

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. กรงเลี้ยงยุงขนาด $30 \times 30 \times 30$ เซนติเมตร
2. ถาดเพาะเลี้ยงลูกน้ำขนาด $25 \times 30 \times 5$ เซนติเมตร
3. น้ำประปาที่ทิ้งไว้ 5 – 7 วัน ให้คลอรีนตกตะกอน
4. ตะแกรงหนีบนูสำหรับให้เลือดยุง
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. สวิงซ็อนลูกน้ำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร
18. แก้วพลาสติกใส
19. กระจบอดวงขนาด 100 ml
20. micropipette
21. หลอดหยด (Dropper)
22. ฟู่กันเบอร์ 2
23. Beaker 1000, 100 ml
24. Rotary Evaporating
25. Sample Mill

26. Hot Air Oven
27. Balance
28. กระจกกรองเบอร์ 1
29. กระจกฟอยล์
30. ซ้อนดักสาร
31. แท่งแก้ว
32. ถุงผ้า
33. ขวดสีชา
34. ถาด

3.1.2 สารเคมี

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

3.2 วิธีเพาะเลี้ยงยุง

นำไข่ยุงลายที่ติดอยู่บนกระจกกรองลงแช่น้ำปราศจากคลอรีนในถาดพลาสติกกดให้กระจกจมใต้ผิวน้ำ 45 นาที ไข่จะฟักเป็นลูกน้ำ ระยะลูกน้ำให้อาหารปลาบดทันที โดยโรยลงบนผิวน้ำครั้งละ 0.3 กรัม วันละ 1 ครั้ง และกวาดทำความสะอาดผิวน้ำวันละ 1 ครั้ง ประมาณ 5 วัน ลูกน้ำ จะเข้าสู่ระยะตัวมอ่ง ซึ่งระยะนี้ไม่กินอาหาร ใช้หลอดดูดจากถาดเลี้ยงใส่ในถ้วยพลาสติก นำไปไว้ใน กรงเลี้ยงยุง และประมาณ 2- 3 วัน ตัวมอ่งจะเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย ตัวเต็มวัยให้กินน้ำหวานความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ไม้พันสำลีใส่ในขวดนำไปวางในกรง หลังยุงผสมพันธุ์ ยุงตัวเมียให้กินเลือดหนูขาวโดยใช้ตะแกรงไปวางไว้ในกรงยุง ประมาณ 2-3 ชั่วโมง ในเวลากลางวัน นำถ้วยหรือภาชนะสีดำใส่กระจกกรองไว้ด้านในโดยรอบ เติมน้ำประมาณ 2/3 ของถ้วย นำไปวางไว้ในกรงเลี้ยงยุง เมื่อยุงวางไข่ไข่จะติดอยู่บนกระจกเหนือระดับน้ำเล็กน้อยทำการเก็บไข่ยุงทุกๆ 2 วัน แล้วนำไปฝังให้แห้ง

3.3 วิธีการสกัดพืช

1. นำพืชสมุนไพรสดมาหั่นละเอียดตากในที่ร่มเงาหรืออบในตู้อบที่อุณหภูมิไม่เกิน 45°C จนแห้งสนิท
2. ชั่งสมุนไพรแห้ง 1 กิโลกรัม นำไปปั่นจนละเอียดด้วยเครื่องปั่น (Blender) นำผงยาที่ได้มาใส่ในถุงผ้าขาวที่อยู่ในบีกเกอร์ ขนาด 1,000 mL
3. นำผงยาแช่ใน 80 % Ethanol ในอัตราส่วน 1:5 (ผงยา 1 ส่วน 80 % Ethanol 5 ส่วน) ทิ้งไว้ 3-5 วัน คนวันละ 1 ครั้ง
4. นำไปกรองด้วยเครื่องลดความดัน (Vacuum pump) แล้วนำสารละลายที่ได้ระเหย Ethanol โดยใช้เครื่อง Rotary evaporating ที่อุณหภูมิ $45 - 50^{\circ}\text{C}$ จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extract)
5. นำ Crude extract ไปเก็บในขวดสีชา กำกับชื่อ เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิไม่เกิน 4°C จนกว่าจะนำมาใช้ทดลอง

3.4 วิธีการทดลอง

1. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย

1.1 ทำ Stock solution ความเข้มข้น 333330 mg/L ของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด คือ เมล็ดทุเรียนเทศ ดอกสารภีและเลือดแรดคูดสารที่เตรียมไว้แต่ละชนิดเจือจางความเข้มข้น 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 ซ้ำ พร้อมชุดควบคุม

1.3 บันทึกผลการตายของลูกน้ำที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

1.4 ลูกน้ำที่ตายเก็บไว้ใน 50 % Alcohol เพื่อนับจำนวนของลูกน้ำที่ตาย

2. ศึกษาผลกระทบของสารสกัดต่อวงจรชีวิตลูกน้ำยุงลาย

2.1 ลูกน้ำยุงลายที่ไม่ตายหลัง 48 ชั่วโมงเก็บใส่กรงยุงเพื่อศึกษาผลกระทบต่อวงจรชีวิตของยุงลาย

2.2 เมื่อลูกน้ำเป็นตัวเต็มวัยให้กินน้ำหวาน ยุงตัวเมียหลังจากผสมพันธุ์ให้กินเลือดหนูขาว

2.3 แยกตัวเมียไว้อีกกรง พร้อมภาชนะวางไข่

2.4 เก็บไข่ยุงทุก 2 วัน นำไปฝังให้แห้ง

2.5 ทำการบันทึกผล

2.5.1 จำนวนไข่ยุง

2.5.2 อัตราการฟักของไข่

2.5.3 การตายของลูกน้ำ ตัวโม่ง ตัวเต็มวัย และจำนวนยุงลายที่รอดชีวิต