บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 พืชทดลอง (plant material)

เมล็ดพันธุ์

เมล็ดพันธุ์ไมยราบยักษ์ (Mimosa pigra L.) เก็บจากจังหวัดเชียงใหม่ ส่วนเมล็ดพันธุ์กระถินยักษ์ (Leucaena leucocephala Lam.) พันธุ์ซาลวาดอร์ เค 8 (salvador type K 8) ได้จากกองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบมิโมซีน

- กรดเกลือความเข้มข้น 0.1N (0.1N HCl)
- activated carbon 1.5 กรัม ใน 0.1N HCl 1 ลิตร (ระหว่างนำไปใช้ ใช้ magnetic stirrer คนให้สารละลายอยู่ในลักษณะ suspension
- สารละลายเฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_3.6\ H_2O$ 4 กรัม ใน 0.1N HCl 500 มิลลิลิตร)
- $Na_2EDTA.2\ H_2O$ 1 กรัม ในน้ำ 4 ลิตร
- standard mimosine (L-mimosine) ของบริษัท Sigma น.น.โมเลกุล 198

1.2.2 สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบโปรตีน

- กรดกำมะถันเข้มข้น และกรดกำมะถันความเข้มข้น 0.1N
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5\ H_2O$)

- โปตัสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)
- กรดบอริค (boric acid 4%)
- mixed indicator (0.625 กรัม methyl red, 0.480 กรัม methylene blue ใน 500 มิลลิลิตร 95% ethyl alcohol)

1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

1.3.1 เครื่องมือหามิโมซีน

- เครื่องชั่ง
- เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) model spectronic 20 ยี่ห้อ Bausch & Lomb
- เครื่อง homogenizer หรือ blender และ mixer
- water bath
- magnetic stirrer
- กระดาษกรอง whatman No.2

1.3.2 เครื่องมือหาโปรตีน

- เครื่องชั่ง
- เครื่องย่อย (digestion)
- เครื่องกลั่น (distillation)
- magnetic stirrer
- pumice stone

1.4 เครื่องแก้ว

1.4.1 เครื่องแก้วที่ใช้หามิโมซีน

- บีกเกอร์ขนาด 1 และ 2 ลิตร
- volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร
- หลอดทดลอง (test tube) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซ.ม. สูง 15 ซ.ม.

- ขวดแก้วรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร
- ไปเปตขนาด 1, 2, 5 มิลลิลิตร
- ขวดบรรจุสารเคมีที่ใช้ทดลอง
- ขวดบรรจุตัวอย่างพืชทดลอง

1.4.2 เครื่องแก้วที่ใช้หาโปรตีน

- Kjeldahl flask ขนาด 800 มิลลิลิตร
- ขวดแก้วรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 50, 500 มิลลิลิตร
- บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร
- ไปเปตขนาด 10, 20 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์ขนาด 50, 250, 600 มิลลิลิตร
- กระบอกตวงขนาด 5, 10, 50, 100 มิลลิลิตร
- volumetric flask ขนาด 2,000 มิลลิลิตร

2. วิธีดำเนินการทดลอง

2.1 วิธีการปรับที่และทำแปลงปลูกต้นไมยราบยักษ์และต้นกระถินยักษ์

แปลงที่ใช้ทำการทดลองมีขนาด 12 x 20 ตารางเมตร โดยแบ่งแปลงทดลองเป็น 10 แปลง แปลงหนึ่งมีเนื้อที่ประมาณ 3 x 5 ตารางเมตร ปลูกต้นไมยราบยักษ์และต้นกระถินยักษ์อย่างละ 5 แปลง ปลูกระยะห่างระหว่างต้นประมาณ 30 ซ.ม. และแต่ละแปลงห่างกัน 1 เมตร ในแต่ละแปลงปลูกพืช 20 ต้น

2.2 วิธีเพาะเมล็ดพันธุ์ไมยราบยักษ์และกระถินยักษ์

เมล็ดไมยราบยักษ์และกระถินยักษ์มีเปลือกหุ้มหนา ก่อนนำไปเพาะได้เร่งความงอกโดยนำเมล็ดห่อถุงผ้าตบแล้วแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 °ซ. หรือ 176 °ฟ. นาน 2 - 3 นาที (Jones, 1976) หลังจากนั้นนำเมล็ดออกผึ่งแดดแล้วนำไปเพาะในถุงพลาสติก ขนาด 3 x 5 นิ้ว ซึ่งบรรจุดินเกือบเต็มถุงหยอดเมล็ดไมยราบยักษ์และกระถินยักษ์ซึ่งผ่านการเร่งความงอก

011150

18032217

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แล้วลงในถุง ๆ ละ 2 - 3 เมล็ด

ขั้นตอนนี้เริ่มทำการทดลองเมื่อเดือนกรกฎาคม 2524

2.3 วิธีการนำกล้าไมยราบยักษ์และกระถินยักษ์ลงแปลงปลูก

หลังจากเพาะเมล็ดในถุงพลาสติกประมาณ 1 เดือน ได้ต้นกล้าสูงประมาณ 10 ซ.ม. จึงนำกล้าลงแปลงปลูก ก่อนจะนำกล้าลงปลูก ได้ทำลายวัชพืชในแปลงทดลองให้หมดก่อนโดยการถอน

นำกล้าลงแปลงปลูก เมื่อวันที่ 6 สิงหาคม 2524

2.4 วิธีการดูแลรักษาไมยราบยักษ์และกระถินยักษ์ภายหลังจากนำกล้าลงแปลง

เมื่อนำกล้าปลูกในแปลงทดลองแล้วในระยะแรกรดน้ำทุกวันเช้า - เย็น ตลอดระยะเวลา 3 เดือน เนื่องจากในระยะแรกพืชกำลังตั้งตัวต้องหมั่นดูแลรักษา หลังจาก 3 เดือนไปแล้วเมื่อพืชตั้งตัวได้แล้วจึงลดปริมาณการรดน้ำลงเหลือวันละ 1 ครั้ง รดน้ำเวลาเย็น และในช่วงฤดูฝน คือ ประมาณเดือนพฤษภาคม - สิงหาคม ไม่ต้องรดน้ำ เนื่องจากฝนตกมาก และดินมีความชุ่มชื้นเพียงพอ

สำหรับวัชพืชในแปลงทดลองช่วงแรกต้องคอยถอนอย่างสม่ำเสมอ เพื่อป้องกันไม่ให้กล้ายองพืชทั้งสองชนิดตาย

2.5 วิธีเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างพืชเพื่อนำมาเป็นตัวแทนสำหรับการศึกษาการเจริญเติบโตหาปริมาณมิโมซีนและโปรตีนของไมยราบยักษ์และกระถินยักษ์ ใช้วิธีการจับสลาก โดยเขียนสลากติดไว้ที่ต้นพืชทั้ง 20 ต้น ตั้งแต่เบอร์ 1 - 20 จากนั้นจับสลากมา 2 เบอร์ ได้เบอร์อะไรก็ใช้พืชต้นนั้นเป็นตัวอย่างในการทดสอบ ดังนั้นในแต่ละแปลงจะใช้พืชทดลอง 2 ต้น และทำเช่นเดียวกันนี้ทั้ง 10 แปลง

ดอกที่จะใช้เป็นดอกที่บานเต็มที่แล้ว แต่ยังไม่โรย ฝักที่ใช้เป็นฝักอ่อน (ดังรูปที่แสดงไว้) ส่วนเมล็ดเป็นเมล็ดแก่ที่จะใช้ทำพันธุ์

2.6 วิธีทำแห้ง

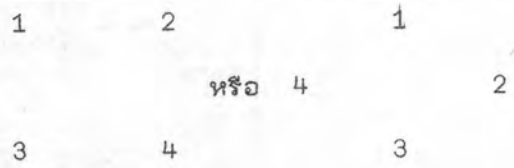
โดยแยกส่วนต่าง ๆ ของพืชเป็นส่วน ๆ คือ ใบอ่อน (ใบที่ 1 - 3 นับจากยอด) ใบที่โตเต็มที่ (ใบที่ 4 ลงไป), ก้านใบ, ลำต้น, ราก, ดอก, ฝักและเมล็ด นำส่วนต่าง ๆ ดังกล่าวอบในตู้อบอุณหภูมิ 40 °ซ. นาน 3 วัน

2.7 การบดตัวอย่าง

บดโดยใช้เครื่องบดที่มีตารางขนาด 40 mesh

2.8 วิธีการแบ่งตัวอย่าง (quartering)

ตัวอย่างที่ทำแห้งและบดแล้ว ก่อนนำมาวิเคราะห์ต้องแบ่งตัวอย่างโดยเทลงบนกระดาษ ใช้ spatula ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ดังรูป



แล้วเอาส่องส่วนที่อยู่ตรงข้ามมาผสมกัน ทิ้งอีกส่องส่วนไป แล้วส่วนที่เหลือแบ่งเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งเหลือตัวอย่างในปริมาณเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ แล้วเก็บใส่ขวดเก็บตัวอย่างซึ่งเป็นขวดสะอาดที่แห้งและมีฝาเป็นเกลียวปิดสนิท แล้ว Label ที่ขวดบอกชนิดของตัวอย่าง (เยาวมาลย์ และสำโรช ค้าเจริญ, 2521)

2.9 วิธีวัดความสูงและเส้นรอบวงของไมยราบยักษ์และกระถินยักษ์

การวัดความสูงของพืชทั้งสองชนิด โดยวัดตั้งแต่โคนต้นจนถึงส่วนยอดที่สูงที่สุดของพืช ส่วนเส้นรอบวงวัดที่ส่วนโคนต้น

2.10 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณมิโมซีน

วิเคราะห์ตามวิธีของ Brewbaker และ Kaye (1981)

1. ชั่งตัวอย่างแห้งประมาณ 1 กรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม 0.1N HCl ถึงขีดปริมาตร

2. นำไปปั่นให้เข้ากันโดยใช้ homogenizer หรือ blender

3. รินมา 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง (เขย่าให้เข้ากันก่อนริน)

4. เติมสารละลาย activated carbon 15 มิลลิลิตร แล้วต้มใน water bath นาน 15 นาที

5. กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.2

6. ดูดน้ำยาที่กรองได้ 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองเติม Na_2EDTA 5 มิลลิลิตร และสารละลายเฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) 1 มิลลิลิตร

7. ทิ้งไว้ในที่มืดนาน 15 นาที เพื่อให้สีเกิดขึ้นเต็มที่แล้วนำไปอ่านค่าเปอร์เซ็นต์ Transmittance ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ 535 nm.

8. ในการทำแต่ละครั้งให้ทำ blank ด้วยโดยใช้น้ำแทนสารละลายเฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) โดยทำดังนี้

test solution 2 มิลลิลิตร sample + 5 มิลลิลิตร Na_2EDTA + 1 มิลลิลิตร สารละลายเฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$)

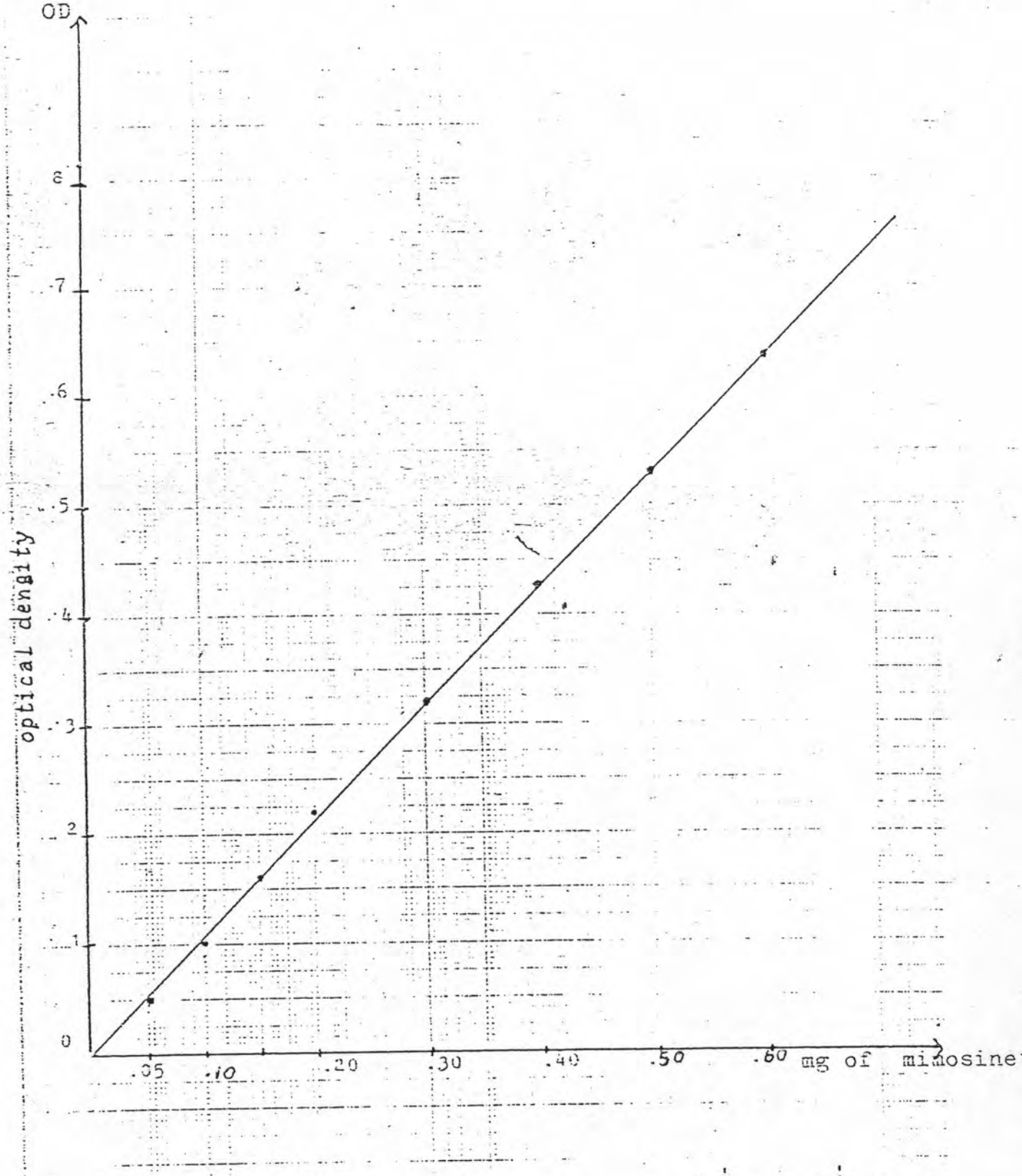
blank solution 2 มิลลิลิตร sample + 5 มิลลิลิตร Na_2EDTA + 1 มิลลิลิตร น้ำ

<u>หมายเหตุ</u>

- การเติมสารละลายเฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) ลงไปในตัวอย่าง เนื่องจากถ้าตัวอย่างมีมิโมซีน จะมีการรวมตัวกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex compound) มีสีม่วง (Megarrity, 1978)
- การเติมกรดเกลือเจือจาง เนื่องจากมิโมซีนจะถูกแยกออกโดยกรดเกลือเจือจาง (Megarrity, 1978)
- การเติม activated carbon ลงไปเพื่อกำจัดสีอื่น ๆ ออก (Matsumoto และ Sherman, 1951)

2.11 <u>การทำ Standard mimosine และเขียนกราฟมาตรฐาน</u>

ชั่ง standard pure mimosine 0.0025, 0.0050, 0.0075, 0.0100, 0.0150, 0.0200, 0.0250 และ 0.0300 กรัม ตามลำดับ ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติม 0.1N HCl จนถึงขีดปริมาตร แล้วดูดสารละลาย



กราฟที่ 1 standard graph mimosine วัดที่ความยาวคลื่น 535 nm.

แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง O.D กับปริมาณมิโมซีน

standard มา 2 มิลลิลิตร เติม 5 มิลลิลิตร Na_2EDTA และ 1 มิลลิลิตร สารละลายเฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) หลังจากนั้นนำไปอ่านค่าเปอร์เซนต์ transmittance จากเครื่องสเปคโตรนิคโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 535 nm. จากนั้นเปลี่ยนเป็นค่า O.D. แล้วนำไปเขียนกราฟมาตรฐาน โดยใช้แกน x เป็นค่าความเข้มข้นของ standard mimosine และแกน y เป็นค่า O.D. ซึ่งจะได้ standard curve เป็นเส้นตรง ดังกราฟที่ 1

2.12 <u>การคำนวณค่าเปอร์เซนต์มิโมซีน</u>

จากค่าเปอร์เซนต์ transmittance ที่อ่านได้จากเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 535 nm. เปลี่ยนเป็นค่า O.D. จากตาราง แล้วอ่านค่า O.D. จาก standard graph (ดังกราฟที่ 1) ซึ่งจะทราบว่าความเข้มข้นของมิโมซีนเป็นมิลลิกรัม แล้วนำกลับมาคำนวณหาค่าเปอร์เซนต์มิโมซีนต่อน้ำหนักแห้ง

2.13 <u>วิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน</u>

จาก AOAC 8th ed. (1955), เยาวมาลย์ และสำโรช ค้าเจริญ (2521) ใช้วิธีของ Kjeldahl ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมด แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ

1. <u>การย่อย</u> (digestion) ย่อยด้วยกรดกำมะถันเข้มข้น ไนโตรเจนที่อยู่ในอาหารทั้งหมดจะถูกย่อยให้เป็นแอมโมเนียมซัลเฟต ดังสมการ

$$\text{Protein} + H_2SO_4 \xrightarrow[K_2SO_4]{CuSO_4.5H_2O} (NH_4)_2SO_4$$

NPN

<u>วิธีทำ</u>

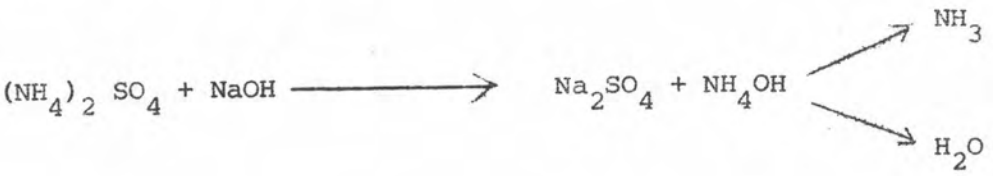
1.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 0.25 กรัม ใส่ใน Kjeldahl flask ขนาด 800 มิลลิลิตร

1.2 เติม $CuSO_4.5H_2O$ 0.5 กรัม และ K_2SO_4 10 กรัม

1.3 เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 25 มิลลิลิตร

1.4 นำ flask เข้าเครื่องย่อยจนได้สารละลายใส่

2. <u>การกลั่น</u> (distillation) เป็นการไล่แอมโมเนียออกมาจากแอมโมเนียมซัลเฟต โดยใช้ด่าง NaOH ดังสมการ



วิธีทำ

2.1 ตัวอย่างที่ย่อยแล้วทิ้งให้เย็นแล้วเติมน้ำ 200 มิลลิลิตร

2.2 เติม pumice stone (กัน bumping)

2.3 ต่อ flask เข้าเครื่องกลั่นปลายด้านหนึ่งของ condenser จุ่มในกรดบอริค (4% boric acid 50 ml.)

2.4 เติม 40% โซเดียมไฮดรอกไซด์ ลงใน Kjeldahl flask 70 - 100 มิลลิลิตร

2.5 กลั่นจนได้แอมโมเนีย 150 มิลลิลิตร เก็บในกรดบอริค (boric acid)

3. <u>การไตเตรทขั้น</u> (titration) เป็นการหาปริมาณของแก๊สแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจากการกลั่น เพื่อนำไปคำนวณหาค่าของไนโตรเจนทั้งหมดในตัวอย่าง

วิธีทำ

นำสารละลายที่ได้มาไตเตรทกับ standard 0.1N H_2SO_4 โดยใช้ mixed indicator

<u>คำนวณค่าเปอร์เซนต์โปรตีน</u>

$$\% \text{ protein} = \frac{(\text{ml. } H_2SO_4 - \text{ml. blank}) \times \text{protein factor}}{\text{sample weight}} \times 100$$

protein factor = 6.25

ขั้นตอนดำเนินการทดลองแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ

1. <u>ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นไมยราบยักษ์และต้นกระถินยักษ์</u>

ศึกษาการเจริญเติบโตของพืชทั้งล่องชนิดเมื่ออายุ 3, 6, 9 และ 12 เดือน โดยวัดความสูงและเส้นรอบวงของลำต้น

ครั้งแรก	วัดเมื่อพืชทั้งล่องอายุ 3 เดือน	วัดเมื่อวันที่ 6 พฤศจิกายน 2524
ครั้งที่สอง	วัดเมื่อพืชทั้งล่องอายุ 6 เดือน	วัดเมื่อวันที่ 6 กุมภาพันธ์ 2525
ครั้งที่สาม	วัดเมื่อพืชทั้งล่องอายุ 9 เดือน	วัดเมื่อวันที่ 6 พฤษภาคม 2525
ครั้งที่สี่	วัดเมื่อพืชทั้งล่องอายุ 12 เดือน	วัดเมื่อวันที่ 6 สิงหาคม 2525

และติดตามการเจริญจนกระทั่งติดดอก, ฝัก และเมล็ด ของพืชทั้งล่องชนิด

2. <u>การวิเคราะห์หาปริมาณมิโมซีนและโปรตีนในส่วนต่าง ๆ ของไมยราบยักษ์และกระถินยักษ์</u>

โดยหาในใบอ่อน (ใบที่ 1- 3), ใบที่โตเต็มที่ (ใบที่ 4 ลงไป), ก้านใบ, ลำต้น, ราก, ดอก, ฝัก และเมล็ด เมื่อพืชทั้งล่องชนิดอายุ 3, 6, 9 และ 12 เดือน

3. <u>การหาเปอร์เซ็นต์มิโมซีนต่อโปรตีนในส่วนต่าง ๆ ของไมยราบยักษ์และกระถินยักษ์</u>

โดยดูจากค่า % มิโมซีน/โปรตีน ของพืชทั้งล่องชนิด เมื่ออายุ 3, 6, 9 และ 12 เดือน