

## วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

ปีที่ 1 สํารวจ/คัดเลือก และรวบรวมพืชสมุนไพรที่มีสารสำคัญออกฤทธิ์ในการควบคุม ป้องกัน และกำจัด เชื้อสาเหตุโรคพืช และแมลงศัตรูพืชสำคัญของมะละกอ

### 1. สํารวจและคัดเลือกพืช

คัดเลือกพืชมา 15 ชนิด โดยหลักเกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกคือ มีเอกสารรายงานว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดนั้นมีคุณสมบัติในการควบคุม ป้องกัน และกำจัด เชื้อสาเหตุโรคพืชและแมลงศัตรูพืชสำคัญของพืชปลูก เป็นพืชสมุนไพรที่หาง่ายในท้องถิ่น หรือมีราคาไม่แพง และต้องประกอบด้วยมีกระบวนการสกัดที่ง่าย ทำได้โดยเกษตรกร และลงทุนไม่มาก โดยพืชสมุนไพรที่คัดเลือกได้มีจำนวน 15 ชนิด ดังนี้คือ 1. ใบน้อยหน้า 2. ใบยูคาลิปตัส 3. ขมิ้นชัน 4. ใบมะรุ้ม 5. ผลจันทน์กั๊กา 6. ใบตะไคร้หอม 7. ใบสะเดา 8. ใบชะพลู 9. ผักปรัง 10. ใบย่านาง 11. ใบยาสูบ 12. ต้นดาวเรือง 13. กระเทียม 14. สาบเสือ และ 15. รางจืด

### 2. การเตรียมตัวอย่างพืช

คัดเลือกใบสด จำนวนชนิดละ 5 กิโลกรัม ขกเว้น ขมิ้นชันและกระเทียมใช้จากส่วนของหัว ส่วนดาวเรืองใช้ทั้งต้น เนื่องจาก ราก ลำต้น ใบ และดอก เป็นส่วนที่มีกลิ่นฉุน ซึ่งได้ตั้งสมมุติฐานว่าทุกส่วนน่าจะมีฤทธิ์ในการป้องกัน กำจัดโรคได้ จึงได้ทำการสกัดจากทุกส่วน จากนั้นล้างทำความสะอาดแล้วล้างลมไว้ 1 คืน นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำมาชั่งน้ำหนักแห้ง หลังจากนั้นนำมาบดให้ละเอียดในพืชแต่ละชนิด โดยใช้ตะแกรงร่อนขนาด 300 ไมโครเมตร เพื่อใช้ในการสกัดต่อไป

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพืช  
นำพืชที่ได้ไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักสด  
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ล้างทำความสะอาด แล้วล้างลมไว้ 1 คืน

นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

นำมาชั่งเพื่อให้ได้น้ำหนักแห้ง

นำมาบดให้ละเอียด โดยใช้ตะแกรงร่อนขนาด 300 ไมโครเมตร

### 3. การสกัดสาร

คัดเลือกสารสกัดจำนวน 3 ชนิด ที่เกษตรกรสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ง่าย คือ น้ำเปล่า แอลกอฮอล์ 70 % และ แอลกอฮอล์ 95 % โดยนำตัวอย่างพืชที่บดละเอียดมาแช่ในสารสกัดทั้ง 3 ชนิด คือน้ำเปล่า แอลกอฮอล์ 70% และ แอลกอฮอล์ 95 % อัตราส่วน พืช : แอลกอฮอล์ 1: 10 นำสารสกัดวางไว้ในเครื่องเขย่า เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำสารสกัดกรองด้วยผ้าขาวบาง กรองเอาแต่น้ำ จากนั้นนำสารละลายไปกรองต่อในกระดาษกรอง (Wathman เบอร์ 1) วัดปริมาณสารที่กรองได้ บันทึกไว้ในพืชแต่ละชนิด นำสารสกัดที่กรองได้มาลดปริมาตรด้วยเครื่อง rotary evaporator โดยใช้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนสารสกัดมีลักษณะเหนียว นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วนำสารสกัดมาบดเป็นผงละเอียดเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

#### ขั้นตอนการสกัดสาร

ในการสกัดสารจะใช้พืช 1 ส่วนต่อแอลกอฮอล์ 70 % 10 ส่วน

ชั่งน้ำหนักพืช 20 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

เติมแอลกอฮอล์ 70% ขวดละ 200 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน

นำไปวางไว้ในเครื่องเขย่าเป็นเวลา 7 วัน

นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น 1 รอบ

กรองด้วยกระดาษกรอง (Wathman เบอร์ 1)

วัดปริมาณของสารที่กรองได้

นำสารสกัดที่กรองได้มาลดปริมาตรด้วยเครื่อง rotary evaporator

โดยใช้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนสารสกัดมีลักษณะเหนียว

นำมาอบให้แห้งเป็นผงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

#### 4. การเตรียมตัวอย่างมะละกอ

นำเมล็ดมะละกอเพาะในตะกร้าที่มีส่วนผสมของแกลบคั่วและทรายหยาบอัตราส่วน 1:1 ปล่อยให้ เป็นระยะเวลา 15 วัน เมื่อมะละกอออกได้ประมาณ 2 สัปดาห์ ให้เตรียมถุงดำขนาด 4x6 นิ้ว ที่มีส่วนผสม ของแกลบคั่ว : ใบไม้ผุ อัตรา 1 : 1 ชักกล่อมมะละกลงในถุงดำ เมื่อมะละกออายุได้ 1 เดือน ให้นำต้นกล้ามา ทดสอบกับสารสกัดที่เตรียมไว้จากพืชชนิดต่างๆ เลือกสารสกัดที่มีแนวโน้มในการป้องกันโรคใบจุดวง แหวนที่ได้ผลดีที่สุดไว้ 4 ชนิด เพื่อวิเคราะห์หา Trypsin inhibitors จากส่วนของพืชต่อไป

#### 5. แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Random Design) โดยใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพร ทั้ง 16 ชนิดเป็น ทรีทเมนต์ๆละ 20 ต้น เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Least Significant Difference (LSD)

#### 6. การบันทึกผล

นำหนักสด นำหนักแห้งของพืชสมุนไพร ปริมาณสารที่สกัดได้ จำนวนต้นที่เป็นโรค ระดับการ เป็นโรค และ % การเป็นโรค

การบันทึกผลความทนทานต่อโรคจุดวงแหวน ประเมินการเป็นโรคจุดวงแหวนตาม วิไล และ คณะ (2552) ประเมินการเป็นโรคใบจุดวงแหวนเป็น 5 ระดับ ดังนี้

ระดับ 0 = (no symptoms) มะละกอไม่แสดงอาการของโรคใบจุดวงแหวน มีความทนทาน โรคดี มาก

ระดับ 1 = (very mild mottling) มะละกอมีอาการใบเหลืองค่างน้อยมาก 1-25% ของพื้นที่ใบ ใบมี อาการจุดวงแหวน (ring spot) อาการที่ผลไม่ชัดเจน ไม่มีรอยขีดหรือขีด (streak) ที่ก้าน ใบและลำต้น มีความทนทานโรคดี

ระดับ 2 = (mild หรือ moderate mottling) มะละกอมีอาการใบเหลืองค่างปานกลาง 26-50% ของ พื้นที่ใบ มีอาการจุดวงแหวนที่ผลเล็กน้อย ผิวผลเรียบ ไม่มีหรือมีรอยขีดหรือขีดที่ก้าน ใบ มีความทนทานต่อโรคปานกลาง

ระดับ 3 = (mottling) มะละกอมีใบเหลืองค่าง 51-75% ของพื้นที่ใบ มีอาการจุดวงแหวนที่ผล ชัดเจนทั่วทั้งผล มีรอยขีดหรือขีดที่ก้านและลำต้น มีความทนทานต่อโรคน้อย

ระดับ 4 = (severe mottling) มะละกอมีใบเหลืองค่างรุนแรงมาก 75-100% ของพื้นที่ใบ ใบกรอบ หรือใบบิดเบี้ยว พื้นที่ใบเหลืองแต่เส้นกลางใบ (sever leaf distortion) มีอาการจุด วงแหวนที่ผลชัดเจนทั่วทั้งผล ผลบุบจนตกละเอียด รูปทรงผลบิดเบี้ยว ผิวหยาบเนื้อ เป็นไคมีรสขม ไม่ทนทาน โรค (วิไล และคณะ, 2552.)

แผนการดำเนินงานตลอดแผนงานวิจัย ปีที่ 1-3 (ปี พ.ศ. 2555-2557)

ขั้นตอน การ ปฏิบัติงาน	กิจกรรม	ระยะเวลาการดำเนินงาน (เดือนที่)																	
		ปีที่ 1 (2555)						ปีที่ 2 (2556)						ปีที่ 3 (2557)					
		1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
1.	สำรวจคัดเลือกพืชสมุนไพรที่สารออกฤทธิ์ในการควบคุม ป้อนกัน และกำจัด โรคและแมลงศัตรูสำคัญของมะละกอ																		
2.	ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดสารเพื่อให้ได้สารปริมาณและคุณภาพสูงสุด																		
3.	วิเคราะห์ และตรวจวัดคุณสมบัติทางเคมีของสารสำคัญ																		
4.	ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเพื่อทำให้เกิดโรคและแมลงศัตรูสำคัญของมะละกอในห้องปฏิบัติการ																		
5.	เตรียมพื้นที่เมล็ดพันธุ์ และดำเนินการปลูกในพื้นที่เป้าหมาย 3 จังหวัด																		
6.	ทดสอบสารสกัดจากพืช ในแปลงปลูกมะละกอในพื้นที่ที่กำหนด																		
7.	เก็บข้อมูลด้านการเจริญเติบโตของมะละกอ, ความรุนแรงของการเกิดโรค, ความเสียหายเนื่องจากการเข้าทำลายของแมลงศัตรู																		
8.	พัฒนาสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการควบคุมโรคและแมลงศัตรูสำคัญของมะละกอให้เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป																		
9.	รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์และสรุปผล เพื่อเขียนรายงานรายงานฉบับสมบูรณ์ และตีพิมพ์ในวารสารต่างๆ																		