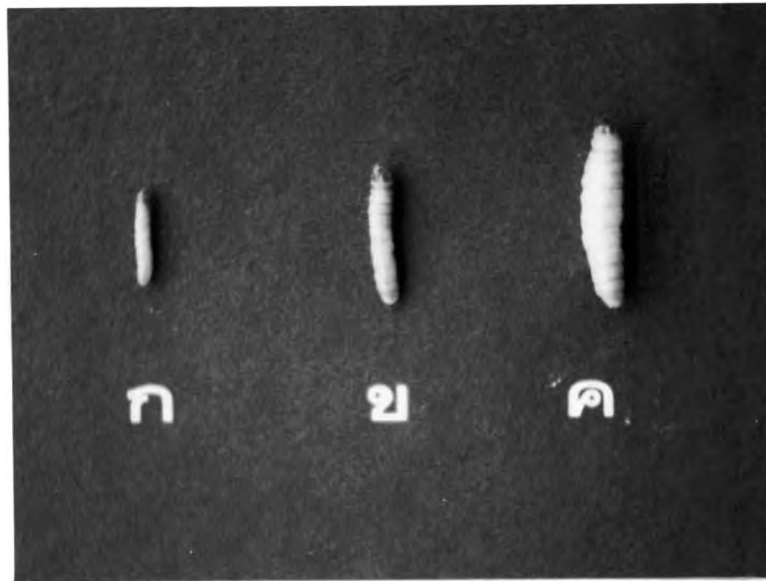
ภาพที่ 3.4 แผ่นไฉฉิ่ง



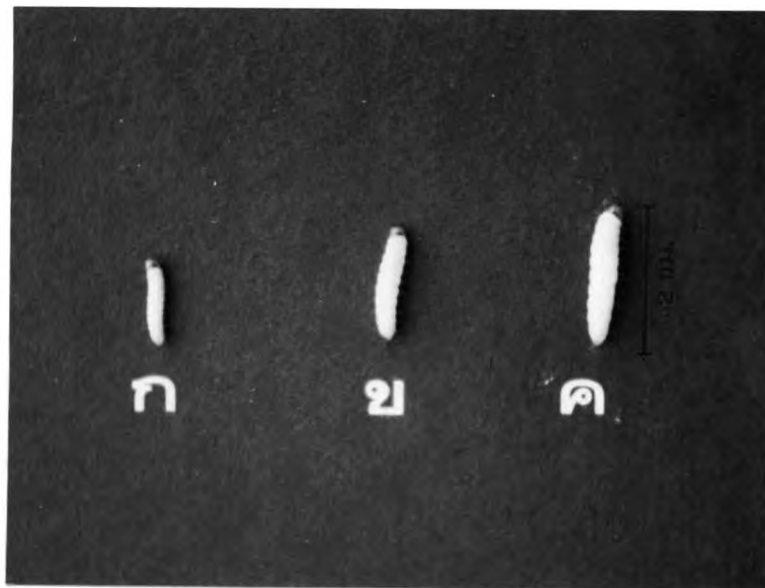
ภาพที่ 3.5 อาหารสำหรับสัตว์ทดลอง (Haydark ' s medium)



ภาพที่ 3.6 ห้องเลี้ยงแมลง



ภาพที่ 3.7 หนอนผีเสื้อกินใบฝิ่งขนาดใหญ่ *Galleria mellonella* Linn.
ระยะที่ 3 (ก) ระยะที่ 4 (ข) และระยะที่ 5 (ค)



ภาพที่ 3.8 หนอนผีเสื้อกินใบฝิ่งขนาดเล็ก *Achroia grisella* Fabr.
ระยะที่ 3 (ก) ระยะที่ 4 (ข) และระยะที่ 5 (ค)

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

6.1 วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองเพื่อเขียนกราฟเส้นตรง dosage - mortality linear regression line โดยวิธี Probit analysis ซึ่งวิเคราะห์ค่า LC_{50} โดยโปรแกรม Qunat 13 (Finney, 1971)

6.2 การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) แบบสุ่มในบล็อก (Randomized block design : RBD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Least Significant difference (LSD) (เจริญ จันทลักษณ์, 2532 ; วรชัย เขาวปธานี, 2532 ; ศิริชัย พงษ์วิชัย , 2537)

7. สถานที่ทำการทดลอง

7.1 หน่วยวิจัยชีววิทยาของผึ้ง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.2 หน่วยวิจัยชีววิทยาของผึ้ง ตำบลบางขันแตก อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม

8. ระยะเวลาในการทำวิจัย

เดือนตุลาคม 2536 ถึงเดือน ธันวาคม 2537