

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. กรงเลี้ยงยุงขนาด $30 \times 30 \times 30$ เซนติเมตร
2. ถาดเพาะเลี้ยงลูกน้ำลักษณะสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด $25 \times 30 \times 5$ เซนติเมตร
3. น้ำประปาที่ทิ้งไว้ 5-7 วัน ให้คลอรีนตกตะกอน
4. ที่หนีบหนูสำหรับให้เลือดยุง
5. ลูกยางสำหรับดูดลูกน้ำ
6. อาหารปลาป่นละเอียด
7. น้ำหวานสำหรับยุงตัวเต็มวัย
8. กำไลและไม้สำหรับพันสำลี
9. ถ้วยเก็บไข่ยุง
10. ถ้วยพลาสติกสีขาว
11. กระดาษเขียนแบบ
12. กระดาษ A4
13. Beaker 100 mL
14. ไฟฉาย
15. หนูขาว
16. กล้องถ่ายรูป
17. สวิงช้อนลูกน้ำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร
18. แก้วพลาสติกใส
19. กระจกตวงขนาด 100 mL
20. Micropipette
21. หลอดหยด (Dropper)
22. เครื่องกรองลดความดัน (Vacuum pump)
23. Beaker 1000, 100 mL
24. Rotary Evaporating
25. Sample Mill
26. Hot Air Oven
27. Balance

28. กระจกกรองเบอร์ 1
29. กระจกฟอยล์
30. ซ้อนคักสาร
31. แท่งแก้ว
32. ถุงผ้า
33. ขวดลีซา
34. ถาด
35. ฟู่กันเบอร์ 2

3.1.2 สารเคมี

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

3.2 วิธีเพาะเลี้ยงยุง

นำไข่ยุงลายที่ติดอยู่บนกระดาษแช่น้ำปราศจากคลอรีนในถาดพลาสติก กดให้กระดาษจมใต้ผิวน้ำประมาณ 45 นาที ไข่ก็จะฟักเป็นตัวลูกน้ำ ระยะลูกน้ำให้อาหารปลาบดทันที โดยโรยลงบนผิวน้ำครั้งละ 0.3 กรัม วันละ 1 ครั้ง และกวาดทำความสะอาดผิวน้ำวันละ 1 ครั้ง ประมาณ 5 วัน ลูกน้ำเข้าสู่ระยะตัวโม่ง ซึ่งระยะนี้จะไม่กินอาหาร ใช้หลอดดูดจากถาดเลี้ยงใส่ในถ้วยพลาสติก นำไปวางไว้ในกรงเลี้ยงยุงประมาณ 2-3 วัน ตัวโม่งจะเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย ตัวเต็มวัยให้กินน้ำหวานที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ไม้พันสำลีใส่ในขวดนำไปวางในกรง หลังจากยุงผสมพันธุ์ ยุงตัวเมียให้กินเลือดหนูขาวโดยใส่ตะแกรงไปวางไว้ในกรงเลี้ยงยุงในเวลากลางวัน ประมาณ 2-3 ชั่วโมง นำถ้วย หรือภาชนะที่ใส่กระดาษกรองไว้ด้านในโดยรอบ เติมน้ำประมาณ 2/3 ของถ้วย ไปวางไว้ในกรงเลี้ยงยุง เมื่อยุงวางไข่ ไข่จะติดอยู่บนกระดาษเหนือระดับน้ำเล็กน้อย ทำการเก็บไข่ยุงทุก 2 วันครั้ง แล้วนำไปฝังให้แห้ง

3.3 วิธีการสกัดพืช

1. นำพืชสมุนไพรสดมาหั่นละเอียดตากในที่ร่มเงา หรืออบในตู้อบที่อุณหภูมิไม่เกิน 45 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท
2. ชั่งสมุนไพรแห้ง 1 กิโลกรัม ปั่นจนละเอียดด้วยเครื่องปั่น (Blender) นำผงยาที่ได้ใส่ในถุงผ้าที่อยู่ในบีกเกอร์ ขนาด 1000 mL
3. นำผงยาใน 80 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ในอัตราส่วน 1: 5 (ผงยา 1 ส่วน 80 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 5 ส่วน) ทิ้งไว้ 3-5 วัน คนวันละ 1 ครั้ง

4. นำไปกรองด้วยเครื่องกรองลดความดัน (Vacuum pump) แล้วนำสารละลายที่ได้ ระบาย Ethanol โดยใช้เครื่อง Rotary evaporating ที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extract)

5. นำ Crude extract ไปเก็บในขวดสีชา กำกับชื่อ เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดลอง

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย

1. เตรียม Stock solution ที่มีความเข้มข้น 333330 mg/L ของสารสกัดทั้ง 2 ชนิด คือ เปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์และผักชีลาว คัดสารที่เตรียมไว้แต่ละชนิดมาเจือจางความเข้มข้น 100 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L, 12.50 mg/L, 6.25 mg/L, 3.12 mg/L, 1.56 mg/L, 0.78 mg/L, 0.39 mg/L และ 0.19 mg/L ในน้ำปริมาตร 100 mL ต่อ 1 ความเข้มข้น

2. เตรียมสารละลายแต่ละความเข้มข้นของพืชแต่ละชนิด 100 mL และลูกน้ำยุงลายระยะที่ 3 และ 4 จำนวน 25 ตัว แต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ พร้อมชุดควบคุม 1 ซ้ำ
3. บันทึกผลการตายของลูกน้ำที่ 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง
4. ลูกน้ำที่ตายเก็บไว้ใน 50 เปอร์เซ็นต์ Alcohol เพื่อนับจำนวนลูกน้ำที่ตาย

3.4.2 ศึกษาผลกระทบของสารสกัดต่อวงจรชีวิตของยุงลาย

1. ลูกน้ำที่ไม่ตายหลังจาก 48 ชั่วโมง เก็บใส่กรงเลี้ยงยุง เพื่อศึกษาผลกระทบต่อวงจรชีวิตของยุงลาย
2. เมื่อลูกน้ำเป็นตัวเต็มวัย ให้กินน้ำหวาน ยุงตัวเมียหลังจากผสมพันธุ์ ให้กินเลือดหนูขาว
3. แยกตัวเมียไว้อีกกรง พร้อมภาชนะวางไข่
4. เก็บไข่ยุงทุก 2 วัน นำไปฝังให้แห้ง
5. ทำการบันทึกผล
 - 5.1 จำนวนไข่
 - 5.2 อัตราการฟักของไข่
 - 5.3 การตายของลูกน้ำ ตัวโม่ง ตัวเต็มวัยและจำนวนยุงลายที่รอดชีวิต