

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### 3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

###### 3.1.1 อุปกรณ์

1. กรงเลี้ยงยุงขนาด  $30 \times 30 \times 30$  เซนติเมตร
2. ถ้วยพลาสติกน้ำข้าวนาค  $25 \times 30 \times 5$  เซนติเมตร
3. น้ำประปาที่ทิ้งไว้ 5 – 7 วัน ให้คลอรีนตกตะกอน
4. ตะแกรงหนาน้ำสำหรับให้เลือดยุง
5. ลูกยางดูดลูกน้ำ
6. อาหารปลาป่นละเอียด
7. น้ำหวานสำหรับยุงตัวผู้
8. สำลีและไม้สำหรับพันสำลี
9. ถ้วยสีดำสำหรับเก็บไข่ยุง
10. ถ้วยพลาสติกสีขาว
11. กระดาษเขียนแบบ
12. กระดาษ A4
13. Beaker 100 ml
14. ไฟฉาย
15. หนูขาว
16. กล้องถ่ายรูป
17. สวิงช้อนลูกน้ำข้าวนาคเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร
18. แก้วพลาสติกใส
19. กระบอกตวงขนาด 100 ml
20. micropipette
21. หลอดหยด (Dropper)
22. พู่กันเบอร์ 2
23. Beaker 1000, 100 ml
24. Rotary Evaporating
25. Sample Mill

26. Hot Air Oven
27. Balance
28. กระดาษกรองเบอร์ 1
29. กระดาษฟอยด์
30. ช้อนตักสาร
31. แท่งแก้ว
32. ถุงผ้า
33. ขวดสีชา
34. ถ้วย

### 3.1.2 สารเคมี

1. Absolute ethanol
2. 80 % Ethanol
3. 50 % Alcohol

### 3.2 วิธีเพาะเลี้ยงยุง

นำไก่ยุ่งลายที่ติดอยู่บนกระดาษกรองลงแข่น้ำปราศจากคลอรีนในถ้วยพลาสติกกดให้กระดาษจนได้พิวน้ำ 45 นาที ไก่จะฟอกเป็นลูกน้ำ ระยะลูกน้ำให้อาหารปลาบดทันที โดยรอยลงบนผิวน้ำครั้งละ 0.3 กรัม วันละ 1 ครั้ง และภาชนะที่ใส่อาหารต้องล้างน้ำอุ่นๆ ประมาณ 5 วัน ลูกน้ำ จะเข้าสู่ระยะตัวโน้ม ซึ่งระยะนี้ไม่กินอาหาร ใช้หลอดดูดจากภาชนะเลี้ยงใส่ในถ้วยพลาสติก นำไปไว้ในกรงเลี้ยงยุง และประมาณ 2- 3 วัน ตัวโน้มจะเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย ตัวเต็มวัยให้กินน้ำหวานความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ไม้พันสามีใส่ในขวดนำไปวางในกรง หลังยุงผสมพันธุ์ ยุงตัวเมียให้กินแล้วหูขาวโดยใช้ตะแกรงนำไปไว้ในกรงยุง ประมาณ 2-3 ชั่วโมง ในเวลากลางวัน นำถ้วยหรือภาชนะตีคำใส่กระดาษกรองไว้ด้านในโดยรอบ เติมน้ำประมาณ 2/3 ของถ้วย นำไปวางไว้ในกรงเลี้ยงยุง เมื่อยุงวางไก่ไว้จะติดอยู่บนกระดาษเหนือระดับน้ำเล็กน้อยทำการเก็บไก่ยุงทุกๆ 2 วัน และนำไก่ผึ้งให้แห้ง

### 3.3 วิธีการสกัดพืช

1. นำพืชสมุนไพรสดมาหั่นละเอียดตากในที่ร่มเงาหรืออบในตู้อบที่อุณหภูมิไม่เกิน  $45^{\circ}\text{C}$  จนแห้งสนิท
2. ซึ่งสมุนไพรแห้ง 1 กิโลกรัม นำไปปั่นจนละเอียดด้วยเครื่องปั่น (Blender) นำผงยาที่ได้นำมาใส่ในถุงผ้าขาวที่อยู่ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 mL
3. นำผงยาแช่ใน 80 % Ethanol ในอัตราส่วน 1:5 (ผงยา 1 ส่วน 80 % Ethanol 5 ส่วน) ทิ้งไว้ 3-5 วัน คันวันละ 1 ครั้ง
4. นำไปกรองด้วยเครื่องลดความดัน (Vacwm pomp) และนำสารละลายที่ได้ระเหย Ethanol โดยใช้เครื่อง Rotary evaporating ที่อุณหภูมิ  $45 - 50^{\circ}\text{C}$  จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extract)
5. นำ Crude extract ไปเก็บในขวดสีชา กำกับชื่อ เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิไม่เกิน  $4^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำมาใช้ทดลอง

### 3.4 วิธีการทดลอง

#### 1. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย

1.1 ทำ Stock solution ความเข้มข้น 333330 mg/L ของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด คือ เมล็ดทุเรียนเทศ ดอกสารภีและเลือดแพะคุดสารที่เตรียมไว้แต่ละชนิดเจือจากความเข้มข้น 100 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L, 12.5 mg/L, 6.25 mg/L, 3.12 mg/L, 1.56 mg/L, 0.78 mg/L, 0.39 mg/L, 0.19 mg/L ตามลำดับ ในน้ำปริมาตร 100 mL ต่อ 1 ความเข้มข้น

1.2 เตรียมสารละลายแต่ละความเข้มข้นของพืชแต่ละชนิด 100 mL และลูกน้ำยุงลายระยะที่ 3 และ 4 จำนวน 25 ตัว แต่ละความเข้มข้นทำ 3 ชุด พร้อมชุดควบคุม

1.3 บันทึกผลการตายของลูกน้ำที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

1.4 ลูกน้ำที่ตายเก็บไว้ใน 50 % Alcohol เพื่อนับจำนวนของลูกน้ำที่ตาย

#### 2. ศึกษาผลการทดสอบของสารสกัดต่อวงจรชีวิตลูกน้ำยุงลาย

2.1 ลูกน้ำยุงลายที่ไม่ตายหลัง 48 ชั่วโมงถูกใส่กรงยุงเพื่อศึกษาผลผลกระทบต่อวงจรชีวิตของยุงลาย

2.2 เมื่อลูกน้ำเป็นตัวเต็มวัยให้กินน้ำหวาน ยุงตัวเมียหลังจากผสมพันธุ์ให้กินเลือดหนูขาว

2.3 แยกตัวเมียไว้อีกครั้ง พร้อมภาชนะวางไว้

2.4 เก็บไข่ยุงทุก 2 วัน นำไปผึ่งให้แห้ง

2.5 ทำการบันทึกผล

2.5.1 จำนวนไข่ยุง

2.5.2 อัตราการฟักของไข่

2.5.3 การตายของลูกน้ำ ตัว nominate ตัวเต็มวัย และจำนวนยุงลายที่รอดชีวิต