สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์การศึกษา

3.1 พืชทดลอง

ในการศึกษาใช้พริกชี้ฟ้าเขียวพันธุ์พื้นเมือง (*Capsicum annuum* L.) จากแหล่งปลูก ต. บางตาเถร อ. สองพี่น้อง จ. สุพรรณบุรี โดยใช้ผลที่เก็บเกี่ยวในวันเดียวกันอายุประมาณ 100 วันหลังปลูก (ในช่วงเดือน ก.ค.- ธ.ค. 2547) และคัดเลือกผลที่มีความสม่ำเสมอของสีผลโดยใช้แผ่นเทียบสี (RHS Color Chart) สภาพผลสมบูรณ์ ไม่เป็นโรค ไม่มีบาดแผลหรือรอยช้ำ ขนาดของผลยาวประมาณ 8-10 เซนติเมตร

3.2 วัสดุอุปกรณ์

3.2.1 วัสดุอุปกรณ์ในการศึกษาผลของน้ำมันกานพลูต่อการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส

กล้องถ่ายรูป ฟิล์มถ่ายรูป กล้องจุลทรรศน์ ตู้อบ (hot air oven) จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate) เครื่องชั่ง Mettler Toledo รุ่น PG503-S (ทศนิยม 3 ตำแหน่งของหน่วยกรัม) ไมโครปิเปต (micropipette) ปิเปต (pipette) กระบอกตวง ฟอยล์ (foil) บีกเกอร์ แผ่นพาราฟิล์ม ที่เจาะกระดาษขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ไม้บรรทัด cork borer กล่องพลาสติกใสพร้อมฝาปิด แผ่นสไลด์ พู่กัน กระจกปิดสไลด์ (coverglass) สไลด์นับจำนวนสปอร์ (Haemacytometer) เข็มเขี่ย กรวยแก้ว สำลี หลอดหยด

3.2.2 วัสดุอุปกรณ์ในการศึกษาการใช้สารละลายไคโตซานในการยืดอายุการเก็บรักษาผลพริกชี้ฟ้า

เครื่องชั่ง Mettler Toledo รุ่น PG503-S (ทศนิยม 3 ตำแหน่งของหน่วยกรัม) เครื่องชั่ง Mettler Toledo รุ่น AG285 (ทศนิยม 4 ตำแหน่งของหน่วยกรัม) กล้องถ่ายรูป ฟิล์มถ่ายรูป เครื่องวัดสี (Minolta รุ่น CR – 300) เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (Fruits Hardness

Tester (FHR-1) ของ Nippon Optical Work CO., Ltd. – Tokyo, Japan) เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Hand Refractometer รุ่น N- 1E ของบริษัท Atago) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) โกร่ง Cuvette หลอดทดลอง ขวดรูปชมพู่ ผ้าขาวบาง กรวยแก้ว บิวเรต (burette) ปิเปต (pipette) ไมโครปิเปต (micropipette)มีด และเขียง กระบอกตวง หลอดหยด แท่งแก้วคน กระบอกฉีดยาและเข็มฉีดยา (Syringe and needle) หลอดเก็บก๊าซหรือขวดน้ำเกลือพร้อมจุกปิด โหลเก็บก๊าซ เครื่อง gas chromatography (Shimadzu รุ่น GC–14A) ตู้เย็น เตาต้มน้ำ เทอร์โมมิเตอร์ กระป๋องใส่น้ำขนาด 14 นิ้ว ตะกร้าพลาสติกขนาด 20 x 30 เซนติเมตร

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารเคมีในการศึกษาผลของน้ำมันกานพลูต่อการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส

น้ำมันกานพลู (commercial grade จากศึกษาภัณฑ์) ผงวุ้น (agar powder) น้ำตาล Tween 20 Potato Dextrose Agar (PDA)

3.3.2 สารเคมีในการศึกษาการใช้สารละลายไคโตซานในการยืดอายุการเก็บรักษาผลพริกชี้ฟ้า

Chitosan (Oligomer 80% degree of deacetylation ; MW, 7.6 x 10^4 Da) Acetone 85%, Metaphosphoric acid (HPO_3) Ascorbic acid (Vitamin C) 2,6 – dichloro – phenol - indophenol sodium salt (DI) Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) น้ำเกลืออิ่มตัว

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาผลของน้ำมันกานพลูต่อการเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส

1.1 แยกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากผลพริกชี้ฟ้า

นำผลพริกชี้ฟ้าที่เป็นโรคมาแยกให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ด้วยวิธี tissue transplanting ทำโดย เขี่ยสปอร์เชื้อรามาเลี้ยงบนอาหาร PDA จำแนกชนิดของเชื้อราที่ได้ โดยสังเกตจากลักษณะของสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) และทำการ subculture เชื้อดังกล่าวเพื่อใช้ในขั้นต่อไป

1.2 ทดสอบผลของน้ำมันกานพลูต่อการเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum* sp.

ทดสอบการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคของพริกชี้ฟ้าที่เลี้ยงอยู่บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) โดยตัดเส้นใยราที่เจริญอยู่บนอาหาร PDA ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. วางตรงกลางของจานอาหาร PDA ที่ผสมน้ำมันกานพลู (commercial grade จากศึกษาภัณฑ์) ที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 400 500 600 700 800 900 และ 1,000 ppm (ข้อมูลจาก Preliminary study) จำนวน 4 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หรือ จนกว่าเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุมเจริญเกือบเต็ม วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา คำนวณหาร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (ภาคผนวก ก)

1.3 ทดสอบผลของน้ำมันกานพลูต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum* sp.

เตรียม spore suspension ความเข้มข้น 1.0 x 10^5 สปอร์/มิลลิลิตร จากนั้นหยด 5 ไมโครลิตร ของ spore suspension บนสไลด์หลุม ที่บรรจุสารละลายน้ำมันกานพลู 95 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 400 500 600 700 800 900 และ 1,000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ บ่มไว้ในกล่องที่มีความชื้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราที่งอก โดยการสุ่มนับสไลด์ละ 100 สปอร์ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ (ภาคผนวก ก)

1.4 ทดสอบผลของน้ำมันกานพลูต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในผลพริกชี้ฟ้า

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง จำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ผล โดยใช้ผลพริกชี้ฟ้าเขียว (เก็บในเดือน ก.ค. 2547) มาทำการทดลอง

ชุดการทดลองที่ 1 นำผลพริกชี้ฟ้ามาปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. โดยทำแผลบริเวณข้างผล 1 แผล ด้วยปลายเข็มเขี่ยเชื้อ แล้วใช้กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. จุ่มใน spore suspension ความเข้มข้น 1.0 x 10^5 สปอร์/มล. วางลงบนแผล ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเอากระดาษกรองออก (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 แช่ผลพริกชี้ฟ้าในน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 800 ppm (ได้มาจากการทดลองในตอนที่ 1.2 และ 1.3) เป็นเวลา 5 นาที ผึ่งลมให้แห้งประมาณ 10 – 15 นาที จากนั้นนำผลพริกชี้ฟ้ามาปลูกเชื้อราดังชุดการทดลองที่ 1

ชุดการทดลองที่ 3 นำผลพริกชี้ฟ้ามาปลูกเชื้อราดังชุดการทดลองที่ 1 จากนั้นแช่ผลพริกชี้ฟ้าในน้ำมันกานพลูเป็นเวลา 5 นาที โดยใช้ความเข้มข้น 800 ppm และ ผึ่งลมให้แห้ง ประมาณ 10 – 15 นาที

บ่มแต่ละชุดการทดลองไว้ในกล่องที่มีความชื้นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลโดยการวัดขนาดของแผลทุก ๆ 2 วัน โดยวัดความกว้างและความยาวของบาดแผลด้วยไม้บรรทัด

2. **การทดลองเพื่อหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของการใช้สารละลายไคโตซานในการยืดอายุการเก็บรักษาผลพริกชี้ฟ้า**

นำผลพริกชี้ฟ้าเขียว (เก็บในเดือน ก.ย. 2547) มาแช่สารละลายไคโตซาน oligomer %DD 80 (V/V) ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0 5 10 และ 20 ppm โดยใช้ระยะเวลา 3 ระดับ คือ 1 2 และ 3 นาที วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design จำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ผล แบ่งชุดการทดลองได้ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ไคโตซาน ความเข้มข้น 0 ppm เป็นเวลา 1 นาที
ชุดการทดลองที่ 2 ไคโตซาน ความเข้มข้น 5 ppm เป็นเวลา 1 นาที
ชุดการทดลองที่ 3 ไคโตซาน ความเข้มข้น 10 ppm เป็นเวลา 1 นาที
ชุดการทดลองที่ 4 ไคโตซาน ความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 1 นาที
ชุดการทดลองที่ 5 ไคโตซาน ความเข้มข้น 0 ppm เป็นเวลา 2 นาที
ชุดการทดลองที่ 6 ไคโตซาน ความเข้มข้น 5 ppm เป็นเวลา 2 นาที
ชุดการทดลองที่ 7 ไคโตซาน ความเข้มข้น 10 ppm เป็นเวลา 2 นาที
ชุดการทดลองที่ 8 ไคโตซาน ความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 2 นาที
ชุดการทดลองที่ 9 ไคโตซาน ความเข้มข้น 0 ppm เป็นเวลา 3 นาที
ชุดการทดลองที่ 10 ไคโตซาน ความเข้มข้น 5 ppm เป็นเวลา 3 นาที
ชุดการทดลองที่ 11 ไคโตซาน ความเข้มข้น 10 ppm เป็นเวลา 3 นาที
ชุดการทดลองที่ 12 ไคโตซาน ความเข้มข้น 20 ppm เป็นเวลา 3 นาที

ผลพริกชี้ฟ้าที่ผ่านการแช่สารละลายไคโตซานแล้ว นำมาผึ่งให้แห้ง จากนั้นบรรจุในถุงพลาสติกที่เปิดปากเพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ และใส่ไว้ในตะกร้าพลาสติก แล้วนำไปเก็บรักษาในตู้เย็นที่ควบคุมอุณหภูมิ 8 - 9 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง บันทึกผลการทดลองทุก ๆ 3 วัน เป็นเวลา 30 วัน โดยบันทึกการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาการสุกบางประการ ได้แก่ ลักษณะที่ปรากฏ (overall appearance) การสูญเสียน้ำหนักสด และ การเปลี่ยนแปลงสี

2.1 การวัดการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของผล

โดยให้คะแนนการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่ปรากฏ (overall appearance) บริเวณผิวของผลพริกชี้ฟ้า (ภาคผนวก ก)

2.2 การวัดการสูญเสียน้ำหนักสด

แยกผลพริกชี้ฟ้ามา 1 ชุด เพื่อใช้ตรวจสอบการสูญเสียน้ำหนักสด โดยทำการชั่งน้ำหนักเริ่มต้นก่อนทำการเก็บรักษา หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักผลพริกชี้ฟ้าทุก ๆ 3 วัน โดยเทียบน้ำหนักวันที่ 0 เป็น 0 %จากนั้นนำค่าที่บันทึกได้ตลอดการทดลองมาคำนวณหาร้อยละของการสูญเสียน้ำหนักสด ดังสมการ

$$\text{การสูญเสียน้ำหนักสด (ร้อยละ)} = \left[\frac{\text{น้ำหนักก่อนการเก็บรักษา} - \text{น้ำหนักหลังการเก็บรักษา}}{\text{น้ำหนักก่อนการเก็บรักษา}} \right] \times 100$$

2.3 การวัดการเปลี่ยนแปลงสีผิวของผลพริกชี้ฟ้า

วัดสีผิวผลพริกชี้ฟ้าด้วยเครื่องวัดสี (Colorimeter) Minolta ตัวเครื่อง CR – 300 และใช้แหล่งกำเนิดแสง D65 โดยวาง probe ให้ตั้งฉากกับผลพริกชี้ฟ้าบริเวณหัว กลาง และท้ายผล นำมาหาค่าเฉลี่ย และรายงานผลเป็นค่าความสว่าง (Lightness value, L) ค่าความเข้มสี (Chroma value, C) และ การเปลี่ยนแปลงของสีเขียว (Hue angle value) (ภาคผนวก ก)

3. ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูร่วมกับสารละลายไคโตซานที่มีต่อการเกิดโรคแอนแทรคโนสและอายุการเก็บรักษาผลพริกชี้ฟ้า

เลือกความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส และสารละลายไคโตซานที่สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลพริกชี้ฟ้าได้ดีที่สุด แล้วนำมาใช้ร่วมกัน โดยสุ่มผลพริกชี้ฟ้าเขียว (เก็บในเดือน ธ.ค. 2547) มาแช่ในสารละลายน้ำมันกานพลู และสารละลายไคโตซาน oligomer %DD 80 (V/V) ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน และวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำ ใช้ผลพริกชี้ฟ้าจำนวน 60 ผล โดยแบ่งชุดการทดลองได้ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 แช่ผลพริกชี้ฟ้าในน้ำ (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 แช่ผลพริกชี้ฟ้าในน้ำมันกานพลูโดยใช้ความเข้มข้น 800 ppm เป็นเวลา 5 นาที (จากการทดลองในขั้นตอนที่ 1)

ชุดการทดลองที่ 3 แช่ผลพริกชี้ฟ้าในสารละลายไคโตซานโดยใช้ความเข้มข้น 5 ppm เป็นเวลา 1 นาที (จากการทดลองในขั้นตอนที่ 2)

ชุดการทดลองที่ 4 แช่ผลพริกชี้ฟ้าในน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 800 ppm ซึ่งผสมกับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 5 ppm เป็นเวลา 5 นาที

ชุดการทดลองที่ 5 แช่ผลพริกชี้ฟ้าในน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 800 ppm ซึ่งผสมกับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 5 ppm เป็นเวลา 1 นาที

หลังจากแช่ผลพริกชี้ฟ้าในสารละลาย ผึ่งให้แห้ง บรรจุลงในถุงพลาสติก และใส่ไว้ในตะกร้าพลาสติก แล้วนำไปเก็บรักษาในตู้เย็นที่ควบคุมอุณหภูมิ 8 - 9 องศาเซลเซียสตลอดการทดลอง จากนั้นบันทึกผลการทดลองทุก ๆ 3 วัน เป็นเวลา 30 วัน เก็บตัวอย่างแล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2 และทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมในส่วนของปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solids, TSS) ความแน่นเนื้อ (Firmness) การเปลี่ยนแปลงปริมาณวิตามินซี อัตราการหายใจ และการเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์

3.1 การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solids, TSS)

ชั่งน้ำหนักเนื้อผลประมาณ 1 กรัม เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 1 (dilution factor) บดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา ใช้ผ้าขาวบางคั้นน้ำ หยดลงในเครื่อง Refractometer อ่านค่าและนำไปคำนวณหาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

ปริมาณ TSS (^{o}Brix) = ค่า soluble solids ที่อ่านได้ x 2

3.2 การวัดความแน่นเนื้อ (Firmness)

วัดความแน่นเนื้อของผลพริกด้วยเครื่อง Penetrometer (Fruits Hardness Tester (FHR-1)) โดยวางหัววัดให้ตั้งฉากกับผลพริก บันทึกค่าความแน่นเนื้อ และรายงานผลในหน่วยนิวตัน (N)

ค่าความแน่นเนื้อ (นิวตัน, N) = ค่าที่อ่านได้ x 9.807

3.3 การวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณวิตามินซี

ทำการชั่งน้ำหนักตัวอย่างผลประมาณ 5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ บดกับสารละลาย 3 % Metaphosphoric acid ที่เย็น แล้วเพิ่มปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย 3 % Metaphosphoric acid ที่เย็น กรองด้วยผ้าขาวบาง นำสารละลายที่ได้มา 5 มิลลิลิตร ไตเตรทด้วย Dry solution จนเป็นสีชมพูถาวรเป็นเวลา 15 วินาที นำปริมาตร Dry solution ที่ได้มาคำนวณตามสมการ (Askar and Treptow, 1993) (ภาคผนวก ก)

$$\text{ปริมาณวิตามินซี (มก./100 ก.)} = \frac{\text{ปริมาตร Dry solution ที่ใช้ (มล.) x Dry factor (มล.) x 5000}}{\text{5 x น้ำหนักตัวอย่างฝัก (กรัม)}}$$

3.4 การวัดอัตราการหายใจ

นำผลพริกชี้ฟ้าเขียวเก็บในขวดโหลที่ปิดสนิท เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการดูดก๊าซที่ทราบปริมาตรแล้วจำนวน 10 มิลลิลิตร แทนที่ในน้ำเกลืออิ่มตัวในหลอดเก็บก๊าซ แล้วนำก๊าซที่ได้ไปตรวจวัดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่อง gas chromatography ของบริษัท Shimadzu รุ่น GC-8A ภายในบรรจุคอลัมน์ PORAPACK Q 80/100 mesh Thermal conductivity detector อุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ณ ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

3.5 การวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์

การชั่งน้ำหนักผลตัวอย่าง 1 กรัม ผสมกับ 85% acetone จำนวน 3 มิลลิลิตร ใส่ในขวดทึบแสงพักไว้ 15 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองด้วย glass wool ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย 85% acetone นำไปวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์จากสมการ (ภาคผนวก ก)

4. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ด้วยวิธี ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และหาความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์ต่าง ๆ